

Résumé

Les travaux de recherche entrepris au cours de cette thèse, ont permis de mettre en lumière certains aspects du potentiel cytotoxique *in vitro* de l'huile essentielle (HE) de *Lippia citriodora* provenant de différentes régions du Maroc contre un panel de lignées tumorales. A cet effet, nous avons démontré que cette HE exerçait une activité cytotoxique dose-dépendante et différentielle selon les régions et selon les lignées tumorales testées. L'effet cytotoxique était très fort à l'égard des cellules tumorales du mastocytome murin (P815) ($IC_{50}=6,60 \mu\text{g/ml}$), comparé à la lignée tumorale d'adénocarcinome mammaire humain MCF7 ($IC_{50}=34,72 \mu\text{g/ml}$) et à la lignée tumorale de singe VERO ($IC_{50}=32,90 \mu\text{g/ml}$). L'analyse chimique de cette HE a été réalisée par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Les principales molécules dominant la composition chimique, sont l'oxyde de caryophyllène (13,68%), le spathuléol (12,38%), l'Ar-curcumène (12,32%), le néral (8,07%) et le cis-verbénol (6,28%). Afin d'évaluer le rôle joué par les composés majoritaires et minoritaires, nous avons étudié la cytotoxicité induite par certains constituants purs tels que l'oxyde de caryophyllène, le citral, l'élémane et le limonène. Les résultats ont montré une forte activité cytotoxique de tous ces composés contre les cellules P815. Dans l'ensemble, nos résultats ont montré que, même à de très faibles concentrations, les composés minoritaires contenus dans l'HE de *Lippia citriodora* étaient capables de présenter une activité cytotoxique importante et différentielle contre les cellules P815. Aussi, aucun effet cytotoxique de l'HE sur les cellules mononucléées du sang périphérique humain (PBMC) n'a été observé. Pour tenter d'élucider les mécanismes moléculaires impliqués, les résultats du test de l'induction de l'apoptose ont montré que l'HE de *Lippia citriodora* induisait la mort programmée sur les cellules P815, alors qu'elle ne l'avait pas induite sur les cellules MCF7. En effet, l'étude de l'apoptose par électrophorèse de l'ADN fragmenté et par la détection de la phosphatidylsérine exposée à la surface des membranes des cellules par le marquage à l'annexine-Biotine-streptavidine FITC, a mis en évidence une apoptose sur les cellules P815. En revanche, ces tests n'ont pas montré de fragments d'ADN, mais des changements morphologiques d'apoptose tardive et/ou nécrose sur les cellules MCF7 ont été observés avec la rupture de la membrane cytoplasmique, le débordement du cytoplasme et la fuite des organites cellulaires. Pour approfondir ces investigations, des tests par RT-PCR ont été menés pour montrer l'effet de l'HE de *Lippia citriodora* sur l'expression des gènes Bax, Bcl-2, p53 et c-jun dans les cellules MCF7. De manière intéressante, la RT-PCR a permis de détecter des variations des niveaux d'expression de ces gènes avec le temps d'exposition des cellules à l'HE et selon l'origine géographique de chaque HE. Ces résultats ont confirmé une apoptose tardive et/ou un effet de nécrose. D'autre part, les combinaisons de l'HE de *Lippia citriodora* ou de l'oxyde de caryophyllène avec le cisplatine ont montré un effet antagoniste. Afin de confirmer ces résultats obtenus *in vitro*, des expériences *in vivo* ont été réalisées en utilisant le modèle animal DBA2/H2d de souris porteuses de tumeur. En effet, l'administration par voie orale de l'HE de *Lippia citriodora* chez des souris a réduit de manière significative (temps et dose dépendants) le développement d'une tumeur solide chez les groupes traités comparés aux souris non traitées. Par ailleurs, un autre test a montré que l'HE de *Lippia citriodora* exerçait une activité antibactérienne intéressante, *in vitro*, vis-à-vis de *Escherichia coli* ATCC 25922 et de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Cependant, la souche ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa* était résistante. Les valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) fluctuaient entre 2,84 et 8,37 mg/ml. Enfin, l'extrait hydro-alcoolique des feuilles de *Lippia citriodora* a présenté une activité antiradicalaire très importante alors que l'huile essentielle est faiblement antioxydante, comparée à la vitamine C. Finalement, tous les résultats obtenus mettent bien en évidence le potentiel cytotoxique de l'HE de *Lippia citriodora*. Il s'agit d'un phénomène très complexe qui dépend de la composition chimique, de la nature des molécules et de la cible cellulaire.

Mots clés : Cancer, *Lippia citriodora*, Huile essentielle, Composition chimique, Oxyde de caryophyllène, Apoptose, Antagonisme.

MOULAY ALI OUKERROU

Contribution à l'étude du potentiel antitumoral de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* d'origine marocaine :
Etude cellulaire et moléculaire *in vitro* et *in vivo*

N° d'ordre : 176/2018



UNIVERSITE SULTAN MOULAY SLIMANE
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES BENI MELLAL



N° d'ordre : 176/2018

Centre des Etudes Doctorales Sciences et Techniques
Formation Doctorale Ressources Naturelles Environnement et Santé

THESE

Présentée par

Mr MOULAY ALI OUKERROU

Pour obtenir le diplôme de

DOCTORAT

Option : Sciences de la vie et de la santé

Spécialité : Pharmacognosie – Immunopharmacologie des substances naturelles

Contribution à l'étude du potentiel antitumoral de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* d'origine marocaine : Etude cellulaire et moléculaire *in vitro* et *in vivo*

Soutenue publiquement le 06 Octobre 2018

Devant le jury composé de :

Pr. Hassan LATRACHE	Professeur de l'enseignement supérieur à la FST de Beni Mellal	Président
Pr. Abderrahman CHAIT	Professeur de l'enseignement supérieur à la FSS de Marrakech	Rapporteur
Pr. Youssef BAKRI	Professeur de l'enseignement supérieur à la FS de Rabat	Rapporteur
Pr. Mustapha ZEDDOU	Professeur de l'enseignement supérieur à la FST de Beni Mellal	Examineur
Pr. Abdelkhalid ESSAMADI	Professeur de l'enseignement supérieur à la FST de Settlat	Examineur
Pr. Hassan AIT MOUSE	Professeur de l'enseignement supérieur à la FST de Beni Mellal	Co-directeur de thèse
Pr. Abdelmajid ZYAD	Professeur de l'enseignement supérieur à la FST de Beni Mellal	Directeur de thèse

Introduction

Depuis l'aube des temps, l'homme a pu compter sur la nature pour se protéger et se soigner de toutes les blessures et maladies qu'il pouvait rencontrer. A travers les siècles et partout dans le monde, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales. Elles étaient utilisées par les chamans, les sorciers, les marabouts et les guérisseurs des médecines traditionnelles d'Europe, d'Asie, d'Amérique, d'Afrique et d'Océanie. Leur utilisation était directe ou en infusion ou sous forme d'onguent sans que leur mode d'action ne soit compris. Si certaines de ces pratiques médicales paraissent étranges et relèvent de la magie, d'autres au contraire semblent plus fondées et plus efficaces. Pourtant, toutes ont pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des hommes (Iserin, 2001).

Les plantes possèdent d'extraordinaires vertus thérapeutiques. Leurs emplois à des fins médicinales remonte à la préhistoire et se perpétue à travers les civilisations. Leur utilisation pour le traitement de plusieurs maladies chez les êtres vivants et en particulier chez l'homme est très ancienne et a toujours été faite de façon empirique (Allali et al., 2011). Ainsi, avec les découvertes scientifiques et l'amélioration des technologies, les décoctions et les cataplasmes de plantes préparés par le guérisseur ont fait place à la radiothérapie et aux molécules produites industriellement par voie chimique et prescrites par le médecin (Sawadogo et al., 2012).

Actuellement, les molécules d'origine naturelle sont isolées, identifiées et étudiées par les scientifiques. Leurs propriétés sont reconnues et répertoriées, et donc mises à profit, dans le cadre des médecines traditionnelles et également dans la médecine allopathique moderne (Kar, 2007). Celle-ci utilise des principes actifs découverts dans beaucoup de plantes et bon nombre de médicaments actuels, dotés d'une grande efficacité, sont d'origine végétale. L'intérêt particulier porté à ces composés naturels revient à leur activité avec très peu d'effets secondaires (Depoërs et al., 2002).

Aujourd'hui, on estime que les principes actifs provenant des végétaux représentent environ 25% des médicaments prescrits. Soit un total de 120 composés d'origine naturelle provenant de 90 plantes différentes. En Afrique, près de 6000 espèces de plantes sont utilisées, dont plus de 400 sont des plantes médicinales qui contribuent pour 90% du traitement médical (Kar, 2007). En effet, selon l'OMS, dans certains pays d'Asie et d'Afrique, 80% de la population dépend de la médecine traditionnelle pour ses premiers soins de santé (WHO, 2010).

La médecine traditionnelle marocaine qui prend ses origines de la médecine arabe et islamique occupe une place prépondérante dans la vie des gens. Les enquêtes socio-économiques et

ethnobotaniques réalisées sur la médecine traditionnelle au Maroc, montrent l'importance de la place qu'occupe cette médecine dans la société marocaine. Plus de 70% des personnes interrogées utilisent les plantes médicinales et aromatiques pour ce faire soigner (Bellakhdar et al., 1991; Hmamouchi, 2001).

En ce début du XXI^e siècle, la médecine moderne a connu un net essoufflement avec l'apparition de beaucoup d'effets iatrogènes des médicaments et la diminution de l'efficacité des antibiotiques (l'arrivée des bactéries multirésistantes). Actuellement, les pratiques médicales et thérapeutiques s'ouvrent aux médecines alternatives, en utilisant notamment des produits de santé à base de plantes médicinales (Fleurentin et al., 2011). Leur utilisation connaît un renouveau exceptionnel. Ces remèdes naturels sont bien tolérés par l'organisme et entraînant peu d'effets secondaires. (Iserin, 2001).

Depuis ces dernières années, une autre voie de recherche suscite un intérêt particulier en matière de médicaments. Elle consiste à utiliser des mélanges de molécules, des extraits de plantes ou des mélanges d'extraits de plantes dans différents domaines de la pathologie médicale. A l'aube de cette nouvelle ère thérapeutique, l'approche ethnopharmacologique s'appuyant à la fois sur une méthodologie rigoureuse et un comportement éthique, a proposé des pistes de recherche originales, fondées sur des connaissances issues de cultures très diverses.

Le cancer est devenu un enjeu majeur de la santé publique à l'échelle planétaire tant dans les pays développés que dans ceux en voie de développement. Il représente une des principales causes de mortalité. Selon l'organisation mondiale de la santé, pour l'année 2012, 8,2 millions de décès sont imputables au cancer soit 13% des décès enregistrés dans le monde. Plus de 32,6 millions de personnes vivent avec le cancer dont 14,1 millions de nouveaux cas chaque année. Au Maroc, 30 000 à 40 000 nouveaux cas de cancers sont enregistrés chaque année selon la Fondation Lalla Salma de lutte contre le cancer (CIRC 2012). Pour cette raison, différents laboratoires de recherches scientifiques à travers le monde se sont activés ces dernières décennies sur l'étude et le screening pharmacologique des milliers de substances naturelles afin de gagner le challenge de la découverte des molécules qui soient efficaces contre le cancer et avec beaucoup moins d'effets secondaires. A cet effet, une étude rétrospective de 1981 à 2002 (Figure 1), portée sur 140 médicaments anticancéreux mis sur le marché, a montré que les composés d'origine naturelle représentent une source importante dans l'élaboration de ces nouvelles structures médicamenteuses. Seulement 36% de ces médicaments sont obtenus par

voie de synthèse chimique totale, alors que près de deux tiers (64%) sont d'origine naturelle, ou, au moins ayant un pharmacophore naturel (Newman et al., 2003).

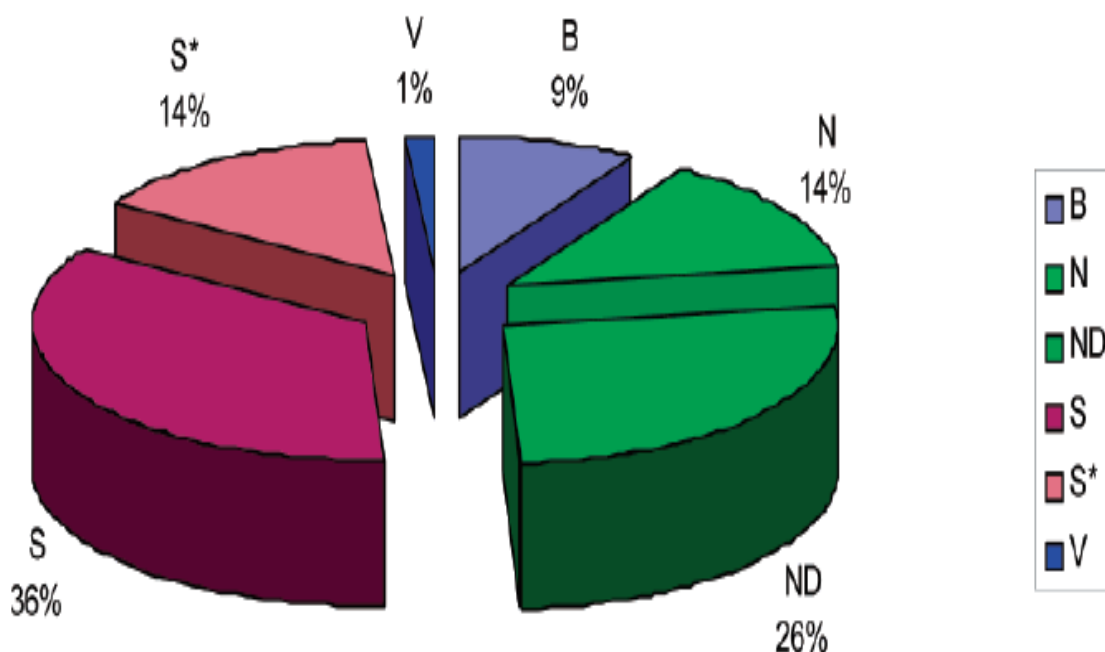


Figure 1 : Médicaments anticancéreux commercialisés (1981-2002) “B” : biologique ; Habituellement, un grand peptide ou protéine soit isolé d’un organisme ou d’une lignée cellulaire, soit produit par des moyens biotechnologiques. “N” : produit naturel. “ND” : dérivé d’un produit naturel, qui a subi une modification semi-synthétique. “S” : drogue totalement synthétique. “S*” : fabriqué par synthèse totale, mais le pharmacophore provient d’un produit naturel. “V” : vaccin (Newman et al., 2003).

A travers le monde, la recherche de nouvelles molécules anticancéreuses demeure une des principales préoccupations des chercheurs en oncologie. Aussi, les plantes ont été à l’origine de nombreuses molécules actives ayant montré leur efficacité dans le traitement de différents cancers. Au Maroc, la médecine traditionnelle, riche et diversifiée, constitue une source importante pour le criblage de nouvelles molécules potentiellement bioactives à visée thérapeutique. C’est dans ce contexte et dans le cadre de la valorisation et de la préservation des plantes médicinales de la flore marocaine, que nous avons choisi d’étudier *Lippia citriodora* (verveine citronnée, vernaculaire marocain : “Lwiza”). Cette plante est utilisée en médecine traditionnelle marocaine pour ses feuilles sous forme d’infusions pour les propriétés suivantes : antispasmodique, digestive, stomachique et sédative (Bellakhdar, 1997). L’huile essentielle extraite de ses feuilles séchées est indiquée pour l’anxiété, le stress, l’insomnie, certaines dépressions, la fatigue nerveuse, la sclérose en plaques, le psoriasis, la tachycardie et les rhumatismes (Baudoux, 2010).

L'objectif de ce travail de thèse est d'étudier les propriétés antitumorales de l'huile essentielle (HE) de *Lippia citriodora* distillée à partir des feuilles séchées de la plante récoltée à la même période végétative de l'année (Juillet-Aout) dans différentes régions du Maroc. Ces investigations comprendront une analyse de la composition chimique détaillée de cette HE et de sa cytotoxicité *in vitro* sur différentes lignées de cellules cancéreuses. Une autre partie visera l'exploration et la compréhension certains mécanismes moléculaires impliqués dans cette activité. L'oxyde de caryophyllène, le citral, le limonène et l'élémane, sont des composés purs de cette HE. Ils sont choisis pour tester leur cytotoxicité. Une troisième partie sera réservée à l'évaluation du potentiel antitumoral *in vivo* à l'aide d'un modèle animal DBA2/P815. Enfin, une dernière partie sera consacrée à l'étude de son activité antibactérienne vis-à-vis de certaines bactéries gram⁻ et gram⁺.

Première partie : Etude bibliographique

Chapitre I : Cancers et chimiothérapie anticancéreuse

I.1. Cancers : données actuelles, épidémiologie et répartition mondiale et au Maroc

I.1.1. Cancer

Étymologiquement, le mot « cancer » vient du latin qui signifie « crabe ». Cette image viendrait des premières observations faites concernant le cancer du sein : une tumeur enserrant la glande de ses multiples prolongements. Cette première définition est formulée par Galien (131-201). Le mot « tumeur » vient également du latin « tumere » qui signifie « enfler ».

Médicalement, un cancer est défini, de façon très large comme une maladie liée à la prolifération anarchique de cellules et à la diffusion incontrôlée dans n'importe quelle partie de l'organisme. Le cancer n'est pas une maladie unique, mais un ensemble de plus de deux cents pathologies différentes qui peuvent apparaître dans tout tissu ou organe. C'est avant tout une maladie de la communication cellulaire et du contrôle de la prolifération, dans un contexte d'instabilité génétique. Cette multiplication rapide, fait que ces cellules anormales qui, au-delà de leur délimitation habituelle, peuvent envahir des parties adjacentes de l'organisme, puis essaimer dans d'autres organes, donnant lieu aux métastases, celles-ci étant la principale cause de décès des malades (Giraud, 2016b).

Ces cellules cancéreuses capables d'envahir les tissus avoisinants et de proliférer à distance de leur localisation initiale, se différencient des cellules normales car :

- elles sont à renouvellement rapide avec une croissance cellulaire anarchique. Il existe des cellules normales à renouvellement rapide, aussi, telles que les leucocytes ainsi que les cellules de certaines muqueuses, mais leur croissance est régulée ;
- elles n'obéissent pas aux signaux donnés par les cellules normales, elles échappent donc au mécanisme d'homéostasie et de régulation cellulaire ;
- elles n'adhèrent pas très bien les unes aux autres et peuvent ainsi se propager à d'autres parties du corps et créer des métastases ;
- elles se développent en cellules plus ou moins spécialisées. Une cellule cancéreuse sera dite « mature » si elle assure les fonctions de la cellule normale et dite « immature ou indifférenciée » si elle n'assure pas la fonction de la cellule ;

- elles sont dites « immortelles », car elles ont perdu le potentiel d'apoptose ou suicide programmé qu'a une cellule normale.

De ce qui précède, les différences majeures entre une cellule cancéreuse et une cellule normale sont :

- ✓ **Immortalité** : une cellule normale se multiplie, se différencie en cellule spécialisée, cesse de se diviser et meurt ; une cellule cancéreuse quant à elle se multiplie indéfiniment, ne se différencie pas et ne meurt pas.
- ✓ **Aucun arrêt de croissance** : les cellules normales arrêtent de se multiplier lorsqu'elles ont atteint une certaine densité cellulaire ; alors que les cellules cancéreuses se multiplient de façon anarchique et permanente, s'entassent avec désordre sans respecter la structure générale du tissu.
- ✓ **Marqueurs membranaires** : une cellule cancéreuse, contrairement à une cellule normale, porte de nombreux marqueurs spécifiques du cancer sur sa membrane cytoplasmique. (Giraud, 2016b).

I.1.2. Données actuelles sur le cancer

Le cancer est la résultante d'un processus de développement qui passe par plusieurs étapes intéressant une population cellulaire au sein d'un microenvironnement fourni par le tissu d'origine, avec classiquement une évolution vers une lésion précancéreuse puis vers une tumeur maligne (Stratton et al., 2009). Ces modifications proviennent des interactions entre les facteurs génétiques propres au sujet et des agents extérieurs pouvant être classés en trois catégories :

- les cancérogènes physiques, comme le rayonnement ultraviolet et les autres radiations ionisantes ;
- les cancérogènes chimiques, comme l'amiante, les composants de la fumée du tabac, l'aflatoxine (contaminant des denrées alimentaires) ou l'arsenic (polluant de l'eau de boisson) ;
- les cancérogènes biologiques, comme des infections dues à certains virus, bactéries ou parasites, ou encore l'hérédité.

La cancérogenèse est la conséquence d'altérations successives du génome des cellules tumorales, qui perturbent de façon permanente l'homéostasie tissulaire. On distingue ainsi, quatre étapes (Figure 2) :

➤ **Initiation**

L'initiation implique la modification, le changement ou la mutation des gènes qui surviennent spontanément ou induits par l'exposition à un agent cancérigène dit initiateur (les hydrocarbures polycycliques aromatiques du tabac, les produits chimiques, l'amiante, l'alfatoxine, les radiations ionisantes, les virus...). Les altérations génétiques peuvent entraîner une dérégulation des voies de signalisation biochimiques associées à la prolifération, à la survie et à la différenciation cellulaire, qui peuvent être influencées par un certain nombre de facteurs, y compris le taux et le type de métabolisme cancérigène et la réponse de la fonction de réparation de l'ADN. Les effets des initiateurs sont irréversibles. Une fois qu'une cellule particulière a été affectée par un initiateur, elle est susceptible de promotion jusqu'à sa mort. Puisque l'initiation est le résultat d'un changement génétique permanent, toutes les cellules filles produites à partir de la division de la cellule mutée porteront également la mutation. L'initiation consiste donc, en une dérégulation au niveau de certains gènes aboutissant à une transformation cellulaire. Cette étape cible les oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs, les gènes de réparation de l'ADN et les gènes de l'apoptose (Sherbet and Lakshmi, 1997).

➤ **Promotion**

Elle correspond à une exposition prolongée, répétée ou continue, à une substance qui entretient et stabilise la lésion initiée. Une fois qu'une cellule a été mutée par un initiateur, elle est susceptible aux effets des promoteurs. Ces composés favorisent la prolifération de la cellule, donnant lieu à un grand nombre de cellules filles contenant la mutation créée par l'initiateur. C'est un processus considéré comme relativement long et réversible dans lequel s'accumulent des cellules préneoplasiques qui prolifèrent activement. Cette progression est la phase entre une lésion pré-maligne et le développement d'un cancer invasif (Weigelt et al., 2005). Il en résulte une cascade d'interactions entre les cytokines et leurs récepteurs, ce qui amène à la perte de l'homéostasie tissulaire et l'émergence de clones cellulaires transformés. Plusieurs agents dits promoteurs de carcinogenèse sont impliqués dans cette étape. Contrairement aux initiateurs, les promoteurs ne se lient pas de manière covalente à l'ADN ou à des macromolécules dans la cellule. Beaucoup se lient aux récepteurs sur la surface de la cellule afin d'affecter les voies intracellulaires conduisant à une augmentation de la prolifération cellulaire.

➤ **Progression**

Elle correspond à la prolifération incontrôlable des cellules tumorales et le cancer devient cliniquement détectable. Cependant, du fait du nombre très important de mitoses, les cellules finissent par acquérir certaines propriétés d'autonomie de croissance, une adaptabilité métabolique et une pharmacorésistance. Durant la progression, la transformation s'opère par étapes d'une tumeur bénigne à un néoplasme et à une malignité et où des changements génétiques et phénotypiques se produisent. Ce changement caryotypique s'accompagne d'un taux de croissance accru, d'une invasivité, d'une métastase et d'une altération de la biochimie et de la morphologie.

➤ **Métastase**

Contrairement aux cellules normales, les cellules cancéreuses ne respectent plus les relations structurelles et tissulaires et s'infiltrent puis envahissent les tissus voisins (Figure 3). Le mécanisme le plus important dans l'invasion tumorale est la perte d'adhésion des cellules entre elles à cause de la perte ou la modification des glycoprotéines de surface membranaire qui assurent à l'état normal la reconnaissance des cellules d'un même tissu. La métastase implique, donc, la propagation des cellules cancéreuses du site primaire à d'autres parties du corps par la circulation sanguine ou le système lymphatique (Figure 4). Durant ce stade, les cellules vont également acquérir une certaine mobilité pour s'approcher des vaisseaux sanguins (Sherbet and Lakshmi, 1997). On sait que les agents chimiopréventifs inhibant l'angiogenèse et l'invasion des tumeurs primaires, peuvent être utilisés pour inhiber la métastase du cancer.

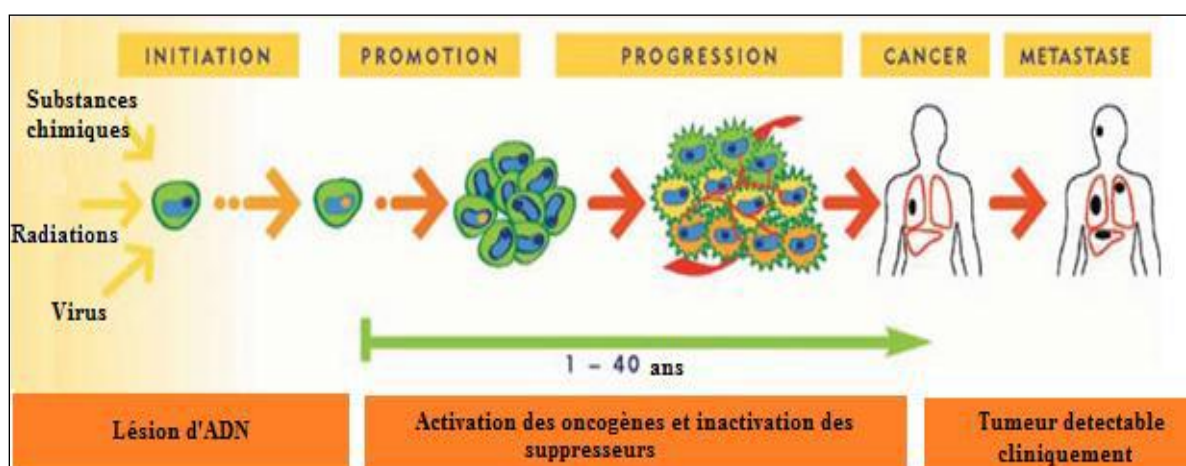


Figure 2 : Différentes étapes du cancer. Pendant de nombreuses années, voire des décennies, les cellules cancéreuses restent très vulnérables ; Seulement quelques-unes réussiront à atteindre le stade malin. Cette vulnérabilité permet d'intervenir et d'interférer à plusieurs étapes du développement de la tumeur et ainsi de prévenir l'apparition de la maladie. (Béliveau and Gingras, 2007).

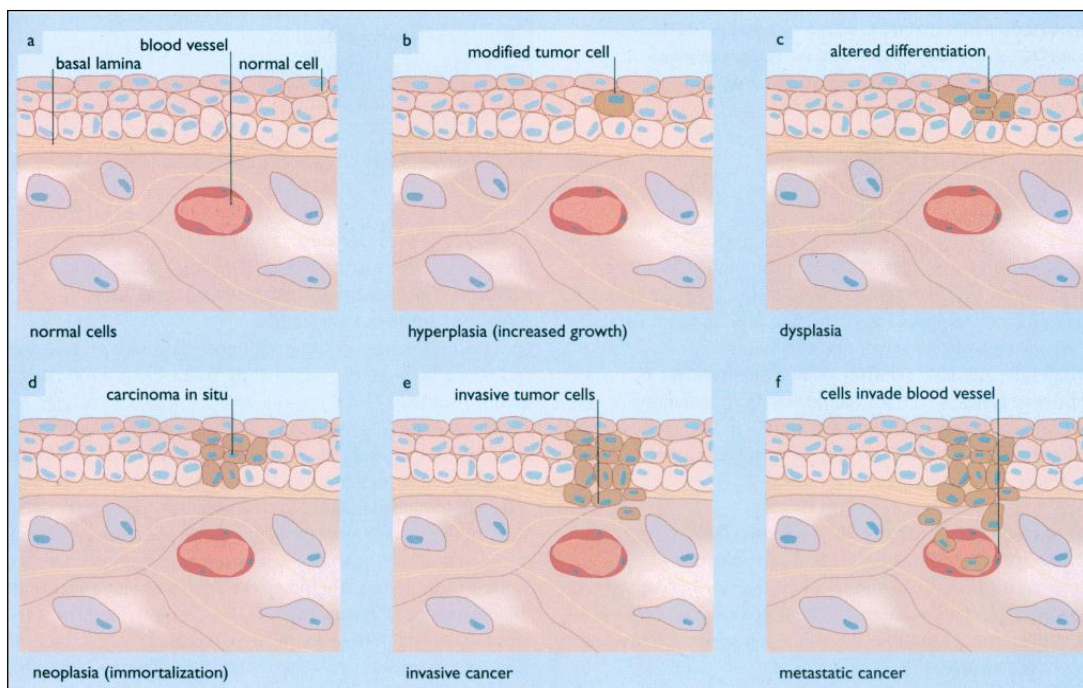


Figure 3 : Progression hypothétique des cellules normales aux cellules malignes (Page et al., 2002).

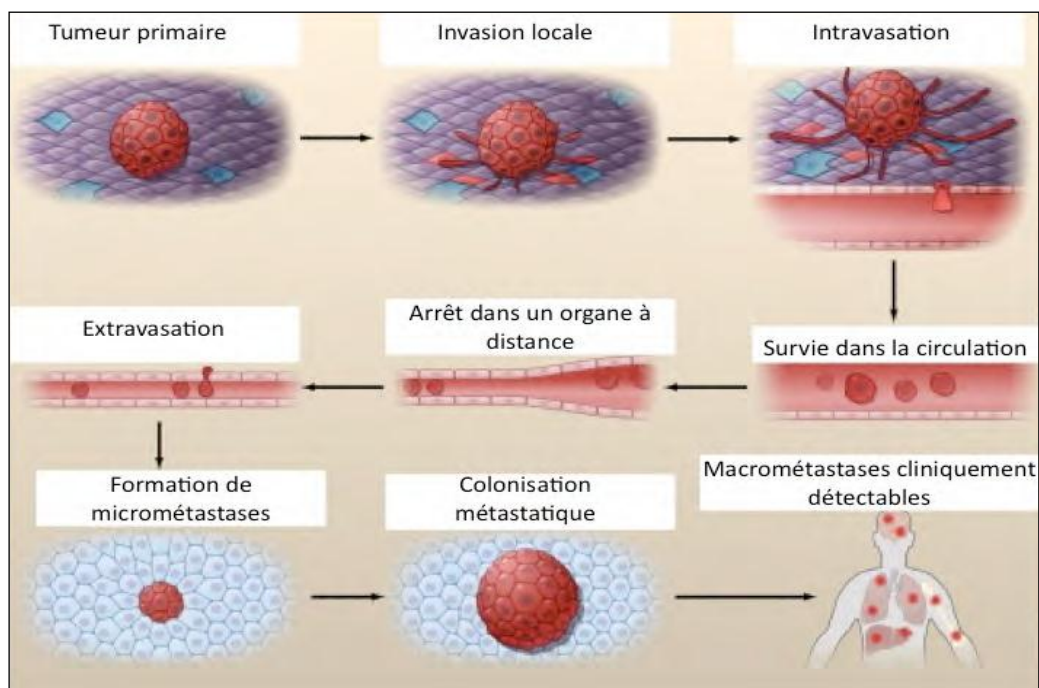


Figure 4 : L'invasion métastatique (Valastyan and Weinberg, 2011). Pendant la progression métastatique, les cellules tumorales quittent leurs sites primaires de croissance, passent dans la circulation systémique, et s'adaptent pour survivre et prospérer dans le microenvironnement étranger du nouveau tissu.

I.1.2.1. Bases moléculaires de la carcinogénèse

Les trois dernières décennies ont permis de générer une quantité très importante d'avancées spectaculaires dans le domaine de la recherche sur le cancer. Ainsi, de nombreux travaux ont démontré que le processus tumoral chez l'homme se déroule suivant plusieurs étapes, et opère par altérations génétiques successives permettant la transformation progressive de cellules humaines normales en cellules tumorales (Hanahan and Weinberg, 2000). Celles-ci peuvent envahir les tissus environnants et essaimées à distance sous forme de métastases (Figure 5). Durant cette transformation, les cellules tumorales détournent les circuits de régulation classiques qui gouvernent la prolifération cellulaire et l'homéostasie. L'analyse pathologique des organes atteints révèle des lésions représentatives d'étapes intermédiaires (stades « pré-malins ») au cours de l'évolution de la maladie jusqu'à son stade invasif.

L'identification des signaux mitogènes permettant à une cellule normale de limiter le nombre de ses divisions a fait l'objet de nombreuses études. Ce mécanisme, découvert au cours de la dernière décennie, est médié par les télomères situés à l'extrémité des chromosomes. Ceux-ci sont composés de centaines de séquences répétées de 6 paires de bases qui, à chaque division cellulaire, subissent une perte de 50 à 100 paires de bases à l'extrémité de chaque chromosome. Cette érosion progressive est le fait de l'incapacité des ADN polymérases à répliquer complètement les parties 3' de l'ADN chromosomique pendant la phase S du cycle cellulaire, induisant invariablement l'entrée de la cellule dans la mort programmée. Afin d'y échapper, les cellules tumorales ont développé un mécanisme permettant d'éliminer le phénomène d'érosion télomérique (Hanahan and Weinberg, 2000). Ainsi, les cellules possédant cette activité de maintien de leurs télomères, engagent des mécanismes leur permettant de garder la longueur des extrémités télomériques au-delà d'un certain niveau, assurant une capacité de multiplication illimitée aux cellules filles.

Le cycle cellulaire normal nécessite des signaux de croissance mitogènes afin d'évoluer d'un stade quiescent à un stade de prolifération active. Le cycle normal est divisé en quatre phases principales (G_0/G_1 , S, G_2 , M) régulant l'ensemble des processus de la division cellulaire (Figure 6). Des signaux de croissance sont transmis à la cellule par des récepteurs transmembranaires où se lient spécifiquement des molécules de signalisation comme des facteurs de croissance solubles, des composants de la matrice extracellulaire ou des molécules permettant l'adhésion ou l'interaction entre deux cellules (Hanahan and Weinberg, 2000). De nombreux oncogènes agissent en mimant les signaux de croissance cellulaire. En fait, les cellules tumorales génèrent

une grande partie des signaux de croissance dont elles ont besoin et réduisent ainsi leur dépendance vis-à-vis des tissus normaux présents dans leur microenvironnement. Les signaux de croissance sont sur-exprimés dans de nombreuses formes de cancer et permettent la sensibilisation des cellules tumorales à des niveaux très bas de facteurs de croissance, normalement sans effet sur la prolifération cellulaire (Fedi et al., 1997).

Les récepteurs cellulaires de surface permettant la transduction intracellulaire de signaux de croissance sont également la cible d'altérations et de dysfonctionnements au cours du processus tumoral (Hanahan and Weinberg, 2000). Le récepteur à l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), par exemple, est surexprimé dans les tumeurs de l'estomac, du cerveau et du sein, alors que le récepteur HER2 (*Human Epidermal Growth factor Receptor-2*) l'est dans les tumeurs de l'estomac et dans les carcinomes mammaires (Fedi et al., 1997).

L'acquisition par les cellules tumorales d'une autonomie vis-à-vis des facteurs de croissance ne peut pas expliquer entièrement le processus tumoral. Ainsi, la croissance d'une cellule est largement dépendante des cellules avoisinantes (signaux paracrines) ou des signaux délivrés par voie systémique (signaux endocrines) (Hanahan and Weinberg, 1996). Il a, en effet, été suggéré que les signaux induisant la prolifération des cellules carcinomateuses proviendraient de composants des cellules stromales (Hanahan and Weinberg, 2000). De même, la présence de cellules inflammatoires attirées sur le site tumoral peut permettre également la croissance des cellules tumorales. Dans le cadre d'une thérapie antitumorale, ce paramètre est à considérer afin d'agir non seulement sur la cellule tumorale elle-même mais également sur son microenvironnement (stratégie anti-angiogénique par exemple).

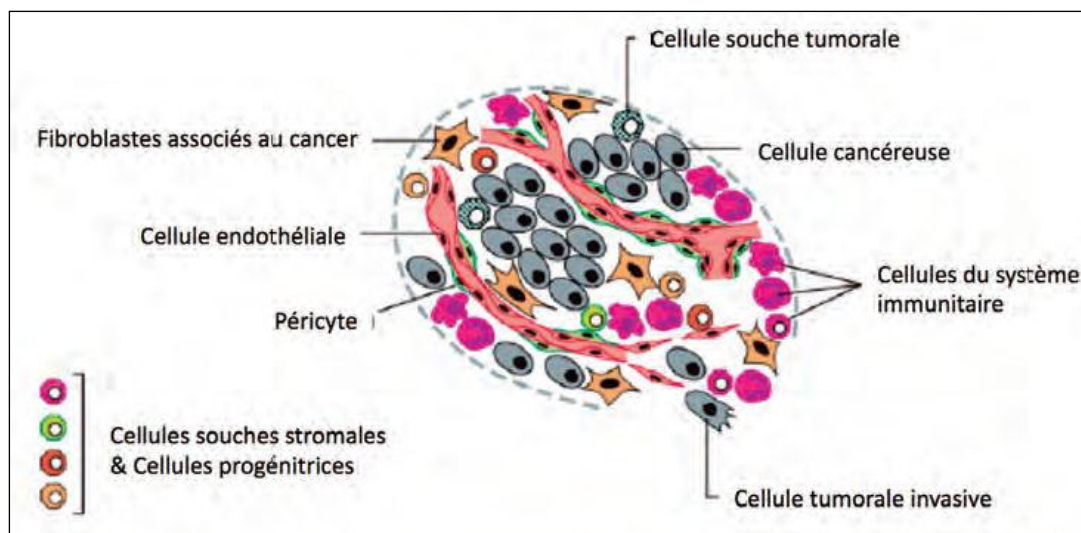


Figure 5 : Rôle du microenvironnement dans la tumorigénèse et la progression tumorale. Collection : Rapports sur les avancées, ouvrage collectif édité par la fondation ARC pour la recherche sur le cancer et l'INCa, Boulogne-Billancourt, avril 2013. www.fondation-arc.org. Reprinted from (Hanahan and Weinberg, 2011).

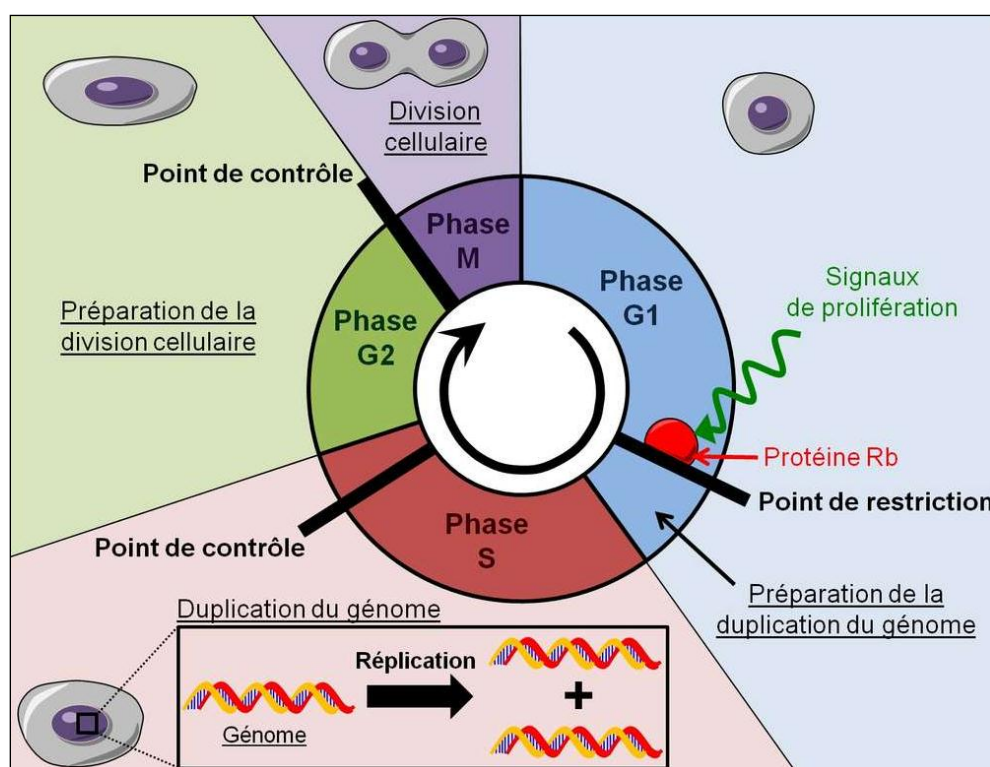


Figure 6 : Le cycle cellulaire. Durant la phase G₁, les signaux de prolifération désactivent la protéine Rb ce qui permet de lever le point de restriction du cycle cellulaire. La cellule entre en phase S où elle duplique son génome. Ensuite elle entre en phase G₂ où elle se prépare à se diviser et enfin elle termine son cycle cellulaire par la phase M qui correspond à la division cellulaire.

<http://www.futura-sciences.com/sante/dossiers/medecine-cancer-mecanismes-biologiques-1453/page/6/>

I.1.2.2. Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs

Les gènes impliqués dans la carcinogenèse sont habituellement classés en deux familles :

✓ *Les oncogènes :*

Stimulés lors de la transformation maligne, ils codent pour des facteurs qui entraînent la perte du contrôle de la croissance cellulaire. Leur expression est dominante, la présence d'un seul exemplaire de l'oncogène suffit à l'expression du phénotype altéré de son produit.

Ces oncogènes comprennent, entre autres, les oncogènes qui codent pour des facteurs de croissance ou leur récepteur, des protéines kinases cytoplasmiques, des facteurs de transcription, des protéines inductrices de l'apoptose ou encore les protéines impliquées dans les processus de réparation de l'ADN.

✓ *Les gènes suppresseurs de tumeurs :*

Ces gènes sont à l'inverse réprimés lors de la transformation maligne. Leur expression étant récessive, les deux exemplaires du gène normal doivent alors être perdus ou mutés pour que disparaisse le rôle protecteur. Le plus connu de ces gènes est le suppresseur de tumeur p53 qui est altéré dans 50% des cancers (Figure 7) (Hontaas, 2014).

Les modifications de l'expression de ces gènes ou de l'activité de leur produit peuvent résulter de modifications génétiques, à savoir d'une lésion directe du gène considéré suite à une mutation, une translocation, un réarrangement chromosomique, une délétion, une amplification génique ou une perte ou un gain de chromosome entier. Elles peuvent également provenir de mécanismes épigénétiques, tels que les modifications de la chromatine (acétylation des histones) ou la méthylation des promoteurs (inhibition de la transcription) (Garanger, 2005).

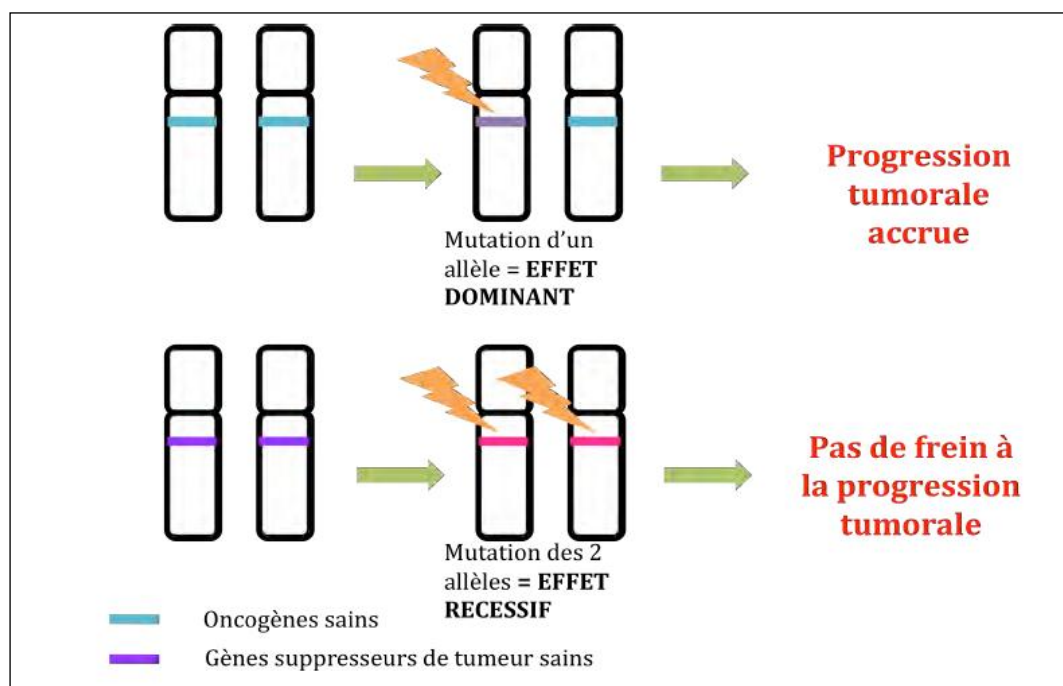


Figure 7 : Les mutations sur les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs et leurs effets sur la cancérogenèse. Les mutations sont favorables au développement tumoral (Hontaas, 2014).

I.1.2.3. L'épigénétique

L'épigénétique regroupe les mécanismes de la cellule qui modifient l'expression des gènes sans affecter l'information génétique qu'ils portent. Le taux d'expression d'un gène définit le taux de synthèse de la protéine codée par ce gène. La protéine établit la fonction du gène dans la cellule. Par conséquent, plus un gène est exprimé, plus sa protéine est produite et plus l'action du gène est forte dans la cellule.

Des dérégulations épigénétiques très complexes d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs participent essentiellement à la progression tumorale. Les modifications épigénétiques qui favorisent la progression tumorale augmentent l'expression des oncogènes (on parle de surexpression) alors qu'elles diminuent voire éteignent l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs (on parle de répression).

Les mutations génétiques et les dérégulations épigénétiques sont les deux types d'événements cellulaires qui font progresser l'oncogenèse (figure 8) (Ségala, 2012).

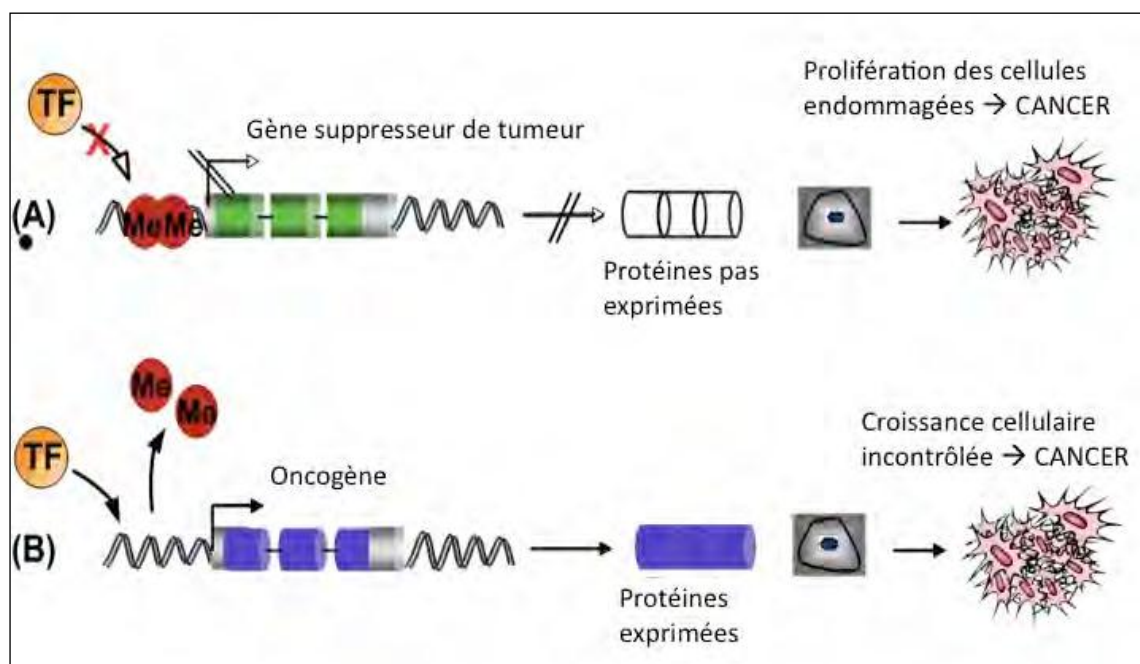


Figure 8 : Deux mécanismes possibles par lesquels l'épigénétique peut conduire au cancer (Nelson, 2008). (A) Effet de la méthylation d'un gène suppresseur de tumeur (B) Effet de la déméthylation d'un oncogène. Dans les deux cas il s'en suit une croissance incontrôlée des cellules qui conduit à la formation d'un cancer. (Nelson, 2008)

I.1.2.4. La voie NF- κ B, le processus inflammatoire et le cancer

L'inflammation est un processus naturel de l'immunité innée, déclenché en réponse à des agressions externes ou internes. Le mécanisme inflammatoire induit l'activation de cellules du système immunitaire (granulocytes, lymphocytes et monocytes) ainsi que la sécrétion et la libération d'agents responsables de l'inflammation (cytokines, histamine,...) (Gaascht, 2013).

Le lien entre l'inflammation et le cancer a été soupçonné pour la première fois en 1863 par Rudolf Virchow quand il remarqua que les tumeurs étaient souvent localisées au niveau de sites d'inflammation chronique et qu'il détecta la présence de cellules inflammatoires au niveau des néoplasmes. Cette hypothèse a été confirmée par des études épidémiologiques qui ont révélé que l'inflammation chronique prédispose au cancer et qu'au moins 15% des cas de cancers sont liés au processus inflammatoire. Le facteur NF- κ B a été décrit comme étant un élément-clé liant l'inflammation et le cancer (Karin, 2006). Dans des conditions physiologiques normales, l'activation de la voie NF- κ B dans les cellules inflammatoires se produit en réponse à un stimulus par des agents infectieux et induit la synthèse de produits tels des facteurs de croissance (VEGF, IL-8), de régulateur du cycle cellulaire (c-myc, cycline D1) ou de protéines régulatrices de l'apoptose (IAP, Bcl-2) ou de l'adhésion cellulaire (ICAM (*Inter-Cellular Adhesion Molecule*), MMP (*Matrix Metalloprotease*)) qui sont nécessaires à la réparation des tissus lésés.

Cette stimulation provoque également l'expression de facteurs auto-stimulants (TNF- α , NF-kB1, NF-kB2) qui, dans le cas de cancer ou de cellules saines exposées à des carcinogènes, peuvent sur-activer la voie NF-kB et contribuer ainsi à la progression tumorale. Par ailleurs, la présence de cellules immunitaires saines au niveau du néoplasme peut contribuer à la progression de la maladie par la sécrétion de cytokines et par la production d'espèces réactives de l'oxygène qui sont de puissants agents mutagènes (Hanahan and Weinberg, 2000 et 2011).

Enfin, des mutations touchant les différents gènes impliqués dans la voie de signalisation NF-kB canonique et non-canonique peuvent mener à une dérégulation de l'expression des gènes cibles et à la cancérogénèse (Keats et al., 2007).

Ainsi, du fait de son implication directe ou indirecte dans le processus de cancérogénèse, la voie NF-kB apparaît comme une cible de premier choix pour la découverte de nouvelles substances anti-cancéreuses (Gaascht, 2013).

I.1.2.5. Implication du microenvironnement et de l'inflammation

Le cancer ne se résume pas à la prolifération incontrôlée des cellules ni aux diverses anomalies génétiques qui les caractérisent. Il est désormais admis que le microenvironnement qui entoure les cellules cancéreuses joue un rôle tout aussi important dans le développement de la maladie.

Le microenvironnement regroupe les cellules saines et génétiquement stables qui entourent les cellules cancéreuses et participent au développement de la cancérogénèse. Dans un premier temps, les cellules cancéreuses vont sécréter des facteurs inflammatoires pour attirer les cellules saines. Ensuite, l'environnement inflammatoire va stimuler les mécanismes de la cancérogénèse tels que la prolifération, l'angiogenèse ou l'infiltration par les cellules de l'immunité. Ainsi, des cellules endothéliales, des macrophages, des plaquettes, des fibroblastes ou encore des cellules de l'immunité vont jouer un rôle très important. Les cellules cancéreuses vont utiliser les propriétés de ces différentes cellules et les mettre à profit pour se développer, disséminer dans l'organisme, s'implanter dans de nouveaux organes et former une nouvelle tumeur. Les cellules endothéliales vont permettre la vascularisation de la tumeur, indispensable à la nutrition des cellules. Les macrophages vont favoriser la survie et la prolifération des cellules. Les fibroblastes vont participer à l'implantation des cellules cancéreuses au niveau du site métastatique et les cellules immunitaires vont aider les cellules cancéreuses à échapper au système immunitaire (figure 9) (Ségala, 2012).

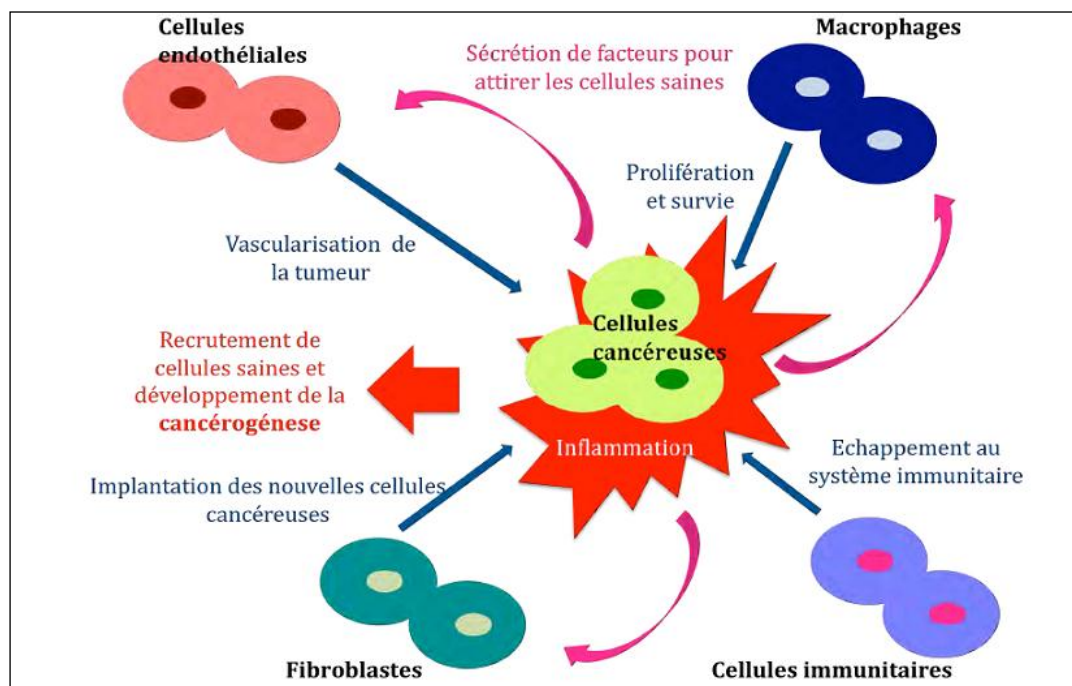


Figure 9 : Implication du microenvironnement et de l'inflammation dans le développement de la cancérogénèse. Les cellules cancéreuses interagissent avec les cellules saines qui les entourent (Ségala, 2012).

I.1.2.6. Cancer et angiogénèse

La cellule tumorale, isolée dans un environnement prolifératif peu vascularisé, doit obligatoirement induire une néo-angiogénèse locale pour survivre. En effet, toute cellule vivante au sein d'un tissu doit théoriquement se situer à moins de 100 μm d'un capillaire sanguin afin d'assurer son apport en oxygène et en nutriments par le système vasculaire. Les implants attirent de nouveaux capillaires qui colonisent la masse tumorale. En empêchant physiquement les néo-capillaires d'atteindre la tumeur, celle-ci ne peut se développer au-delà de 0,4 mm de diamètre. D'autres études ont confirmé ce résultat en montrant qu'en absence d'un accès à un système vasculaire adéquat, les cellules tumorales entraînent en nécrose ou en apoptose. Une angiogénèse active est essentielle pour une multiplication des cellules tumorales. Celles-ci ont la capacité d'induire un basculement pro-angiogénique précoce (angiogenic switch) qui est l'une des caractéristiques phénotypiques de la cellule tumorale particulièrement visible dans les stades pré-néoplasiques (Pepper, 1997). Les bases de ce phénomène ont été largement étudiées dans des modèles de souris transgéniques et dans des lignées tumorales humaines. Ces études ont permis de découvrir les mécanismes intervenant dans la balance angiogénique. Elles ont notamment démontré que la régulation de la balance angiogénique était un processus discret, finement régulé, dictant le caractère tumoral, invasif et métastatique du néoplasme (Pepper, 1997).

Les tumeurs, pour se développer, doivent déplacer l'équilibre de la balance angiogénique en leur faveur. Ce phénomène passe par l'altération de gènes suppresseurs de tumeur comme p53 ou d'oncogènes comme Myc (Ngo et al., 2000). La conséquence de ces mutations induit la surexpression par les cellules tumorales de molécules angiogéniques comme les gènes VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) ou FGF (*fibroblast growth factor*), alors que parallèlement l'expression d'inhibiteurs tels que TSP-1 (*thrombospondine-1*) ou l'interféron bêta est inhibée. Un autre niveau de régulation est réalisé par les protéases qui contrôlent la biodisponibilité cellulaire des facteurs angiogéniques et angiostatiques. Ainsi, de nombreuses protéases peuvent libérer le bFGF (*basic fibroblast growth factor*) emmagasiné dans la matrice extracellulaire alors que la plasmine peut être clivée pour donner naissance à l'angiostatine (Gately et al., 1997).

Plus ou moins tardivement pendant le développement de la plupart des tumeurs humaines, des cellules néoplasiques s'évadent de la tumeur primaire, envahissent les tissus avoisinants, et se frayent un chemin vers des organes distants afin d'y fonder de nouveaux foyers tumoraux. Ces développements métastatiques sont aujourd'hui responsables de 90 % des décès dus au cancer (Sporn, 1996). Au sein de l'organe colonisé, les métastases néoformées apparaissent comme un amalgame de cellules normales et tumorales aux propriétés similaires à celles de la tumeur primaire (Figures 10 et 11).

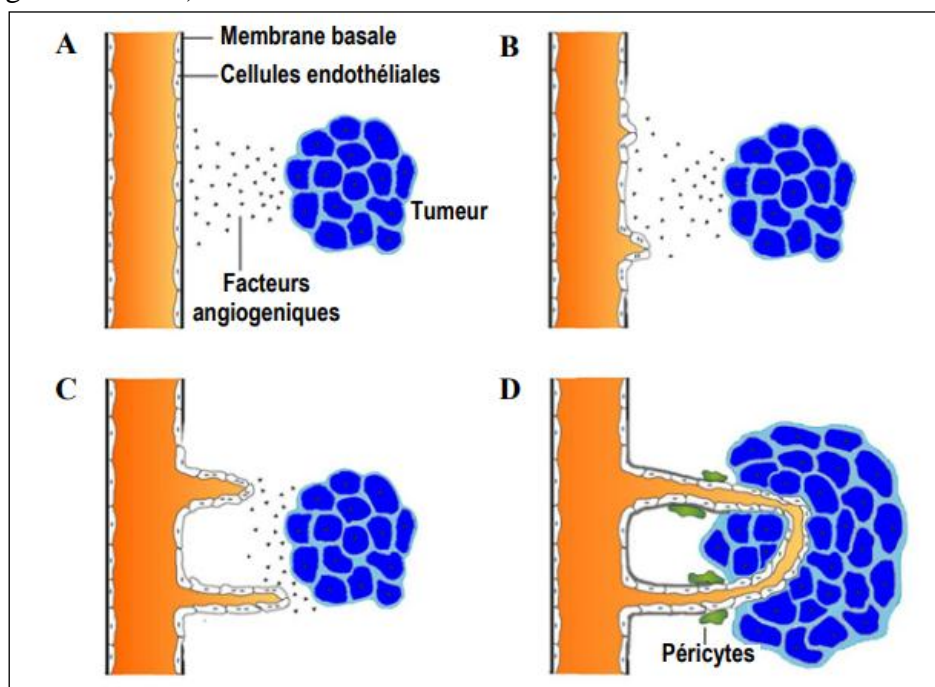


Figure 10 : Illustration des principales étapes de la formation des vaisseaux sanguins tumoraux. A/ Emission des facteurs pro-angiogéniques et activation des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins proximaux, B/ Dégradation de la membrane basale du vaisseau par les enzymes protéolytiques, C/ Migration orientée et prolifération des cellules endothéliales en direction de la source du stimulus angiogénique, D/ Consolidation des microvaisseaux formés par régénération de la membrane basale (Garanger, 2005).

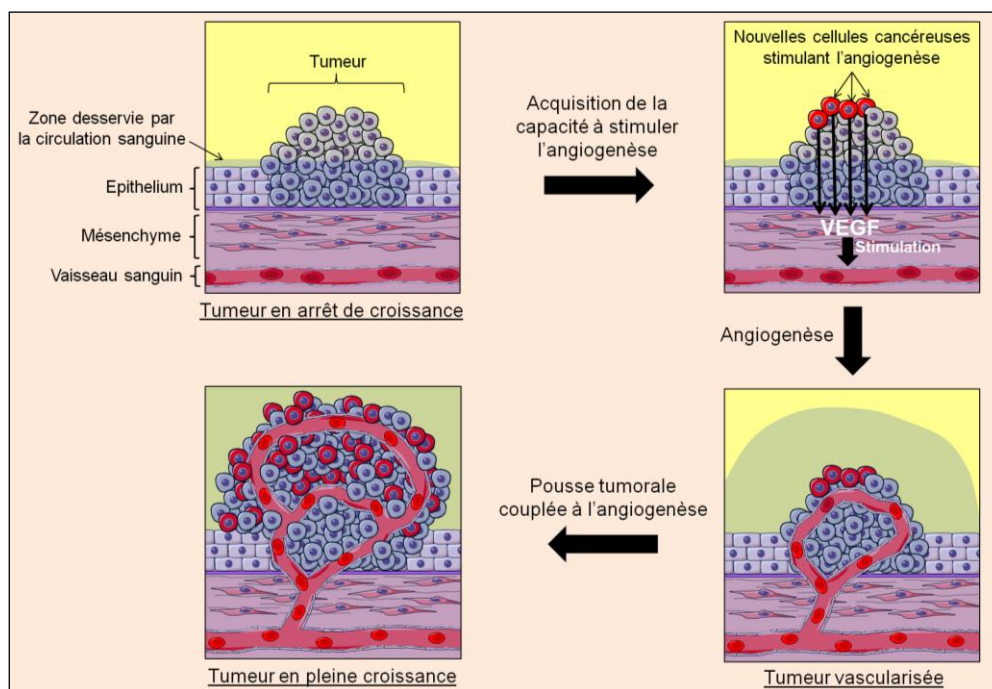


Figure 11 : L'angiogenèse tumorale. La pousse tumorale provoque l'éloignement des cellules cancéreuses de la circulation sanguine ce qui finit par freiner voire stopper la croissance tumorale. Si des cellules cancéreuses parviennent à stimuler l'angiogenèse, un réseau vasculaire tumoral se forme. Cela permet à la tumeur de reprendre sa croissance qui est désormais couplée à l'angiogenèse (Ségala, 2012).

I.1.2.7. Progression tumorale et apoptose

La capacité des cellules tumorales à se multiplier n'est pas uniquement déterminée par leur taux de prolifération mais également par le taux d'usure cellulaire (Kiessling et al., 1999). La mort programmée ou apoptose représente un élément important dans la génération de cette usure. Le phénomène d'apoptose est induit par un grand nombre de paramètres physiologiques et suit des étapes similaires dans toutes les cellules (endommagement de l'ADN, activation d'un oncogène, insuffisance en facteurs de survie ou encore une situation d'hypoxie). Les interactions avec la matrice cellulaire et les contacts cellule-cellule régulent également l'apoptose. En effet, la rupture de ces contacts induit l'apoptose (Kiessling et al., 1999). La machinerie apoptotique peut se diviser en deux classes de molécules, les cibles et les effecteurs (Kiessling et al., 1999):

- les molécules cibles ou sentinelles, permettant la surveillance cellulaire, comportent par exemple des récepteurs de surface, comme le couple IGF1/IGF2 et IGF1/récepteur ou également l'IL-3 et son récepteur, qui se lient aux facteurs de survie ou de mort cellulaire ;
- les molécules effectrices permettent d'induire la mort cellulaire par apoptose, majoritairement par l'intermédiaire des couples de molécules Fas/Fas-ligand et TNF- α /TNF-récepteur-1. Les membres de la famille Bcl-2 peuvent également avoir une

activité pro-apoptotique (Bcl-XS, Bax, Bak, Bid et Bik) ou anti-apoptotique (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W et Mcl-1) en modulant la mort mitochondriale et la libération de cytochrome C. La protéine p53 est aussi inductrice d'apoptose puisqu'elle peut augmenter l'expression de Bax (Kiessling et al., 1999). Enfin, une autre famille d'effecteurs de l'apoptose est constituée de protéases intracellulaires nommées caspases, activables par Fas ou par le cytochrome C (Thornberry et al., 1998).

Les premiers travaux montrant un rôle de l'apoptose dans le développement tumoral remontent au début des années 1970 (Kiessling et al., 1999). L'acquisition d'une résistance à l'apoptose fait partie du phénotype de la majorité des cellules tumorales et peut être la conséquence de mécanismes différents (Kiessling et al., 1999). La découverte de l'oncogène Bcl-2, surexprimé dans les lymphomes folliculaires, est une des premières études rapportant les propriétés anti-apoptotiques d'un oncogène. La co-expression de Bcl-2 et de l'oncogène myc induit la formation de lymphomes B en augmentant la survie des lymphocytes. L'expression d'un analogue du récepteur pour la molécule FasL, dans une grande proportion de cancer du poumon et du côlon, permet également de désensibiliser la tumeur à une apoptose médiée par Fas. La mutation de régulateurs pro-apoptotique (gène p53 suppressif de tumeur, muté dans plus de 50 % des tumeurs humaines) fait également partie des mécanismes de désensibilisation tumorale à l'apoptose. Cette altération résulte dans l'inactivation de la protéine p53 qui est très importante dans la surveillance des processus pro-apoptotiques (Harris, 1996).

Il paraît évident que l'élaboration d'un traitement efficace du cancer réside dans l'identification des spécificités de chaque type de cellule tumorale. En effet, même si les dix propriétés décrites précédemment, par Hanahan et Weinberg, sont essentielles à la cancérogenèse, elles peuvent intervenir plus ou moins précocement ou dans une séquence différente au cours du processus tumoral. Il est donc essentiel, pour chaque type tumoral, d'identifier la séquence précise d'événements mutagéniques conduisant au cancer afin de cibler plus spécifiquement certains stades du processus. Cela passe par une connaissance accrue des liens alléliques et géniques conduisant au dérèglement génique. Les récentes avancées en termes de connaissance du génome humain permettent de dresser une carte des gènes prédisposés à ces événements et ouvrent la voie au diagnostic et au traitement de plus en plus précoce du cancer (Li et al., 2017).

I.1.2.8. Dérégulation du métabolisme énergétique

En présence d'oxygène, les tissus non prolifératifs métabolisent d'abord le glucose en pyruvate via la glycolyse et ensuite achèvent l'oxydation du pyruvate en CO₂ dans la mitochondrie durant la phosphorylation oxydative, également appelée respiration. L'oxygène est essentiel au cours de cette réaction pour que le glucose soit complètement oxydé. Lorsque l'oxygène est manquant, les cellules peuvent rediriger le pyruvate généré par la glycolyse en dehors de la phosphorylation oxydative mitochondriale pour former de l'acide lactique (glycolyse anaérobie ou fermentation). Cette génération d'acide lactique autorise la poursuite de la glycolyse mais produit très peu d'ATP comparée à la phosphorylation oxydative. En 1924, Otto Warburg avait observé que les cellules cancéreuses avaient tendance à convertir plus de glucose en lactate alors même que l'oxygène était présent. C'est ce qui est appelé l'effet Warburg ou encore glycolyse aérobie. Cette propriété est partagée avec les tissus prolifératifs normaux. Néanmoins, la glycolyse aérobie est moins efficace que la phosphorylation oxydative pour générer de l'ATP (Ségala, 2012; Vander Heiden et al., 2009). Pour compenser le mauvais rendement énergétique de l'effet Warburg, les cellules cancéreuses augmentent considérablement les entrées de glucose. Cette dérégulation métabolique leur est doublement profitable dans le sens où elles utilisent les produits intermédiaires de la glycolyse aérobie pour produire des acides nucléiques afin d'assurer la duplication de leur génome, mais aussi des acides aminés indispensables à la synthèse protéique. La cellule cancéreuse trouve là un autre moyen de se multiplier encore plus vite (figure 12) (Ségala, 2012).

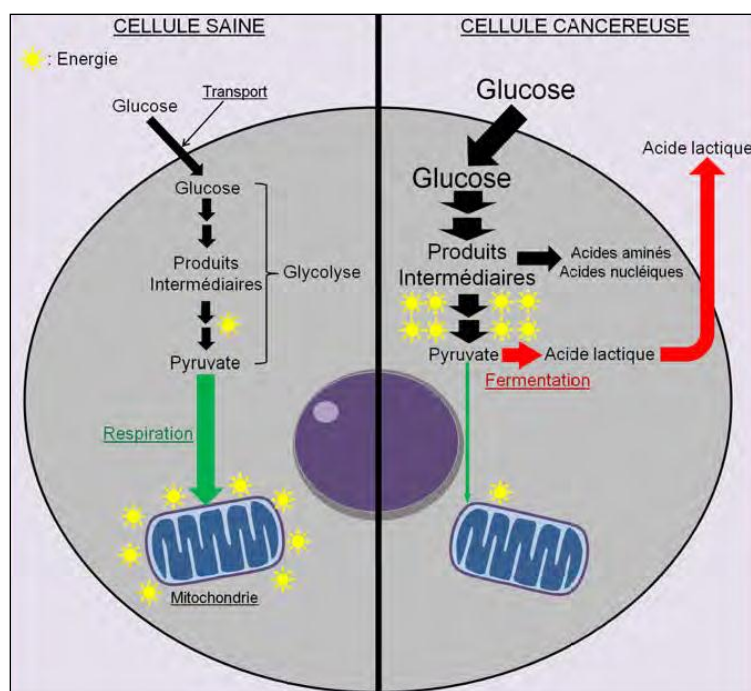


Figure 12 : Dérégulation du métabolisme énergétique (Ségala, 2012). La cellule cancéreuse fait entrer de grandes quantités de glucose pour produire suffisamment d'énergie et utilise les intermédiaires réactionnels pour assurer sa prolifération.

I.1.2.9. Immunité et cancer

Le système immunitaire est capable d'identifier des antigènes. Ce sont des structures libres ou demeurant à la surface de chaque cellule et présentées aux lymphocytes T par des cellules présentatrices des antigènes grâce au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ces antigènes sont reconnus par le récepteur des lymphocytes T (TCR). Dans le cas d'une cellule cancéreuse les antigènes proviennent de l'expression de gènes mutés. Ils présentent donc des modifications par rapport aux antigènes du soi et sont reconnus comme étrangers par les lymphocytes effecteurs (figure 13) (Ségala, 2012).

Cependant, la cellule cancéreuse peut échapper au système immunitaire et parvenir à circuler au milieu des cellules effectrices de l'immunité sans engendrer de réaction contre elle. Une première solution pour elle est de ne plus exprimer le complexe majeur d'histocompatibilité, essentiel à la présentation des antigènes de surface aux lymphocytes effecteurs. Une autre possibilité pour elle est de ne pas être suffisamment immunogène, autrement dit elle ne présente pas d'antigène du non soi pour activer le système immunitaire. Ceci est possible car plusieurs populations cellulaires cancéreuses cohabitent, elles ne sont pas toutes identiques et présentent des caractéristiques différentes. Parmi elles se trouvent des cellules exprimant des antigènes du

soi leur permettant d'échapper à la défense immunitaire. Enfin, la cellule peut créer autour d'elle un microenvironnement immunosuppresseur qui lui sera favorable. Elle pourra se développer au sein de cet environnement sans qu'il soit infiltré par les cellules effectrices d'autant plus qu'elle va pouvoir recruter d'autres cellules effectrices telles que les macrophages ou les lymphocytes régulateurs qui vont inhiber les défenses immunitaires dirigées contre la tumeur (figure 14) (Ségala, 2012).

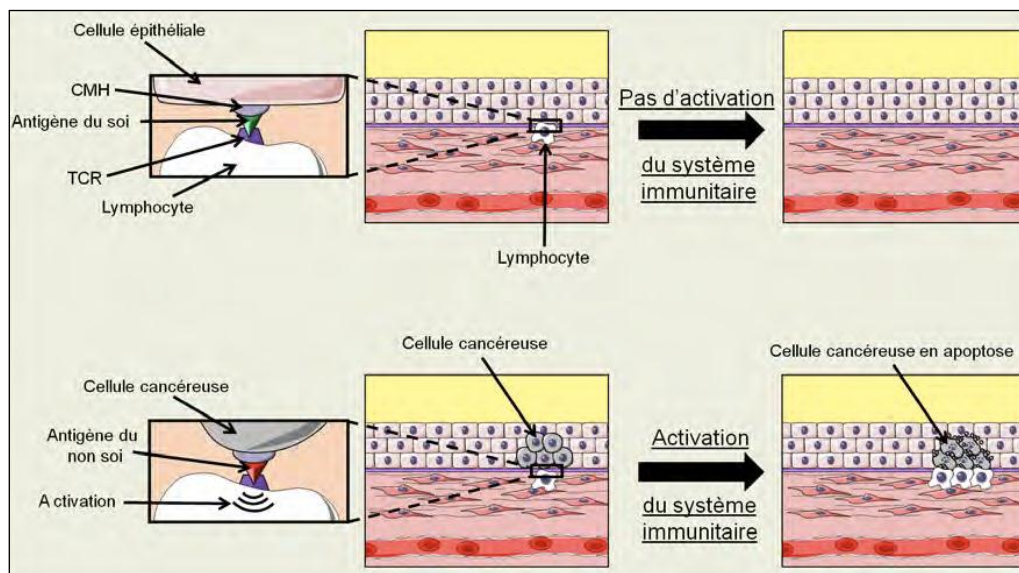


Figure 13 : La surveillance du système immunitaire (Ségala, 2012). Les effecteurs de l'immunité reconnaissent les antigènes du non soi et activent le système immunitaire pour les éliminer.

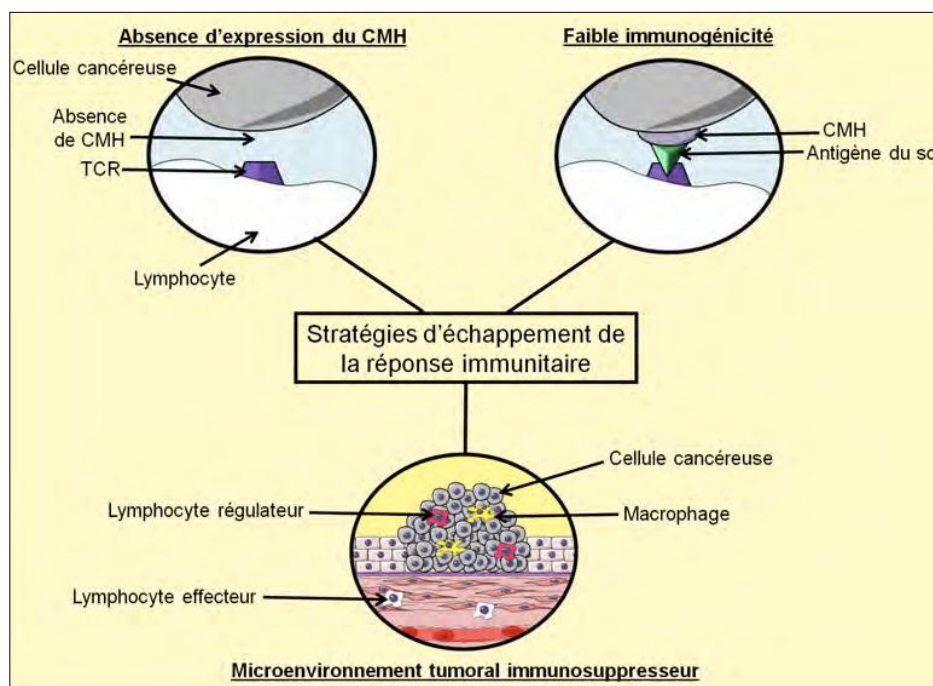


Figure 14 : Stratégies d'échappement au système immunitaire par la cellule cancéreuse (Ségala, 2012). La cellule cancéreuse utilise 3 stratégies différentes pour survivre et ne pas déclencher le système immunitaire.

I.1.2.10. Infections impliquées dans la genèse du cancer

Des données expérimentales et biologiques indiquent qu'une grande variété d'agents infectieux est responsable de nombreux cas de cancer dans le monde. Même si l'implication directe de certaines infections virales est bien établie, celle des bactéries (*Chlamydia*, *Helicobacter*, bactéries anaérobies) reste encore méconnue et suscite plus d'intérêt (Aoki, 2003). La bactérie nommée *Helicobacter pylori*, par exemple, est connue pour provoquer des gastrites chroniques susceptibles d'évoluer en cancer de l'estomac (Axon, 2007). Parallèlement, au moins cinq virus ont été impliqués dans les maladies cancéreuses. Le Virus d'Epstein Barr, par exemple, est associé à la maladie de Burkitt, à certains cancers du naso-pharynx et à certaines variétés de lymphomes (maladies de Hodgkin) (Leenman, 2007). Les virus des hépatites B et C quant à eux, ont été associés au cancer primitif du foie (Bhandari et al., 2007). D'autre part, l'infection par le virus du Sida est associée à une augmentation du risque de sarcome de Kaposi et de lymphome malin non Hodgkinien (Leenman, 2007). Les virus HTLV 1 et 2 (*Human T leukemia Virus*) sont connus pour déclencher des leucémies, alors que les papillomavirus des types 16, 18, 31 et 33 sont associés à des tumeurs malignes, notamment le cancer du col de l'utérus associé dans 90 % des cas à un papillomavirus (Thomison et al., 2008). Ce dernier est considéré comme la seconde cause de cancer chez la femme dans le monde. Dans certains cas, des infections parasitaires peuvent causer un cancer. La bilharziose, par exemple, qui est due à l'infection par *Schistosoma haematobium* (Khurana et al., 2005) des eaux de l'Afrique de l'Est est un facteur de risque pour le cancer épidermoïde de la vessie (King, 2006). Les virus peuvent agir par leur intégration possible dans le génome cellulaire. Le processus tumoral commence alors lorsque le pathogène cause des modifications aberrantes de l'ADN ou suite à la production de protéines interagissant avec les protéines de contrôle de la multiplication cellulaire (exemple des papillomavirus produisant des protéines détruisant la protéine p53). Les virus peuvent également apporter des oncogènes dans leurs acides nucléiques. De plus, Il est admis que l'excès d'immunosuppression causé par des infections virales augmente le risque de cancer (cas du virus de l'immunodéficience humaine VIH) (Akanmu, 2006; Bettaieb, 2009).

I.1.3. Epidémiologie du cancer à travers le monde et au Maroc

Sur la base des données du Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC), agence spécialisée sur le cancer de l'organisation mondiale de la santé, les cancers figurent parmi les principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde. Les estimations pour l'année 2012 comptent approximativement 14 millions de nouveaux cas (Ferlay et al. 2013).

Les nouveaux chiffres publiés en 2018 montrent que 8,8 millions de personnes meurent chaque année d'un cancer (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/>), contre 8,2 millions de décès survenus en 2012 et 7,6 millions en 2008. Le nombre de nouveaux cas devrait augmenter de 70% environ au cours des deux prochaines décennies. Près d'un décès sur 6 dans le monde est dû au cancer. En 2017, 26% seulement des pays à faible revenu déclaraient disposer de services de pathologie généralement offerts par le secteur public. Moins de 30% des pays à faible revenu déclaraient disposer de services de traitement, alors que la proportion pour les pays à revenu élevé dépassait 90% (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/>).

Les cancers les plus fréquemment diagnostiqués dans le monde sont ceux du poumon (1,8 million de cas, soit 13% du total), du sein (1,7 million de cas, soit 11,9% du total) et le cancer colorectal (1,4 million de cas, soit 9,7% du total). Les causes les plus fréquentes de décès par cancer étaient les cancers du poumon (1,6 million de décès, soit 19,4% du total), du foie (0,8 million de décès, soit 9,1% du total) et de l'estomac (0,7 million de décès, soit 8,8% du total). Les projections anticipent une augmentation substantielle d'environ 20 millions de nouveaux cas de cancer par an d'ici à 2025 en raison de la croissance démographique et du vieillissement de la population mondiale (CIRC, 2012).

Chez l'homme, les cancers les plus fréquents sont surtout les cancers du poumon, dont l'incidence dépasse le million de nouveaux cas par an, suivis de ceux de la prostate, du colorectal, de l'estomac, du foie, de l'oesophage puis de la vessie, dont les incidences cumulées sont supérieures à trois millions de nouveaux cas par an (Ferlay et al., 2013). Le cancer du sein représente actuellement un cancer sur quatre chez les femmes dans les pays en voie de développement. Il est aussi l'une des principales causes de décès par cancer dans les pays du Maghreb, du sud de l'Afrique, en Chine ou encore dans les pays d'Amérique latine (Sasco, 2008). Il est aujourd'hui urgent, pour mieux lutter contre ce cancer, de développer des approches efficaces et abordables pour la détection précoce, le diagnostic et le traitement chez les femmes vivant dans les pays les moins développés du monde.

Le cancer du col utérin est le quatrième cancer le plus fréquent chez les femmes dans le monde, après les cancers du sein, du colo-rectum et du poumon, notamment dans les pays à faibles ressources de l'Afrique subsaharienne. Il est également la quatrième cause la plus fréquente de décès par cancer chez les femmes dans le monde. En effet, près de 70% du fardeau mondial pèse sur les régions à faible développement, l'Inde héberge plus d'un

cinquième de tous les nouveaux cas diagnostiqués. Le cancer du col, qui affecte les femmes dans leur jeunesse, peut avoir des effets catastrophiques avec un coût humain, social et économique très élevé. Des outils de dépistage peu coûteux et de faible technicité existent aujourd'hui, qui pourraient réduire sensiblement le fardeau des décès par cancer du col dans les pays les moins développés (IARC, 1013; Bray et al., 2013).

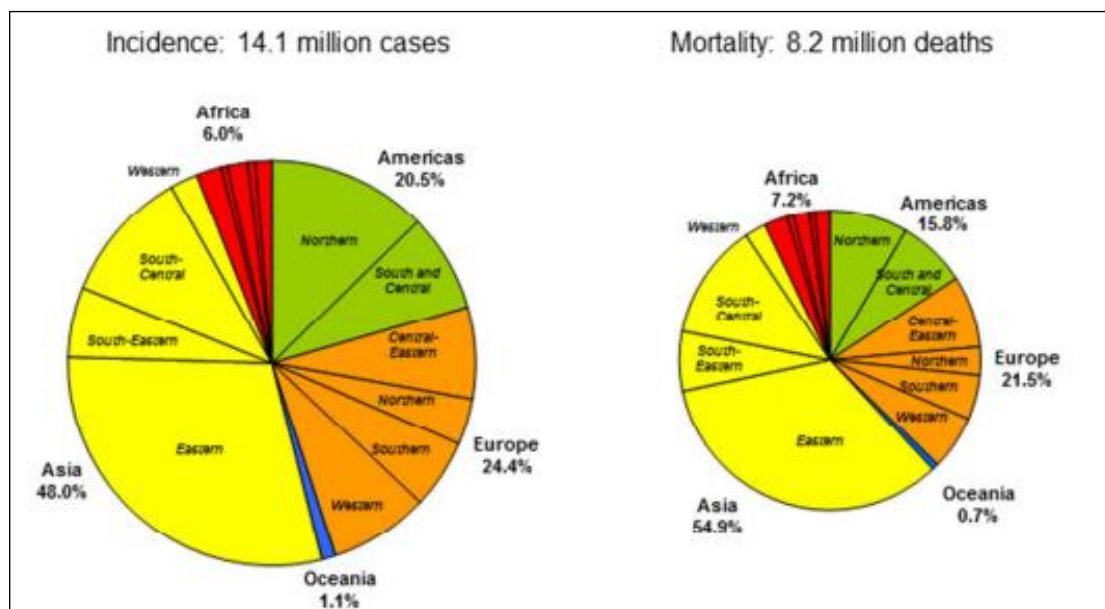


Figure 15 : Estimation mondiale du nombre de nouveaux cas et de décès par cancers avec des proportions par régions du globe, les deux sexes sont combinés, 2012. La superficie de la maladie est proportionnelle au nombre de nouveaux cas ou de décès (Ferlay et al., 2015).

Environ un tiers des décès par cancer sont dus aux cinq principaux facteurs de risque comportementaux et alimentaires : un indice élevé de masse corporelle, une faible consommation de fruits et de légumes, le manque d'exercice physique, le tabagisme et la consommation d'alcool. Le tabagisme, à lui seul, est le facteur de risque le plus important du cancer. Il est responsable d'environ 22% du total des décès dus au cancer (GBD, 2016). Certaines infections chroniques qui touchent particulièrement les pays à revenu faible ou intermédiaire sont également des facteurs de risque de cancer. Environ 15% des cas de cancer diagnostiqués en 2012 étaient imputables à des infections cancérogènes, provoquées notamment par *Helicobacter pylori*, le papillomavirus humain (HPV), le virus de l'hépatite B, le virus de l'hépatite C et le virus d'Epstein Barr (Plummer et al., 2016). L'impact économique croissant du cancer est considérable. On a estimé en 2010 à quelque 1160 milliards de dollars américains le coût annuel total de la maladie (Stewart et al., 2014).

Au Maroc, le cancer constitue un problème majeur de santé publique. D'après les données du Registre des Cancers de la Région du grand Casablanca (RCRC), l'incidence annuelle nationale du cancer est estimée à 115,4 pour 100 000 habitants (RCRC, 2016). Cette incidence, correspondrait à un nombre entre 30 000 et 40 000 nouveaux cas de cancer chaque année, selon la fondation Lalla Salma de lutte contre le cancer. Le nombre de cas de cancers notifiés pour la période 2008 - 2012 était légèrement plus élevé chez le sexe féminin avec un total de 13 394 contre 10 838 chez le sexe masculin (RCRC, 2016).

La localisation la plus fréquente, en considérant les deux sexes, était le cancer du sein qui occupait le premier rang et représentait 20% des cas enregistrés entre 2008 et 2012. Le cancer du poumon occupait le deuxième rang avec une proportion de 11,4 % des cas, suivi du cancer colorectal avec une proportion de 6,7% des cas (RCRC, 2016). La localisation du cancer la plus fréquente chez le sexe masculin était le poumon. Il représentait 23% des cas enregistrés, suivi par celui de la prostate avec une proportion de 12,6% et du cancer colorectal au troisième rang avec 7,9% des cas. La localisation la plus fréquente du cancer chez le sexe féminin était le cancer du sein avec une proportion de 35,8% des cas enregistrés durant la même période. Le cancer du col de l'utérus occupait le deuxième rang avec une proportion de 11,2% des cas, suivi par celui de la thyroïde puis du colo-rectum avec respectivement des proportions de 8,6% et de 5,9% (RCRC, 2016).

Selon l'organisation mondiale de la santé, 30% des décès par cancers sont directement liés à un mauvais mode de vie et à un environnement pollué. Ainsi, avoir une alimentation équilibrée et riche en fruits et légumes, pratiquer une activité physique régulière, vivre dans un environnement sain et bannir le tabac et l'alcool de son mode de vie, sont des facteurs qui diminuent le risque de développer un cancer (Malvezzi et al., 2013).

I.2. De la chimiothérapie classique à la thérapie ciblée

Introduction

De nos jours un nouveau cadre nosologique s'ouvre vers une reclassification des cancers, qui dépasse celle d'une maladie d'organe mais des anomalies spécifiques biologiques expliquant que nous ne soyons plus en présence « du » mais « des » cancers, comme c'est le cas dans les cancers du sein. Les moyens thérapeutiques disponibles ont connu un essor important ces dernières années grâce aux progrès enregistrés sur la connaissance de la maladie. Ces moyens thérapeutiques sont la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie, la greffe

de moelle osseuse ou de cellules souches et plus récemment les thérapeutiques ciblées sont le plus souvent associés en fonction des types de cancers. Malheureusement le coût de ces thérapies est très onéreux. La multiplication de ces armes thérapeutiques a naturellement amené à se poser la question de la stratégie thérapeutique utilisant ces différentes approches et notamment leur importance et leur positionnement pour l'obtention d'une guérison ou d'un allongement du nombre d'années de vie gagnées sur la maladie. Les techniques chirurgicales permettaient d'assurer à elles seules la guérison de nombreux patients en situation non métastatique. Tout traitement systémique visant à réduire le risque de récurrence est appelé adjuvant et tout traitement systémique utilisé avant la chirurgie est ainsi dénommé néoadjuvant (Gligorov, 2012).

Allant de pair avec l'évolution des stratégies thérapeutiques, la meilleure compréhension de l'intérêt des traitements et notamment des chimiothérapies, passe non seulement par la compréhension des mécanismes d'action mais encore plus par celle des mécanismes de résistance. Dans ce dernier cas deux approches complémentaires existent :

- ❖ L'une portant sur la compréhension des mécanismes de résistance liés à la cellule cancéreuse elle-même et témoignant soit de l'hétérogénéité tumorale initiale soit de son adaptabilité par une pression de sélection liée à l'exposition aux différents traitements.
- ❖ L'autre portant sur la compréhension des mécanismes de résistance liés à l'hôte et plus particulièrement au devenir du médicament anticancéreux entre le moment où il est administré et celui où il atteint sa cible (Gligorov, 2012).

Si le terme de chimiothérapie correspond à l'usage de certaines substances chimiques pour traiter une maladie, nous retiendrons son sens courant actuel correspondant à l'utilisation de certains traitements chimiques « non ciblés » du cancer.

Toutefois il est également nécessaire de préciser qu'au sens courant de ce terme, la chimiothérapie correspond en effet à l'ensemble des substances chimiques cytotoxiques ayant une action antimitotique que ce soit sur les cellules cancéreuses ou les cellules normales. Cette définition sous-entend donc un mécanisme d'action peu sélectif et une action non spécifique expliquant en général les toxicités et les nombreux effets secondaires de ces agents sur les cellules normales à temps de doublement rapide. Ce qui doit motiver la recherche et le développement de nouvelles molécules afin de proposer des thérapies beaucoup plus spécifiques des maladies cancéreuses.

On peut diviser les médicaments anticancéreux en :

- **Agents cytotoxiques** qui induisent une mortalité cellulaire par action directe ou indirecte sur l'acide désoxyribonucléique (ADN), l'acide ribonucléique (ARN) ou des protéines nécessaires à la division cellulaire.
- **Modulateurs de la réponse biologique** qui (1) affectent les capacités de défense de l'hôte (interleukine-2, interféron- α), (2) agissent sur le contrôle hormonal de la tumeur (hormonothérapie) ou (3) contrôlent l'appareil de signalisation de la cellule (anticorps monoclonaux dirigés contre des récepteurs et bloqueurs des tyrosines kinases) (Monassier, 2012).

Thérapeutique anticancéreuse

La mise en œuvre d'un traitement anti-cancéreux exige impérativement un diagnostic anatomo-pathologique préalable affirmant la malignité et précisant le type histologique de la tumeur. L'objectif de ce traitement est l'élimination de la tumeur ainsi que la prévention de l'apparition d'autres tumeurs localisées ou métastatiques. D'une façon générale, On distingue deux méthodes de traitements du cancer : Les méthodes classiques et les méthodes alternatives.

A. Méthodes classiques

A.1. Chirurgie

La chirurgie consiste en l'ablation de la tumeur. Généralement c'est le premier traitement auquel les oncologues ont recours lorsque le cancer est localisé à un endroit précis du corps. Cette opération chirurgicale consiste à enlever la quasi-totalité des cellules cancéreuses. Son but est de permettre de soulager les symptômes et de réduire les risques de propagation métastatique chez le patient (Auckland, 2008). L'intervention est souvent associée à un autre traitement, comme la radiothérapie ou la chimiothérapie. Un des inconvénients de la chirurgie est la douleur. De plus, cette technique est moins appropriée lorsque le cancer devient invasif. En effet, le procédé chirurgical localisé ne permet pas la suppression des cellules cancéreuses qui auraient accédé à d'autres organes sous la forme de métastases. De même, le risque d'infection peut être élevé chez des patients à système immunitaire fragile.

Plusieurs types de chirurgie se distinguent en cancérologie et chacune peut intervenir à un moment donné au cours de l'évolution de la maladie.

A.2. Radiothérapie

La radiothérapie est un traitement loco régional du cancer qui utilise les rayonnements ionisants. Elle concerne pratiquement près d'un patient sur deux. Cette technique consiste à exposer les cellules cancéreuses d'une tumeur à des radiations tout en préservant, autant que possible, les tissus sains et les organes avoisinants. Elle peut être utilisée seule, ou en association avec la chirurgie, soit en pré-opératoire, mais le plus souvent en postopératoire. La radiothérapie s'applique à la fois sur la tumeur primitive et sur les territoires ganglionnaires (Meyer et al., 2007). Les rayons ionisants utilisés sont principalement des rayons X, des électrons produits par des accélérateurs linéaires ou, dans une moindre mesure, des rayons gamma générés par le cobalt. La radiothérapie agit en ionisant les acides nucléiques (ADN et ARN) des cellules. À de fortes concentrations, les radiations fragilisent le contenu des cellules traitées et entraînent une altération des chromosomes de façon à bloquer le mécanisme de multiplication des cellules irradiées et à provoquer leur destruction. La radiothérapie peut être curative et participe à la guérison de 40% des cancers, elle peut être aussi palliative afin de diminuer les douleurs ou les symptômes du cancer. Lorsqu'elle est utilisée en pré-opératoire, elle permet de diminuer la taille d'une tumeur tandis qu'en post opératoire, la radiothérapie est utilisée pour détruire les cellules cancéreuses qui ont pu rester après l'intervention. La radiothérapie peut être pratiquée selon trois techniques : la radiothérapie transcutanée externe, la radiothérapie interne ou curiethérapie et la radiothérapie métabolique.

A.3. Hormonothérapie

Les hormones, sont des substances chimiques produites par les glandes et secrétées dans la circulation sanguine. Elles provoquent des effets dans certains tissus bien ciblés de l'organisme. L'hormonothérapie est souvent utilisée pour traiter plusieurs types de cancers dont le développement est stimulé par ces hormones. Ces cancers sont alors qualifiés d'hormono-dépendants. L'hormonothérapie est un traitement qui ajoute, bloque ou enlève des hormones afin de ralentir ou de faire cesser la croissance de cellules cancéreuses hormono-dépendantes (Descôteaux, 2013). Elle permet ainsi d'empêcher le développement de ces tumeurs. Les principales hormones responsables de la croissance tumorale sont les hormones de croissance, les hormones sexuelles, les hormones thyroïdiennes et d'autres molécules endogènes. Les cancers du sein, de la prostate et de l'endomètre sont les principaux cancers concernés par ce type de traitement.

La libération des hormones est sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire. L'hypothalamus libère de façon pulsatile la Gn-RH (hormone de libération des gonadotrophines) qui va induire la sécrétion par la partie antérieure de l'hypophyse les hormones FSH (Follicle Stimulating Hormone) et LH (Luteinizing Hormone). Ces deux hormones vont entraîner la libération des hormones sexuelles par les gonades : la testostérone chez les hommes et les œstrogènes chez la femme.

A.4. Chimiothérapie

Paul Ehrlich et son disciple Sahachiro Hata découvrit, en 1908, l'arsphénamine, un composé d'arsenic initialement utilisé pour traiter la syphilis et la trypanosomiase. Mais c'est à la fin de la seconde guerre mondiale que débute l'histoire de la chimiothérapie actuelle et son évaluation puis son utilisation clinique, d'abord en hématologie puis pour le traitement des tumeurs solides et notamment le cancer du sein (Hajdu, 2005).

La chimiothérapie peut être administrée seule ou combinée à d'autres traitements, soit locorégionaux (chirurgie, radiothérapie) soit généraux (pharmacologie, immunothérapie, hormonothérapie, traitements adjuvants) pour lutter contre le cancer (Chauvergne et Hoerni, 2001). La combinaison du cisplatine avec le paclitaxel est souvent utilisée dans le traitement du cancer du col de l'utérus et du cancer de l'ovaire. Le cisplatine est un alkylant qui agit au niveau de l'ADN, et induit l'apoptose. Le paclitaxel est une molécule qui agit par inhibition de la dépolymérisation de la tubuline et bloque durant l'anaphase la séparation des chromosomes. Les modes d'action de ces deux médicaments étant différents et donc sans compétition pour leurs cibles respectives, c'est pour cette raison que les taxanes et les composés du platine sont souvent utilisés en chimiothérapie anticancéreuse combinée (Doherty et al., 2014).

A.4.1. Types de chimiothérapie

La chimiothérapie consiste en l'administration de substances chimiques, cytotoxiques dans le but d'arrêter ou de ralentir l'évolution de la multiplication des cellules tumorales, ainsi que pour limiter ou prévenir la formation des métastases. La chimiothérapie est également utilisée pour réduire la taille d'une tumeur trop volumineuse et faciliter ainsi son traitement par la chirurgie (Chabner and Roberts, 2005). Les médicaments anticancéreux sont maintenant prescrits systématiquement dès la prise en charge du patient. Souvent, ils sont prescrits en association avec la radiothérapie ou la chirurgie. Selon le niveau respectif auquel ils interviennent, ils sont

classés en : les antimétabolites, les alkylants, les antibiotiques anticancéreux et les antimitotiques (Chabner and Roberts, 2005).

A.4.1.1. La chimiothérapie curative

Elle est l'objectif de tout traitement anticancéreux, mais, c'est en hématologie qu'elle constitue la seule option. Dans ce cadre, des combinaisons de produits sont employées pour permettre une induction de rémission complète suivie d'une intensification et enfin d'une phase d'entretien. On peut ainsi obtenir des guérisons dans les leucémies aiguës lymphoblastiques ou la maladie de Hodgkin (Monassier, 2012).

A.4.1.2. La chimiothérapie complémentaire d'un autre traitement

Dans la majorité des cancers, en particulier solides, la chirurgie et la radiothérapie constituent la pierre angulaire d'un traitement qui se voit complété par la chimiothérapie. On dit que la chimiothérapie est adjuvante quand elle intervient après le traitement radiochirurgical. Elle a pour objectifs de traiter des micrométastases ou de compléter une exérèse incomplète. Au contraire, la chimiothérapie néo-adjuvante survient avant le traitement locorégional du cancer. Cette stratégie s'adresse à la cure, aussi précoce que possible, de métastases dont on sait qu'elles sont quasiment toujours présentes au moment du diagnostic et pour lesquelles l'ablation de la tumeur primitive n'aura que peu d'impact. Elle est aussi effectuée pour réduire la masse tumorale en préopératoire pour en faciliter l'exérèse (Monassier, 2012).

A.4.1.3. La chimiothérapie palliative

Malheureusement l'état d'avancement de la maladie au moment de son diagnostic ou la constatation d'une récurrence importante rendent impossible l'espoir d'une thérapeutique radicale. Dans ces cas, la chimiothérapie peut encore largement avoir sa place ; a fortiori depuis l'avènement de médicaments administrables chroniquement par voie orale au prix d'effets indésirables acceptables. Ici, on va chercher à ce que la chimiothérapie permette un gain significatif de la survie, de la qualité de la vie et d'obtenir une amélioration fonctionnelle (reprise de l'alimentation, diminution de la douleur, diminution des signes de compression tumorale,...) et du confort du patient (Monassier, 2012).

A.4.2. Mode d'action des médicaments anticancéreux

A.4.2.1. Médicaments agissant sur la biosynthèse des bases azotées (Antimétabolites)

Les antimétabolites sont des analogues des bases ou des métabolites qui entrent dans la constitution des acides nucléiques en inhibant leur synthèse par antagonismes compétitifs (Lechat et al., 1982; Actualités pharmaceutiques, Mai 2010). Ils sont classés selon les substances respectives avec lesquelles ils interfèrent (Chabner et Roberts 2005).

Parmi les antimétabolites, nous pouvons citer les exemples suivants :

- ✓ **Antifoliques** : Méthotrexate Methotrexate® ; Raltitrexed Tumodex®.
- ✓ **Antiprimidiques** : Cytarabine Aracytine® ; 5 fluoro uracile Fluoro-uracile® ; Capécitabine Xeloda® ; gemcitabine Gemzar®.
- ✓ **Antipuriques** : 6 mercaptopurine Purinéthol® ; 6 thioguanine Lanvis® ; Cladribine Leustatine® ; Fludarabine Fludara® ; Pentostatine Nipent®.
- ✓ **Divers** : Hydroxyurée Hydréa®.

Zoom sur le méthotrexate : C'est un analogue structural de l'acide folique qui inhibe les processus métaboliques dépendants des folates. C'est un cytostatique sélectif de la phase S de la réplication cellulaire qui est actif sur les cellules à prolifération rapide : cellules cancéreuses, cellules normales de l'épithélium digestif et de la moelle osseuse.

Il agit principalement en inhibant la dihydrofolate réductase (DHFR), la thymidylate synthétase (TS) ainsi que la 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide (AICAR) et la glycinamide ribonucléotide (GAR) transformylase (AICARTF, GARTF), perturbant ainsi la synthèse *de novo* des purines et de la thymidine (Blasco, 2008).

Le méthotrexate est indiqué en cancérologie dans : Leucémie aiguë lymphoblastique (LAL), cancers ORL et bronchopulmonaires à petites cellules, adénocarcinomes mammaires et ovariens, sarcome des os, lymphomes malins non hodgkiniens...etc.

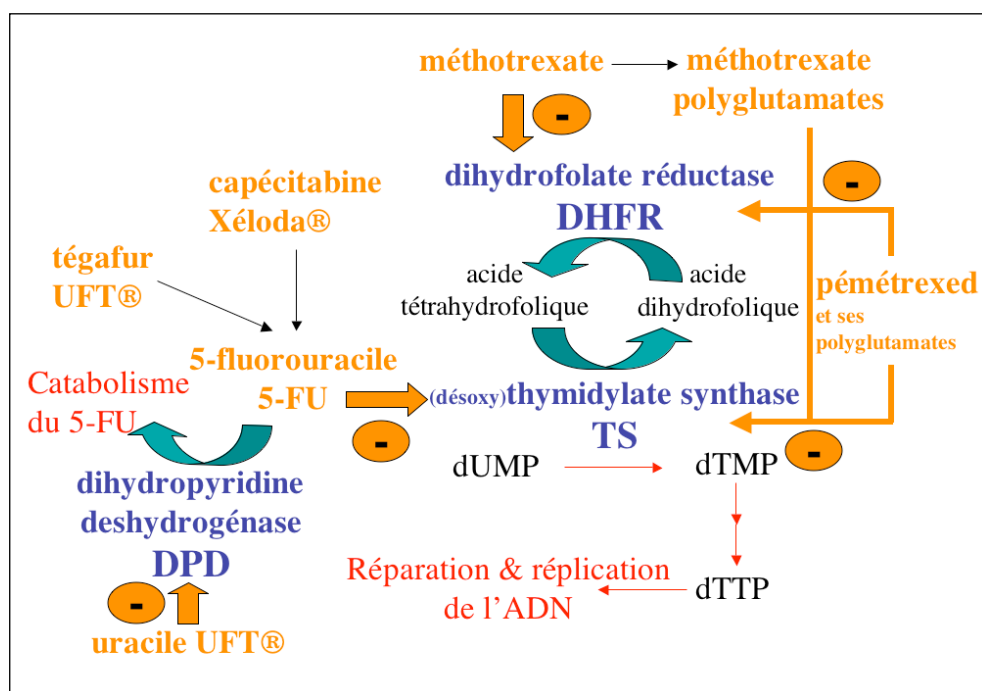


Figure 16 : Mécanisme d'action des inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique (les antifoliques) (Monassier, 2012).

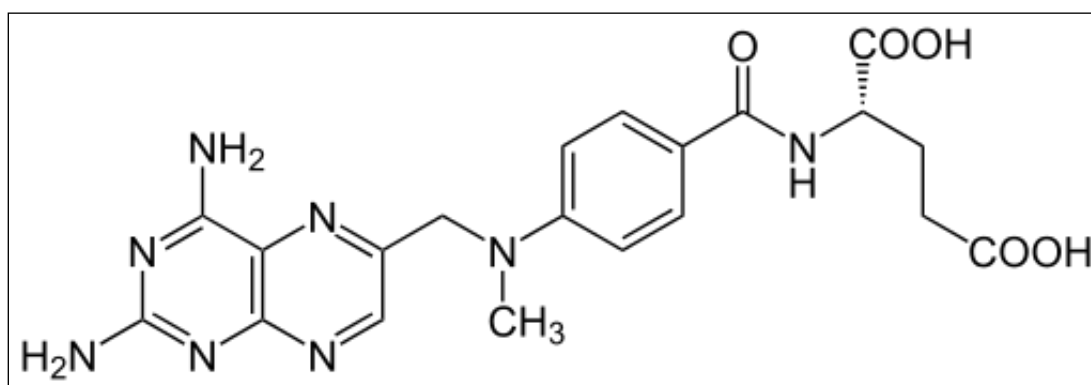


Figure 17 : Formule chimique du méthotrexate.

A.4.2.2. Médicaments agissant sur les bases azotées déjà existantes.

A.4.2.2.1. Les agents alkylants

Les alkylants agissent directement sur l'ADN en l'endommageant et empêchent les cellules de se multiplier. Ce sont des molécules qui agissent au niveau de toutes les phases du cycle cellulaire. Les alkylants sont des agents capables de remplacer un proton d'une molécule par un groupement alkyle. Les substrats biologiques de l'alkylation sont l'eau, les groupes thiols, les hydroxyles, les carboxyles, les ions phosphates et les amines. Cependant, seule l'alkylation des bases hétérocycliques des acides nucléiques semble intervenir dans leur activité cytotoxique (Schorderet and Dayer, 1992).

Les agents alkylants sont divisés en différentes catégories, nous y distinguons :

- ✓ **Les moutardes à l'azote :** Chlorambucil Chloraminophène® ; Cyclophosphamide Endoxan® ; Ifosfamide Holoxan® ; Melphalan Alkèran®, Chlorméthine Caryolysine® ; Estramustine Estracyt®.
- ✓ **Nitrosourées :** Fotémustine Muphoran®, Lomustine Blélustine®, Carmustine Bicnu®, Streptozocine Zanosar®.
- ✓ **Organoplatine :** Cisplatine Cisplatyl® ; Oxaliplatine Eloxatine® ; Carboplatine Paraplatine®.

Les organoplatines sont parfois classés avec des agents alkylants parce qu'ils présentent un mécanisme d'action similaire et tuent donc les cellules de la même manière. Ces médicaments sont moins susceptibles que les agents alkylants de causer la leucémie comme résultat de leurs effets secondaires (Lacave et al., 2005).

- ✓ **Ethylène-imines :** Thiotépa Thiotépa® ; Altrétamine Hexastat®.
- ✓ **Triazènes :** Procarbazine Natulan® ; Dacarbazine Déticène® ; Témazolomide Temodal®.
- ✓ **Esters sulfoniques :** Busulfan Myleran® ; Mitomycine C Amétycine®.

A.4.2.2.2. Les agents intercalants

Ces médicaments, appelés aussi antibiotiques anticancéreux, sont des agents capables de se fixer à l'ADN et le modifier en formant des complexes qui empêchent sa transcription. Ainsi la cellule cancéreuse arrête de croître et de se multiplier (Lechat et al., 1982).

- ❖ **Anthracyclines :** sont des antibiotiques anti-tumoraux qui interfèrent avec les enzymes impliquées dans la réplication de l'ADN. Ces médicaments agissent dans toutes les phases du cycle cellulaire. Ils sont largement utilisés en cancérologie.

Les molécules commercialisées sont : Doxorubicine Adriamycine®, Adriblastine® ; Daunorubicine Cérubidine® ; Epirubicine Farmorubicine® ; Idarubicine Zavedos®.

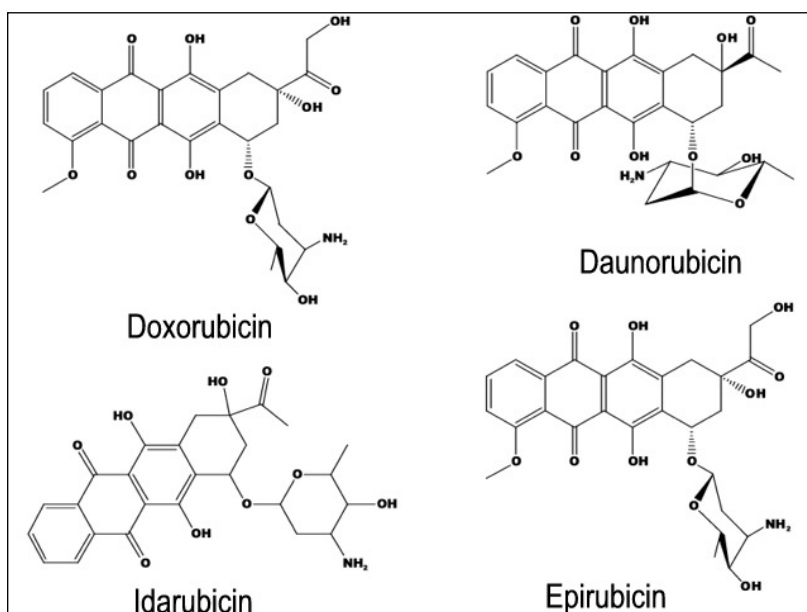


Figure 18 : formules chimiques des anthracyclines (antibiotiques anti-tumoraux).

- ❖ **Dérivés non anthracycliques :** Amsacrine Amsidine® ; Elliptinium Celiptium® ; Mitoxantrone Novantrone®

A.4.2.2.3. Les inhibiteurs des topoisomérases

Les topoisomérases sont des enzymes clés dans les processus de réplication. Elles permettent de couper les brins d'ADN pour les dérouler (ADN gyrase ou topoisomérases II) et d'induire des coupures bicaténares pour séparer les chromosomes avant la mitose (topoisomérases I). Ces deux types de topoisomérases sont ciblées par des anticancéreux (Monassier, 2012). Dans les cellules tumorales, on retrouve un taux beaucoup plus important de topoisomérase I que dans les cellules normales (Hanahan and Weinberg, 2000). Les anti-topoisomérases I inhibent le recollage des deux extrémités d'ADN maintenues ouvertes par la topoisomérase I. Il y a formation d'un complexe au niveau de la fourche de réplication de l'ADN, et un arrêt de la division cellulaire en phase G₂ (Hanahan and Weinberg, 2000). Deux médicaments des inhibiteurs de la topoisomérase I sont actuellement commercialisés : Irinotécan Campto® ; Topotécan Hycamtin®.

La topoisomérase II catalyse la coupure puis le recollage des deux brins d'ADN, pour permettre à un segment de l'ADN de passer à travers un autre, et ainsi à la molécule de s'enrouler de plus en plus. Les anti-topoisomérases II empêchent la séparation de la topoisomérase II et de l'ADN, et créent ainsi des complexes de clivage caractéristiques. On note un arrêt du cycle cellulaire en

G₂, puis des aberrations chromosomiques et la mort cellulaire. Les cellules en G₀ ne possédant que peu de topoisomérases II sont peu sensibles à ces agents (Hanahan and Weinberg, 2000). Les inhibiteurs de la topoisomérase II dérivent de la podophyllotoxine, une substance d'origine naturelle que l'on peut extraire de *Podophyllum peltatum* (plante d'Amérique du nord) mais aussi de la célèbre mandragore (*Mandragora officinarum*). Ils sont nommés épipodophyllotoxines. Les médicaments actuellement commercialisés : Etoposide Vépéside® ; Téniposide Vumon® (Monassier, 2012).

A.4.2.2.4. Les coupeurs ou scindants d'ADN.

Le principal médicament scindant est la bléomycine (bléomycine®). Ce produit est, lui aussi, un antibiotique d'origine naturelle. Elle agit en induisant des coupures monocaténaïres de l'ADN mais tous ses effets ne sont pas connus. Sa toxicité pulmonaire est très fréquente. On peut néanmoins insister ici sur le fait que cette toxicité est potentialisée par l'administration simultanée d'oxygène pur. Celle-ci doit donc être évitée, particulièrement chez les malades ventilés (Monassier, 2012).

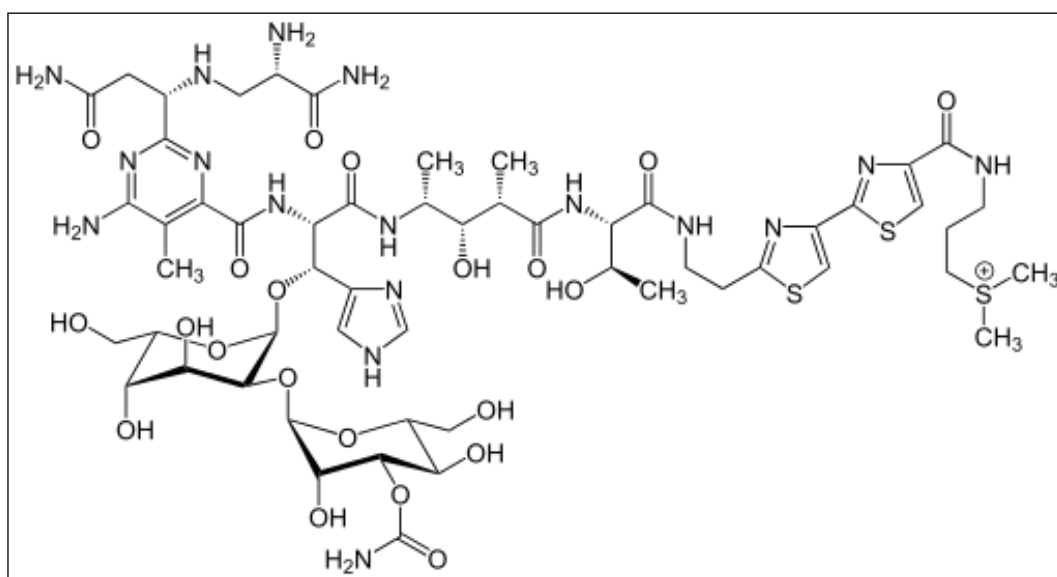


Figure 19 : Formule chimique de la bléomycine.

A.4.2.3. Médicaments agissant sur la mitose.

Les antiméitotiques sont souvent des alcaloïdes d'origine végétale et d'autres produits ayant la capacité de se fixer de manière spécifique sur la tubuline en inhibant sa polymérisation pour former le fuseau. Ainsi, ils bloquent la cellule en une métaphase prolongée, ce qui déclenche

l'apoptose. Les représentants de cette classe sont les vinca-alcaloïdes (vinblastine, vincristine) et les taxanes (paclitaxel, docétaxel) (Lechat et al., 1982; Chabner and Roberts, 2005).

- ❖ **Les alcaloïdes de la pervenche (vinca-alcaloïdes)** (déstabilisants de la tubuline) :
Vinblastine Velbé® ; Vincristine Oncovin® ; Vinorelbine Navelbine® ; Vindésine Eldisine®
- ❖ **Les taxanes de l'If commun ou du Pacifique (*Taxus baccata*, *Taxus brevifolia*)** (stabilisants du fuseau) : Paclitaxel Taxol® ; Docétaxel Taxotère®.

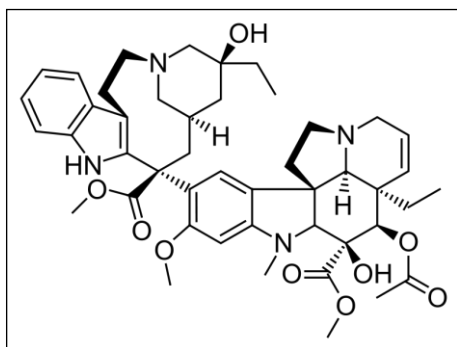


Figure 20 : Formule chimique de vinblastine.

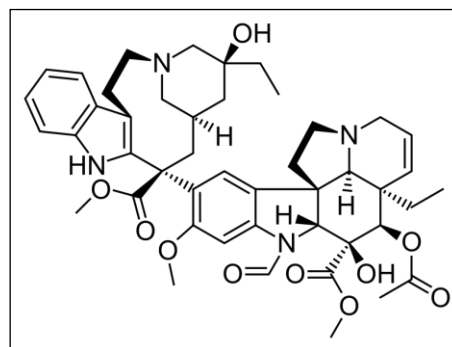


Figure 21 : Formule chimique de vincristine.

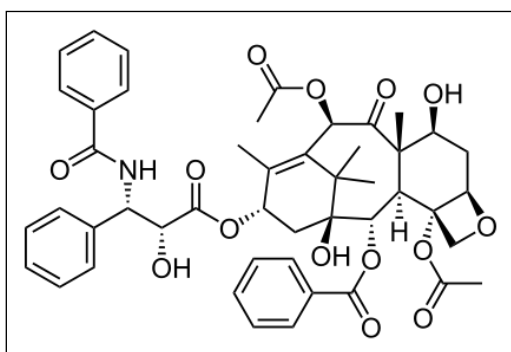


Figure 22 : Formule chimique de paclitaxel.

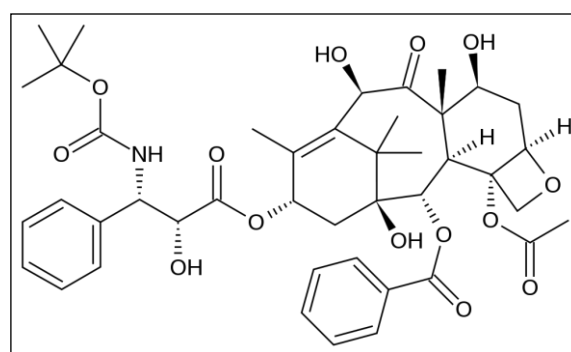


Figure 23 : Formule chimique de docétaxel.

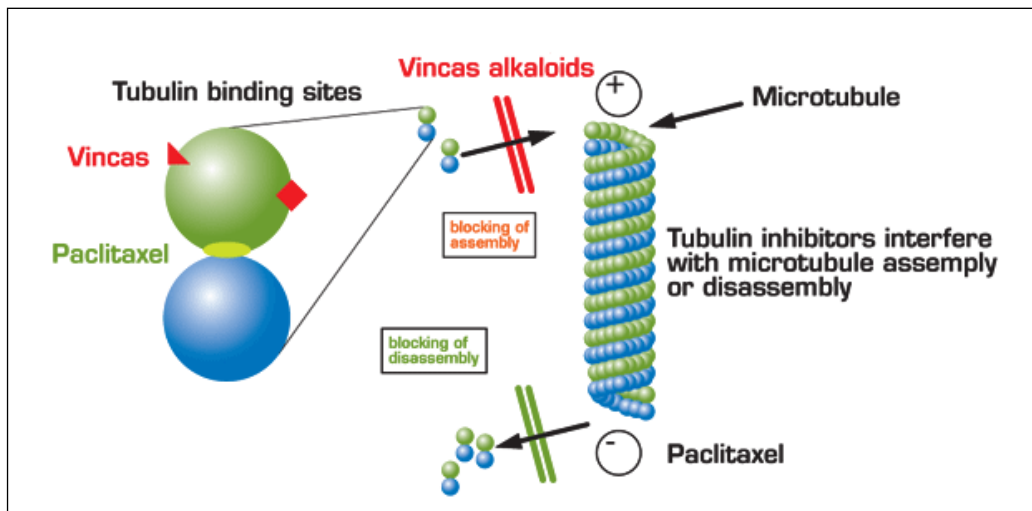


Figure 24 : mécanisme d'action des antimétabolites. Les inhibiteurs des microtubules exercent leurs effets anti-tumoraux en altérant le fuseau pendant la division cellulaire. Les alcaloïdes de la pervenche bloquent la polymérisation alors que les taxanes empêchent la dépolymérisation (Feron, O., Anti-tumoraux, http://www.farm.ucl.ac.be/FARM2129/Feron/11-1_Antitumoraux.pdf).

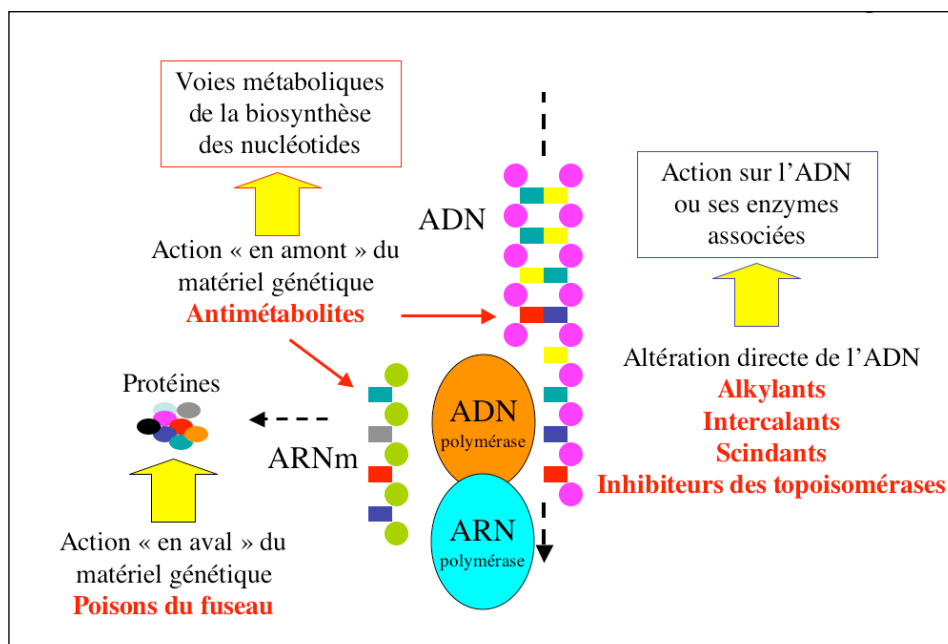


Figure 25 : Sites d'action des médicaments anticancéreux cytotoxiques (Monassier, 2012).

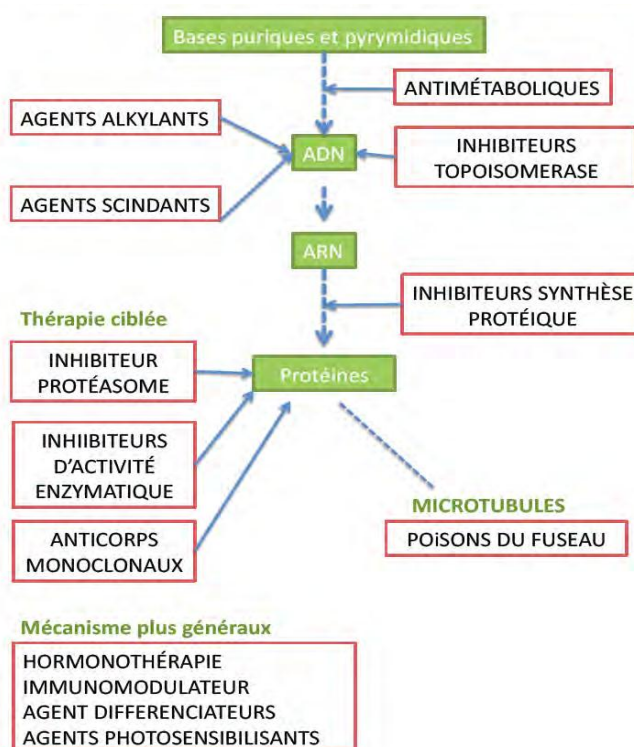


Figure 26 : Cibles cellulaires des différents médicaments anticancéreux (Hontaas, 2014).

B. Traitements alternatifs

B.1. Thérapie ciblée

B.1.1. Introduction

La caractérisation des mécanismes de l'oncogenèse par Hanahan et Weinberg (Hanahan, and Weinberg, 2000) et l'identification des différentes voies de signalisation impliquées dans les processus tumoraux ont conduit à la mise au point des thérapies ciblées. Leur avènement représente une grande avancée dans la prise en charge des patients atteints de cancers. Les recherches pharmacologiques ont permis la mise au point de molécules qui agissent spécifiquement au niveau des cibles cellulaires impliquées dans la croissance tumorale, ce qui limite en apparence, les effets secondaires sur les cellules saines contrairement aux chimiothérapies conventionnelles qui agissent sur l'ensemble du processus cellulaire (Hantraye, 2012).

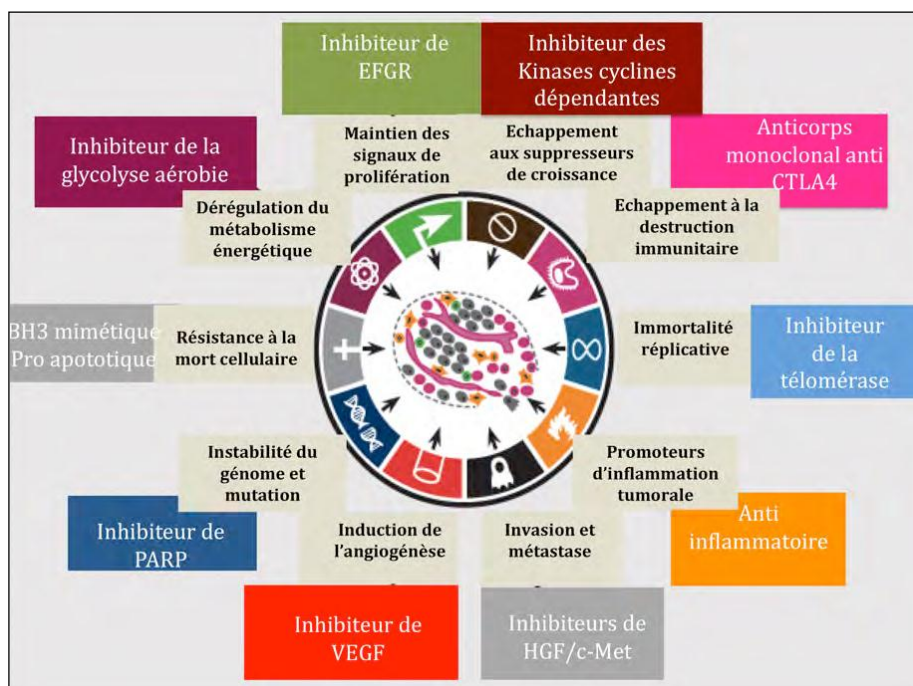


Figure 27 : Les nombreuses approches utilisées dans le développement des médicaments anticancéreux à partir des caractéristiques du cancer connues et émergentes (Hanahan and Weinberg, 2000).

Contrairement à la chimiothérapie conventionnelle, les thérapies ciblées sont dirigées contre des molécules jouant un rôle dans les processus de tumorigenèse (Aissi et al., 2012) (gènes, récepteurs, protéines effectrices). Elles agissent ainsi sur les facteurs de croissance tumoraux et leurs récepteurs soit à l'intérieur de la cellule cancéreuse (petites molécules chimiques, identifiables au suffixe « -nib ») soit à sa surface (anticorps monoclonaux, suffixe « -mab » et protéines de fusion, suffixe « -cept »). Ces thérapies, dont l'objectif est d'inhiber la transduction des signaux intracellulaires de tumorigenèse, sont classées selon leur cible moléculaire, par exemple les protéines kinases, l'EGFR (*epidermal growth factor receptor*) ou encore le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (Aissi et al., 2012; Faure, 2015).

- ❖ **Les inhibiteurs de protéines kinases**, très nombreux, ils empêchent la phosphorylation de protéines cytosoliques ou de récepteurs transmembranaires à activité kinase : crizotinib, céritinib, ruxolitinib, imatinib, bosutinib, ponatinib, vémurafénib et dabrafénib...etc.
- ❖ **Les inhibiteurs de l'EGFR** ont deux mécanismes d'action possibles : inhibition de la phosphorylation du domaine kinase du récepteur (lapatinib, erlotinib, géfitinib) ou de la liaison de ses ligands endogènes (trastuzumab, cétuximab).
- ❖ **Les inhibiteurs du VEGF** empêchent la néo-vascularisation de la tumeur soit en ciblant spécifiquement le VEGF (bévacicumab) ou son récepteur (ramucirumab), soit en agissant

comme un récepteur « leurre » (aflibercept). Certains d'entre eux ciblent également d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase (sunitinib, sorafénib) (Aissi et al., 2012).

B.1.2. Médicaments de la thérapie ciblée

B.1.2.1. Classement selon la nature de la molécule utilisée

On distingue : les anticorps monoclonaux et les inhibiteurs tyrosine-kinase (ITK).

- **Inhibition de la croissance cellulaire par des anticorps monoclonaux (suffixe “mab”)** : Les anticorps monoclonaux sont des grandes molécules produites au laboratoire. Elles interagissent avec les ligands de récepteurs membranaires et se lient au domaine extracellulaire de la cellule cancéreuse. Elles inhibent la croissance tumorale soit directement (par leur activité intrinsèque), soit indirectement en induisant une réponse immunitaire de type ADCC (Anti-body dependant cell-mediated cytotoxicity) ou en activant la cascade du complément.

Tableau 1 : Principaux anticorps monoclonaux et leurs indications (Tulkens, 2006).

Anticorps « mab »	Nom déposé	Antigènes	Cibles	Indications	Remarques
Bévacizumab	Avastin	VEGF (vascular endothelial growth factor)	Cellules endothéliales angiogéniques	Cancers colorectal et mammaire métastasés ; cancers pulmonaire et rénal	Association à une chimiothérapie
Trastuzumab	Herceptin	HER-2 (human epidermal receptor 2)	Cellules tumorales	Cancer du sein métastasé avec surexpression de HER-2 ; cancer de l'estomac	Aussi traitement précoce de certains cancers du sein non métastasés avec surexpression de HER-2
Cétuximab	Erbix (IgG ₁)	EGFR (epidermal growth factor receptor)	Cellules tumorales	Cancer colorectal métastasé et carcinome épidermoïde de la tête et du cou	-
Panitumumab	Vectibix (IgG ₂)				
Alemtuzumab	Mabcampath	CD52	Lymphocytes B et T	Leucémies lymphoïdes chroniques	
Rituximab	Mabthera	CD20	Lymphocytes B	Lymphomes en cas d'échec de chimiothérapie	Aussi dans l'arthrite rhumatoïde résistante aux autres inducteurs de rémission
Ibritumomab tioxetan	Zévalin	CD20	Lymphocytes B	Lymphomes non hodgkiniens chez l'adulte après traitement par le rituximab	
Ipilimumab	Yervoy	CTLA-4 (cytotoxic T- lymphocyte- associated antigen-4)	Lymphocytes T	Mélanome non réséquable ou métastatique	En inhibant CTLA-4, ipilimumab stimule le système immunitaire

Zoom sur Trastuzumab Herceptine® : Mis sur le marché, aux USA en 1998, est le premier anticorps monoclonal à être utilisé contre le cancer du sein. Il est de type IgG dirigé contre le domaine extra membranaire du récepteur du facteur épidermique humain de type 2 (HER-2). Cette protéine est impliquée dans la prolifération tumorale et elle est surexprimée dans 20% à 30% des cancers mammaires primitifs où elle constitue un facteur de mauvais pronostic. Les malades ne peuvent pas être traitées que s'elles présentent une forte expression de la protéine ou la démonstration de l'amplification génique. Le trastuzumab est indiqué dans le cancer du sein métastatique avec surexpression tumorale HER-2 soit en monothérapie de 3^{ème} ligne soit en association avec le paclitaxel chez les patientes ne pouvant être traitées par les anthracyclines (Monassier, 2012).

Zoom sur Rituximab (Mabthéra®) : Le rituximab est un anticorps monoclonal chimérique de type IgG2 dirigé contre l'antigène CD20 exprimé par les prélymphocytes B et les lymphocytes B normaux ou tumoraux. Son introduction a modifié les standards thérapeutiques avec d'abord la démonstration de son intérêt dans les lymphomes folliculaires en rechute ou réfractaire, puis en première ligne, ainsi que dans le traitement d'entretien des lymphomes folliculaires répondant à un traitement de rattrapage par chimiothérapie seule ou associée au rituximab. Une revue de la littérature publiée en 2007 à partir de l'analyse de 23 essais randomisés rapporte les effets bénéfiques du rituximab sur la survie globale et la survie sans progression dans différentes indications telles que les lymphomes indolents et agressifs en association à une chimiothérapie ou en traitement d'entretien. Une autre revue récente rapporte une amélioration du taux de réponse et de la survie chez les patients traités pour lymphome folliculaire et diffus à grandes cellules depuis l'instauration du rituximab en association à une chimiothérapie standard. Son principal effet secondaire est le risque de syndrome de lyse tumoral chez les patients avec une grosse tumeur (lié au relargage de cytokines) (Blasco, 2008).

- **Inhibition de la croissance cellulaire par des inhibiteurs tyrosine-kinase (ITK) (suffixe « ib ») :** Ce sont de petites molécules qui inhibent au niveau intracellulaire l'activité de tyrosine kinase des récepteurs aux facteurs de croissance. Elles empêchent ainsi la transduction du signal et l'activité proliférative. Par conséquent, la signalisation cellulaire en aval est interrompue, rétablissant ainsi le contrôle de la prolifération de la survie cellulaire. Dans les tumeurs solides, les inhibiteurs de tyrosine kinase induisent également une inhibition de l'angiogenèse et de la diffusion métastatique.

Tableau 2 : Principaux inhibiteurs de la tyrosine kinase et leurs indications (Tulkens, P.M., 2006).

Inhibiteurs la de tyrosine-kinase (ITK) « inib »	Nom déposé	Antigènes	Indications
Lapatinib	Tyverb	HER-1 (human epidermal receptor 1), HER-2 (human epidermal receptor 2)	cancer du sein métastatique
Géfitinib	Iressa	EGFR (epidermal growth factor receptor)	Cancer bronchique non à petites cellules métastatique
Erlotinib	Tarceva	EGFR (epidermal growth factor receptor)	Cancer bronchique non à petites cellules métastatique, cancer du pancréas
Sunitinib	Sutent	VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGFR (platelet-derived growth factor receptor)	Cancer du rein métastatique, tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST)
Sorafénib	Nexavar	VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor), PDGFR (platelet-derived growth factor receptor)	Carcinome hépatocellulaire avancé, cancer du rein métastatique
Imatinib	Glivec	Bcr/abl c-Kit (récepteur du stemcell factor), PDGFR (platelet-derived growth factor receptor)	Leucémies, syndromes myéloprolifératifs, tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST)

B.1.2.2. Classement selon le mode d'action de la molécule utilisée

On distingue :

➤ Les anti-angiogéniques

Les anti-angiogéniques bloquent l'angiogenèse tumorale en agissant sur le VEGF ou ses récepteurs. Ces médicaments peuvent être des anticorps monoclonaux dirigés contre le VEGF ou contre le VEGFR, ou des inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant le VEGFR (Tamburini, 2015).

Tableau 3 : Exemples de molécules anti-angiogéniques et leurs indications (Tamburini, 2015).

Type	Nom déposé	Antigènes	Indications
Anticorps monoclonal humanisé (Bevacizumab)	Avastin	VEGF	Cancers sein, rein, poumon, colorectal
Inhibiteurs de la tyrosine kinase (Sorafénid)	Nexavar	VEGFR	Carcinome hépatocellulaire avancé, cancer rein métastatique
Inhibiteurs de la tyrosine kinase (Vandétanib)	Zactima, Caprelsa	VEGFR-2	Cancers médullaires de la thyroïde et du poumon

➤ **Les inhibiteurs de HER (*Human Epidermal Growth factor Receptor*)**

Ils agissent en bloquant ces récepteurs, qui contrôlent différentes voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la survie et la prolifération cellulaire, et comprennent un inhibiteur de l'HER-2 ou un inhibiteur de l'HER-1 (EGFR).

Les signaux de transduction peuvent être bloqués par deux molécules différentes : d'une part les anticorps monoclonaux permettant d'inhiber la fixation du ligand sur son récepteur et d'une autre part les inhibiteurs de tyrosine kinase, qui sont des petites molécules capables de se fixer sur le site de phosphorylation du récepteur.

Tableau 4 : Exemples d'inhibiteurs de HER et leurs indications (Tamburini, 2015).

Type	Cible (s)	Molécule DCI	Nom déposé	Indications
Anticorps monoclonaux	CD20	Rituximab	Mabthera, Rituxan	Lymphomes non hodgkiniens, leucémie myéloïde chronique
	EGFR (ou HER-1)	Cétuximab	Erbitux	Cancer colorectal métastatique, cancers ORL
	HER-2	Trastuzumab	Herceptin	Cancer du sein métastatique
	EGFR	Panitumumab	Vectibix	Cancer colorectal métastatique
Inhibiteurs de la tyrosine kinase (ITK)	HER-1, HER-2	Lapatinib	Tyverb	Cancer du sein métastatique
	EGFR	Géfitinib	Iressa	Cancer bronchique non à petites cellules métastatique
	EGFR	Erlotinib	Tarceva	Cancer bronchique non à petites cellules métastatique, cancer du pancréas

➤ **Les ITK, un récepteur membranaire**

Tableau 5 : Exemple d'ITK et son indication (Tamburini, 2015).

Type	Cible (s)	Molécule DCI	Nom déposé	Indications
Inhibiteurs de la tyrosine kinase (ITK)	Récepteurs KIT, PDGFR	Imatinib	Glivec	Leucémie myéloïde chronique, tumeurs stromales gastro-intestinales, dermatofibrosarcome protubérant non résecable

➤ **Les inhibiteurs de mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*)**

La protéine mTOR (*mammalian target of rapamycin*) est une sérine/thréonine kinase ubiquitaire, c'est-à-dire qu'elle est présente dans toutes les cellules de l'organisme. Elle occupe une place cruciale dans la cellule et intervient dans les mécanismes de croissance, de survie ou encore dans le métabolisme cellulaire. Elle est au cœur d'une cascade de signalisation complexe. Son inhibition permet de stopper les processus de prolifération suractivés par la mutation de protéines

agissant en amont ou en aval. Les inhibiteurs de mTOR sont des dérivés de la rapamycine. Ils agissent sur la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR impliquée dans la dérégulation des cellules tumorales (Balsat, 2011).

Tableau 6 : Exemples d'inhibiteurs de mTOR et leurs indications (Tamburini, 2015).

Type	Molécule DCI	Nom déposé	Indications
Inhibiteur de mTOR	Temsirolimus	Torisel	Cancer du rein métastatique, cancer du sein métastatique
Inhibiteur de mTOR	Everolimus	Afinitor	Cancer du rein métastatique

B.1.2.3. Inhibiteurs du protéasome

Le protéasome est un complexe protéique qui dégrade les protéines sur lesquelles est fixée l'ubiquitine. La voie ubiquitine-protéasome joue un rôle essentiel dans la régulation du renouvellement des protéines spécifiques, maintenant ainsi l'homéostasie à l'intérieur des cellules (figure 28). L'inhibition du protéasome empêche cette protéolyse ciblée et affecte de multiples cascades de signaux à l'intérieur de la cellule, entraînant finalement la mort de la cellule cancéreuse (Pasquier et al., 2006).

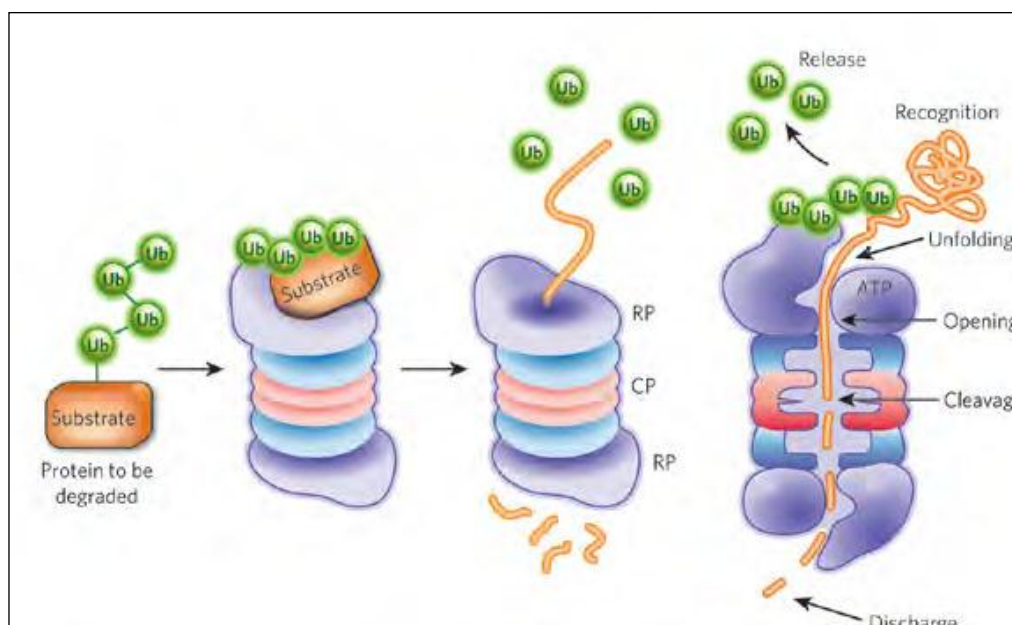


Figure 28 : La dégradation des protéines par le complexe du protéasome. Les protéines marquées par l'ubiquitine sont dirigées vers le protéasome. Elles seront reconnues par les récepteurs à l'ubiquitine situés dans la partie régulatrice (RP) du complexe. Les protéines sont ensuite, en présence d'ATP, transloquées vers la partie centrale (CP) du complexe où se trouvent les activités protéolytiques (en rouge) qui vont cliver les protéines en petits peptides. (Hontaas, 2014).

Zoom sur Le bortézomib (Velcade®) : est un inhibiteur réversible et très sélectif du protéasome. Il a une grosse structure protéique à activité enzymatique (activité chymotrypsine-like) impliquée dans la dégradation des protéines ubiquitinylées. Cette inhibition conduit à un arrêt du cycle cellulaire et à une apoptose. Il est indiqué dans la prise en charge des myélomes multiples (cancer de la moelle osseuse) et des lymphomes à cellules du manteau (un type de lymphome non hodgkinien) (Monassier, 2012).

En conclusion, toutes ces molécules de la thérapie ciblée peuvent être utilisées en monothérapie ou en association à d'autres thérapeutiques comme la chimiothérapie ou la radiothérapie. Mais, à l'heure actuelle, elles sont controversées et font l'objet de nombreuses questions, notamment dans la détermination de facteurs prédictifs permettant d'adapter pour chaque patient son traitement en fonction des caractéristiques biologiques propres de sa tumeur (Tamburini, 2015).

B.1.3. Effets secondaires des thérapies ciblées

Les thérapies ciblées sont généralement bien tolérées et n'entraînent pas les effets secondaires propres aux chimiothérapies : comme la perte des cheveux (alopécie), les nausées et les vomissements. Les médicaments utilisés dans le cadre de ces thérapies ont néanmoins une

toxicité qui leur est propre. Ils peuvent être à l'origine d'une hausse de la pression artérielle, de maux de tête, de protéinurie, de réactions allergiques, ou encore d'atteintes digestives.

B.1.4. Marqueurs déterminants l'accès aux thérapies ciblées

Différents tests moléculaires permettent de déterminer l'accès à une thérapie ciblée, en fonction de l'identification de « biomarqueurs ». Ces biomarqueurs sont des molécules ou protéines surexprimées ou au contraire anormalement absentes dans certains types de tumeurs. Ils constituent un facteur prédictif de réponse positive à une thérapie ciblée. En effet, des femmes atteintes du cancer de sein, ne peuvent recevoir le trastuzumab (Herceptin®) que si la protéine HER-2 impliquée dans la prolifération tumorale, est surexprimée. D'ailleurs sa forte expression constitue un facteur de mauvais pronostic.

I.2.1. Actualité sur les nouvelles thérapies anticancéreuses

I.2.1.1. Dernières avancées dans le traitement des cancers et apport de la génomique

On sait aujourd'hui qu'une modification génétique suffit rarement, à elle seule, à provoquer le développement d'un cancer. Il semble que, le plus souvent, une cellule ne devienne cancéreuse qu'à la suite d'un processus au cours duquel plusieurs gènes, parfois en nombre important, sont modifiés. A cela s'ajoute l'impact des facteurs environnementaux, qu'ils soient évitables ou non. C'est pour cette raison qu'on ne peut pas prévenir tous les cancers.

De nombreuses techniques ont été mises au point pour décoder la séquence d'ADN présente dans le noyau de chacune des cellules du corps humain. Grâce à ces outils, de moins en moins coûteux et désormais disponibles dans de nombreux laboratoires, les chercheurs peuvent étudier de plus en plus finement les variations de l'ADN et comprendre les mécanismes conduisant au développement d'un cancer. Aujourd'hui et dans ce cas spécifique, la génomique est de plus en plus utilisée. Elle consiste à étudier les caractéristiques génétiques d'une tumeur grâce à l'analyse des gènes et de leurs constituants chimiques. Ainsi, il est possible d'identifier un gène altéré ou une protéine à activité trop forte, trop faible ou anormale, menant à la cancérisation d'une cellule saine. Ces nouvelles connaissances changent la donne sur les moyens de prévenir, de diagnostiquer et de soigner les cancers. Trois grandes catégories de gènes associés aux pathologies cancéreuses sont actuellement connues : les oncogènes (impliqués dans le développement des tumeurs), les gènes suppresseurs de tumeurs et les gènes de réparation de l'ADN. Selon les types de cancer, l'enchaînement des altérations génétiques et leur chronologie sont très différents.

La recherche sur les thérapies ciblées s'est accélérée ces dernières années, notamment grâce à une collaboration de plus en plus étroite entre les chercheurs fondamentalistes qui travaillent en laboratoire et les cliniciens qui sont au contact du patient. Ces progrès de la recherche ont permis de développer de nouveaux médicaments capables de bloquer la croissance ou la propagation d'une tumeur précise, tout en préservant au maximum les cellules saines environnantes. Ils peuvent être utilisés en monothérapie ou en association avec d'autres traitements anticancéreux. Ces thérapies ciblées ouvrent la voie à une médecine dite « de précision » : de plus en plus personnalisée et adaptée au patient et aux caractéristiques de sa tumeur. Des essais cliniques d'un nouveau genre visent ainsi à traiter les cancers non plus en fonction de l'organe touché mais en fonction des spécificités biologiques et génétiques des tumeurs. Aujourd'hui, ces traitements sont utilisés dans certains cancers du sein et du poumon, ainsi que dans le cancer colorectal, le mélanome et dans certaines leucémies et cancers rares. L'exemple le plus emblématique est celui de l'Imatinib (Glivec®), utilisé notamment dans la leucémie myéloïde chronique, qui a permis d'augmenter le taux de survie à cinq ans de façon spectaculaire (Institut national du cancer, 2017).

I.2.1.2. Les nanomédicaments

En dépit des progrès considérables qui ont été effectués pour étendre l'arsenal des composés antitumoraux, la plupart des traitements existants souffrent de limitations, comme l'apparition de résistances, une dégradation prématurée du principe actif dans l'organisme, ou encore l'existence de nombreux effets secondaires dus à un manque de sélectivité. Les nouveaux défis qui se posent au chercheur ne résident donc plus seulement en la synthèse de nouvelles molécules plus actives mais en l'élaboration d'un médicament capable d'amener le principe actif à sa cible sans aucun dommage collatéral. Le développement récent des nanotechnologies et leur application au domaine des médicaments ouvrant des perspectives pour l'administration de principes actifs sont en train de révolutionner la recherche médicale (Mishra et al 2010).

La formulation de médicaments sous forme de nanoparticules permet de s'affranchir des limitations liées au profil physico-chimique de nombreux principes actifs. Par exemple, une molécule insoluble dans l'eau pourra être administrée sous forme de suspension aqueuse. Une autre, dégradée dans le milieu physiologique sera protégée des enzymes lytiques. Même si le développement des nano-médicaments semble être la solution à beaucoup de problèmes pharmaceutiques, seulement une dizaine de ces formulations sont actuellement commercialisées (Bawarski et al., 2008). Il s'agit le plus souvent de formes liposomales composées de phospholipides amphiphiles et de cholestérol qui s'auto-associent en bicouches en encapsulant

un cœur aqueux. La plupart des liposomes ont une taille inférieure ou égale à 400 nanomètres de diamètre. Ces nano-objets permettent l'encapsulation de molécules de polarité extrêmement variable. Le composé peut se trouver dans la bicouche phospholipidique, dans la cavité aqueuse ou encore à l'interface de la bicouche. Malheureusement, des problèmes majeurs limitent le développement industriel de ces formulations, comme une faible stabilité, la mauvaise reproductibilité entre les différents lots, des difficultés au niveau de la stérilisation et le faible taux de charge en principe actif.

Dans le domaine du cancer, on peut noter les formes liposomales de la doxorubicine (Caelyx®, Myocet®), et du citrate de daunorubicine (DaunoXome®), (Forssen and Ross, 1994; Gill et al., 1995) actuellement utilisées en clinique dans le cadre du traitement du sarcome de Kaposi associé au Sida. L'administration de ces composés sous cette nouvelle forme pharmaceutique provoque moins d'alopécies et de neuropathies, et bénéficie surtout d'une cardiotoxicité moindre par rapport à la forme injectable classique. La réduction de la toxicité cardiaque aiguë qui est un des effets secondaires majeurs des anthracyclines constitue un progrès thérapeutique indéniable.

Le paclitaxel est une molécule lipophile insoluble dans l'eau qui doit être dispersée dans du Crémophore EL pour être administrée chez les patients. Celui-ci peut provoquer des réactions d'hypersensibilité souvent fatales (Kloover et al., 2004). De plus cet adjuvant peut diminuer la pénétration dans la tumeur, limitant ainsi l'efficacité du traitement. Dans le but d'administrer le paclitaxel sous une forme galénique ne contenant pas de Crémophore EL, de nombreuses études ont été menées. Des nanoparticules d'albumine encapsulant le paclitaxel, présentant une taille moyenne de 130 nanomètres ont ainsi été développées par des laboratoires pharmaceutiques sous le nom commercial d'Abraxane® (Miele et al., 2009). Cette nouvelle formulation s'est avérée plus efficace que la formulation Crémophore dans des études précliniques sur un modèle murin du cancer du sein humain (Desai et al., 2006). Il a été démontré que le paclitaxel encapsulé dans l'Abraxane® pénétrait mieux dans les cellules cancéreuses que le paclitaxel libre. Les études cliniques de phase I à III qui ont suivies, ont montré que cette nouvelle formulation était également plus efficace que le Taxol chez des patientes atteintes de cancers du sein et de cancers du sein métastasés (Nyman et al., 2005). De plus, une administration hebdomadaire d'Abraxane® provoque beaucoup moins d'effets toxiques secondaires et notamment des réactions d'hypersensibilités que le Taxol®. Cette diminution des effets indésirables permet d'administrer des doses plus importantes, ce qui explique en partie le gain d'efficacité observé chez la majorité des patientes (Nyman et al., 2005). Par conséquent, l'Abraxane® est maintenant indiqué en monothérapie dans le traitement du cancer du sein métastatique.

D'autres spécialités sont commercialisées sous forme de nano-cristaux (Bawarski et al., 2008). Les nano-cristaux sont des nanoparticules avec un caractère cristallin d'une taille de l'ordre du nanomètre. Ils présentent l'avantage d'avoir un taux de charge de 100%, leur préparation ne nécessitant aucun matériau vecteur, contrairement aux nanoparticules polymériques. Quelques-unes de ces formulations sont commercialisées et utilisées en clinique, comme L'acétate de Mégestrol (Megace ES®) est un stéroïde progestatif indiqué dans le traitement des cancers du sein métastatiques et de l'endomètre. D'autres spécialités sous forme de nano-cristaux sont en études cliniques avancées, comme la Guanylhydrazone (Semapimod®), le Paclitaxel (Paxceed®) ou encore la Thymectacine (Theralux®) (Junghanns and Müller, 2008).

A ce jour, seuls quelques composés formulés sous forme de suspensions nano-particulaires sont prescrits de manière courante en clinique. Cependant le nombre de nano-médicaments tend à s'accroître et un grand nombre de ces nanotechnologies sont actuellement en phases cliniques. Ces futurs développements devraient pouvoir s'étendre aux différentes classes d'anticancéreux, comme les anti-métaboliques, les agents alkylants ou encore les inhibiteurs de topoisomérases. Ces spécialités présentent toutefois quelques limitations, comme un faible taux de charge, hormis les nano-cristaux actuellement en développement, une administration complexe, ainsi qu'un coût de production des formulations qui reste très élevé (Caron, 2011).

I.2.2. Apoptose ou mort cellulaire programmée

I.2.2.1. Généralités

Le terme « mort cellulaire » désigne l'ensemble des événements conduisant à la destruction de la cellule. Actuellement, il existe 4 différents types de mort connus avec l'apoptose, la nécrose ou nécroptose, l'autophagie et la catastrophe mitotique (Kroemer et al., 2009).

Le terme apoptose, (du grec : chute des feuilles en automne, avec apo pour éloignement et ptose pour chute des feuilles en se détachant), a été utilisé pour la première fois par Kerr et ses collaborateurs en 1972 pour décrire une forme de mort cellulaire différente de la nécrose (Kerr et al., 1972). Il s'agit d'une forme active de mort cellulaire programmée, qui constitue une réponse de l'organisme à des stimuli physiologiques ou pathologiques provoquant un déséquilibre entre production et élimination de cellules.

L'apoptose résulte de l'exécution d'un programme hautement régulé, qui consiste en l'activation d'enzymes et l'expression de nombreux gènes pro ou anti-apoptotiques qui vont induire la destruction d'une cellule tout en préservant l'intégrité tissulaire environnante. Elle est également

indispensable au remodelage, au maintien de l'homéostasie tissulaire et à la régulation des réponses immunitaires (Evan and Littlewood, 1998). Elle permet, en effet, de sélectionner et d'éliminer les cellules potentiellement dangereuses pour l'organisme, les cellules surnuméraires et les cellules dysfonctionnelles (Rai et al., 2005). Ainsi, toute perturbation de ce programme peut s'avérer délétère pour l'organisme et conduire au développement de diverses pathologies. Certaines sont liées à une inhibition de cette mort programmée (cancers, syndromes lymphoprolifératifs, maladies auto-immunes ...) alors que d'autres sont associées à une stimulation de ce phénomène (Sida, maladies neurodégénératives...) (Häcker et al., 2006; Bettaieb, 2009).

Tableau 7 : Maladies associées aux dysfonctionnements de l'apoptose.

Maladies associées à un défaut de l'apoptose	Maladies associées à un excès d'apoptose
<p>Cancers : Lymphomes folliculaires Carcinomes avec mutation du gène p53 Tumeurs hormono-dépendantes (cancers du sein, des ovaires et de la prostate)</p> <p>Maladies auto-immunes : Lupus érythémateux disséminé</p>	<p>Sida</p> <p>Troubles neurodégénératifs : Maladie d'Alzheimer Maladie de Parkinson Sclérose en plaque</p> <p>Ischémies : Du myocarde Cérébrale</p> <p>Hépatites fulminantes</p>

I.2.2.2. Changements morphologiques au cours de l'apoptose

Contrairement à la nécrose, la mort des cellules par apoptose se caractérise par de profonds changements morphologiques, génétiques et biochimiques stéréotypés. Une des premières modifications morphologiques due à l'apoptose est la réduction du volume cellulaire. Au cours de cette étape, le cytoplasme se condense et les organites cellulaires sont morphologiquement intacts (Abraham and Shaham, 2004). Le noyau, quant à lui, se rétrécit, la chromatine se condense, se fragmente, forme des amas puis des croissants accolés à l'enveloppe nucléaire. Ce phénomène est habituellement accompagné d'une fragmentation irréversible de l'ADN nucléaire. La fragmentation de l'ADN par des endonucléases prend la forme d'un clivage de l'ADN en larges fragments de 300 000 et/ou de 50 000 paires de bases. Cette première

fragmentation est typiquement suivie d'un clivage internucléosomal très spécifique du processus apoptotique, qui aboutit à l'apparition de monomères ou d'oligomères de 180-200 paires de bases (Rovere-Querini et al., 2008).

La membrane plasmique est le siège de remaniements regroupés sous le nom de zéose. Elle présente des irrégularités, puis des boursouflures sous forme de doigts de gants qui donnent naissance à des corps apoptotiques renfermant une partie du cytoplasme et des organites cellulaires à l'état intact. Ces changements morphologiques sont souvent accompagnés de changements biochimiques comme la translocation de résidus phosphatidylsérines sur la face externe de la bicouche lipidique. L'ensemble de ces modifications entraîne la reconnaissance et la phagocytose des corps apoptotiques par les macrophages et prévient le déversement du contenu cytoplasmique dans le milieu extracellulaire, empêchant ainsi toute réaction inflammatoire locale (Fadok et al., 1992; Martin and Green, 1995).

I.2.2.3. Mécanismes moléculaires et voies de signalisation de l'apoptose

Il existe aujourd'hui plusieurs voies de signalisation aboutissant à l'apoptose. D'une manière plus explicite, les chercheurs ont classé ces voies signalétiques en trois principales voies. La première, est appelée voie intrinsèque. Elle met en jeu la mitochondrie et occupe une place centrale dans les mécanismes moléculaires de l'apoptose. La deuxième voie, connue aussi sous le nom de voie des récepteurs de mort, est une voie extrinsèque initiée à la surface de la cellule par des récepteurs membranaires. Ces deux voies de signalisation aboutissent à l'activation des caspases, famille de protéases ayant un rôle clé dans l'apoptose et, par conséquent, elles sont qualifiées de voies signalétiques dépendantes des caspases. Récemment, plusieurs autres voies ont été découvertes et sont en cours d'investigation, comme la voie indépendante des caspases mettant enjeu une protéine mitochondriale inductrice de l'apoptose (AIF), la voie du granzyme B lors des réponses inflammatoires, ou encore l'apoptose médiée par l'endonucléase G. Outre la voie intrinsèque et la voie extrinsèque, le réticulum endoplasmique apparaît comme un compartiment cellulaire déclencheur de l'apoptose en cas de stress rigoureux (Ziegler and Kung, 2008).

L'apoptose peut être induite par différents stimuli comme le traitement des cellules par des substances cytotoxiques, la transmission d'un signal de mort provenant de l'extérieur de la cellule (récepteur Fas ou CD95 : protéine transmembranaire largement distribué au niveau des lymphocytes cytotoxiques, des cellules *natural killer* NK, du facteur de nécrose TNF α ou tumor necrosis factor), la privation de facteurs de croissance cellulaire, l'atteinte de l'ADN par des

radiations ionisantes (protéine p53), l'hypoxie.... Elle s'effectue par le biais de protéases, les caspases (cysteinyl aspartate proteinases), qui déclenchent la mort cellulaire en dégradant des substrats cellulaires du noyau et du cytoplasme. Les caspases existent dans toutes les cellules sous formes de précurseurs inactifs (procaspases) dont l'activation d'un premier contingent de caspases dites initiatrices, entraîne l'activation séquentielle des caspases dites effectrices notamment la caspase-3, au sein d'une cascade protéolytique. Le processus d'activation peut être initié par divers types de signaux intra- et extracellulaires. Deux voies principales d'activation sont actuellement identifiées : la voie extrinsèque des récepteurs à domaines de mort (Fas, TNF α), et la voie intrinsèque mitochondriale. L'activation des caspases, et indirectement de tout processus apoptotique, est régulée positivement ou négativement par les protéines de la famille Bcl-2 (Zou et al., 1999).

Il existe trois phases dans le processus de déroulement de l'apoptose qui sont schématisées ci-dessous.

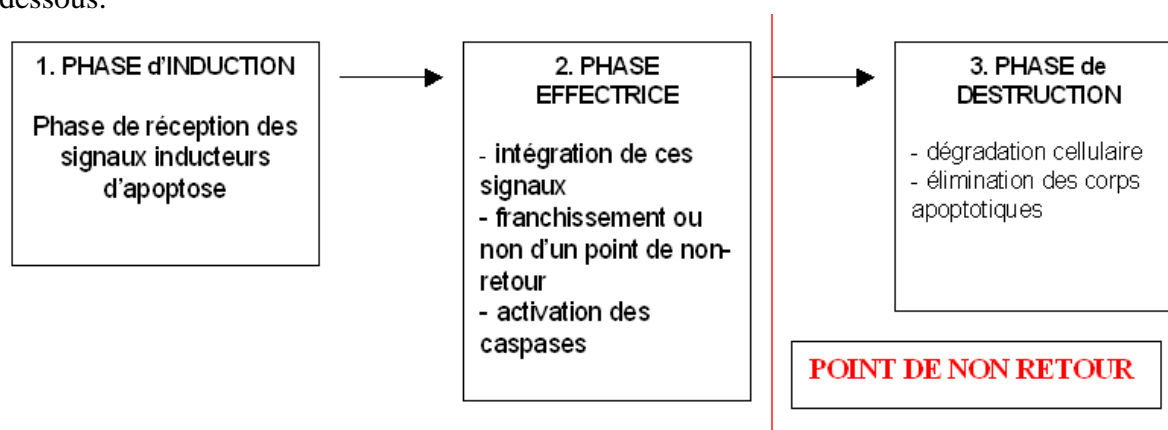


Figure 29 : Processus du déroulement de l'apoptose. Après la phase effectrice : point de non-retour, la cellule est amenée à être détruite. <http://www.ebiologie.fr/upload/s/84/apoptose-le-point-de-non-retour>.

I.2.2.3.1. La voie des récepteurs à domaine de mort, la voie extracellulaire

Elle est située dans la membrane plasmique (Figure 30). L'apoptose des cellules cibles peut être induite par un contact intercellulaire (liaison FasL-Fas), FADD ou par l'activité protéolytique des granzymes. Les granzymes sont une famille d'enzymes protéolytiques contenues dans des granules cytoplasmiques ; ils pénètrent les cellules cibles à travers les canaux transmembranaires formés par des molécules de perforines polymérisées. Leur activité enzymatique leur permet de cliver de nombreux substrats protéiques, dont certaines procaspases.

I.2.2.3.2. La voie intracellulaire ou la voie mitochondriale

Elle est induite par la relâche de protéines mitochondriales (Figure 31). Il s'agit d'une voie d'activation mise en jeu lorsque les cellules sont lésées ou soumises à un stress, et le signal

inducteur est essentiellement d'origine intracellulaire (c'est une voie d'activation qui est sollicitée lorsque la cellule détecte un problème interne (dommage de l'ADN). Dans cette voie d'activation les mitochondries sont stimulées, des méga-pores se créent, qui permettent la libération du cytochrome-c dans le cytosol. Il déclenche alors une cascade de réactions qui aboutissent à l'activation de caspases, ainsi qu'à la création de l'apoptosome. Une fois libéré dans le cytosol, le cytochrome-c va se fixer à une protéine adaptatrice équivalente à FADD de la voie extrinsèque : la protéine Apaf-1, et va l'activer. Une fois activée cette protéine Apaf-1 est capable de se lier à la procaspase-9. Il se forme alors un complexe trimoléculaire encore appelé « apoptosome » constitué par le cytochrome-c/Apaf-1/procaspase-9 qui va permettre toujours par un mécanisme de protéolyse, l'activation de la procaspase-9. La caspase-9 active, pourra à son tour activer d'autres caspases et notamment la caspase-3. (Henshall et al., 2001; Shi, 2002).

La protéine p53 active la transcription de gènes qui codent pour des protéines de promotion de la libération du cytochrome-c des mitochondries : la protéine Bax. Cette protéine appartient à la famille de Bcl-2 où son membre de référence Bcl-2 est connu au contraire pour empêcher le relargage du cytochrome-c, et réprimer les processus apoptotiques. C'est donc le ratio entre protéine pro- et anti-apoptotique de cette famille Bcl-2 qui conditionnera la libération du cytochrome-c, et le déclenchement d'un processus apoptotique.

Si Bcl-2 est plus important en quantité que Bax, alors il n'y aura pas de formation d'apoptosome. Si Bax est plus important en quantité que Bcl-2, alors il y aura une activation de l'apoptosome (figure 32). Les deux voies principales d'activation des caspases sont en fait organisées selon un même schéma, avec premièrement l'activation d'une caspase initiatrice (caspase-8 ou 10, caspase-9) nécessitant la participation d'une molécule adaptatrice (FADD ou Apaf-1), conduisant dans un second temps à l'activation des caspases effectrices (surtout la caspase-3), au sein d'une cascade protéolytique (figure 33) (Cheng et al., 2001).

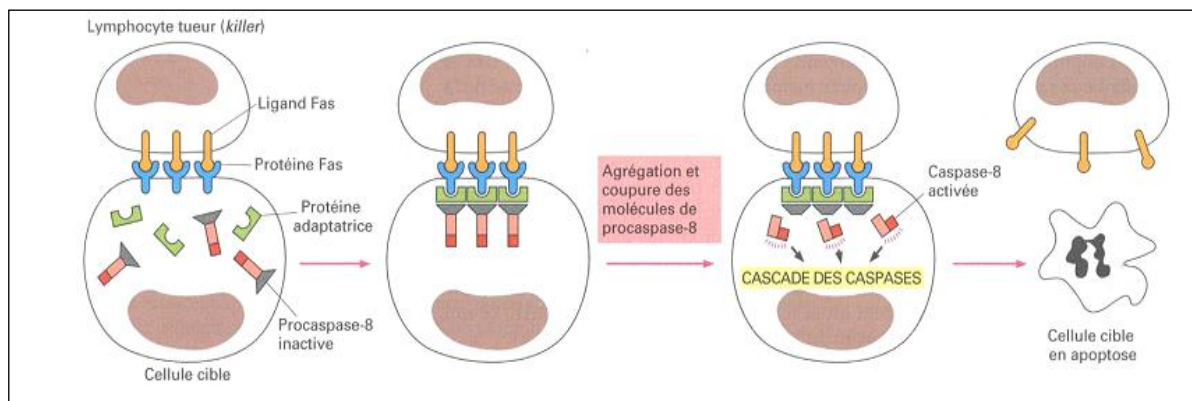


Figure 30 : Activation de l'apoptose de l'extérieur de la cellule (voie extrinsèque).
<http://www.ebiologie.fr/upload/s/91/activation-de-l-apoptose-de-l-exterieur-de-la-cellule-voie-extrinsèque>

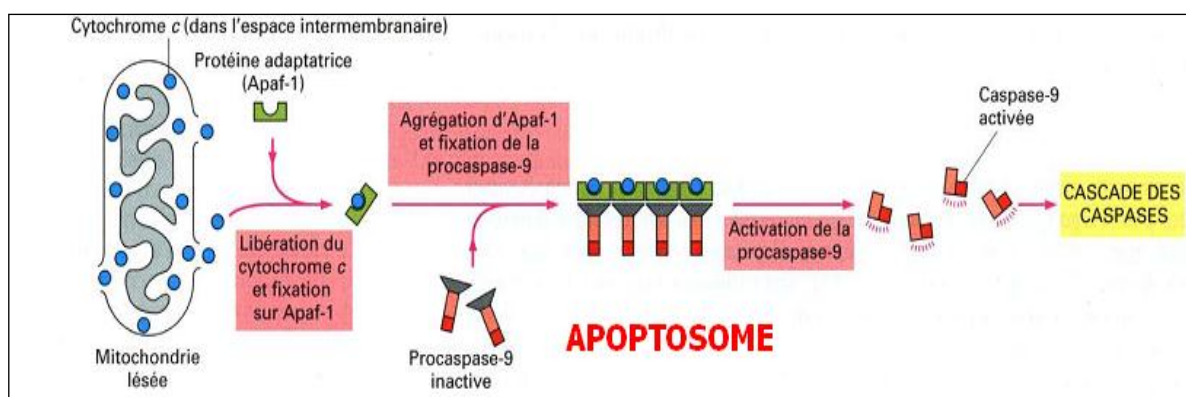


Figure 31 : Activation de l'apoptose de l'intérieur de la cellule (voie intrinsèque).
<http://www.ebiologie.fr/upload/s/94/activation-de-l-apoptose-de-l-interieur-de-la-cellule-voie-intrinseque>

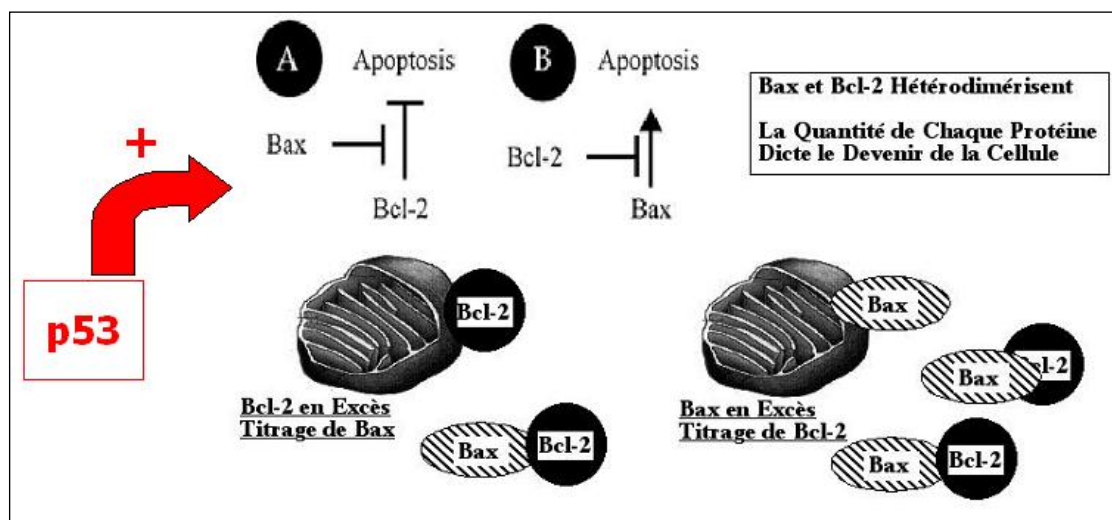


Figure 32 : Régulation de l'apoptose par Bcl-2/Bax
<http://www.ebiologie.fr/upload/s/95/regulation-de-l-apoptose-par-bcl2bax>

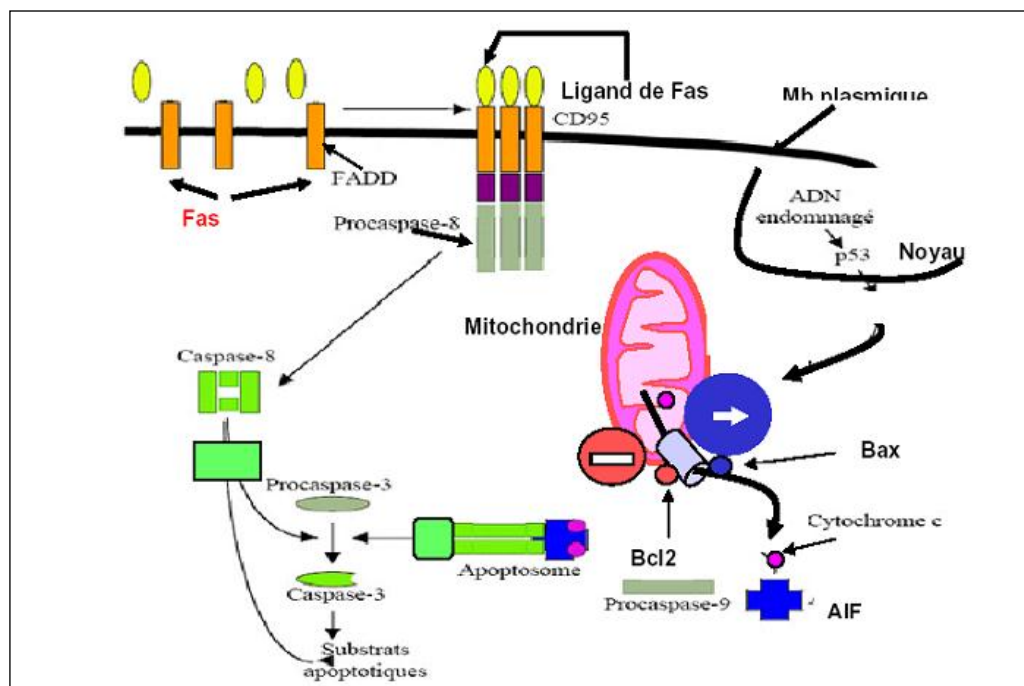


Figure 33 : L'apoptose cellulaire par la voie intracellulaire et la voie extracellulaire.
<http://www.ebiologie.fr/upload/s/96/apoptose>

En conclusion, l'apoptose joue un rôle critique en tant que mécanisme de protection contre la carcinogenèse en éliminant les cellules inutiles ou indésirables pour maintenir un équilibre sain entre la survie et la mort cellulaires. A ce propos, elle est devenue une zone d'intérêt et d'investigation intenses en sciences et en médecine. En effet, la mort cellulaire programmée fournit de nombreux indices précieux sur l'efficacité des médicaments anticancéreux agissant par cette voie. Par conséquent, l'induction de l'apoptose est devenue un axe principal lors du développement de nouvelles thérapies ciblées. En effet, de nombreux agents cytotoxiques (extraits naturels de plantes, huiles essentielles, molécules de synthèse ou d'hémisynthèse) agissent sur différentes cellules cancéreuses via ce mécanisme.

L'apoptose est un processus dépendant de l'énergie soigneusement réglementé dans lequel l'activation des caspases joue un rôle central. Bien que de nombreuses protéines apoptotiques clés aient été identifiées, les mécanismes moléculaires de leur action ne sont pas encore pleinement compris et continuent donc d'être axés sur la recherche.

I.2.2.4. Catastrophe mitotique

La catastrophe mitotique, quant à elle, est mise en place lorsque la cellule n'arrive pas au terme de sa mitose ou lorsque celle-ci se déroule de façon anarchique. Elle résulte de la combinaison de déficiences au niveau des points de contrôle du cycle cellulaire (points de contrôle de la structure

de l'ADN et de l'assemblage du fuseau mitotique) et de dommages cellulaires mais peut également être provoquée par des stress physiques ou chimiques ainsi que par des molécules thérapeutiques ciblant les microtubules. La voie extrinsèque de l'apoptose joue également un rôle majeur dans ce phénomène (Castedo et al., 2004; Vakifahmetoglu et al., 2008). Un désassemblage du fuseau mitotique et un arrêt du cycle cellulaire à la transition G₂/M ont été mis en évidence dans les cellules humaines MCF7 de cancer du sein traitées à la curcumine (Holy, 2002).

I.2.2.5. Autophagie

L'autophagie est un phénomène qui se caractérise par la séquestration d'organites et de protéines par des autophagosomes et par la dégradation de leur contenu après fusion avec des lysosomes. Cet événement qui se produit en période de stress ou de privation de nutriments conduit à la dégradation des protéines et organites superflus qui serviront de matières premières pour maintenir le métabolisme cellulaire. A l'heure actuelle, on distingue trois grands types d'autophagie :

- Macro-autophagie consiste en la formation d'autophagosomes autour d'une région cellulaire ou d'organites. Ces autophagosomes vont ensuite fusionner aux lysosomes pour former des autophagolysosomes où le contenu sera dégradé par les hydrolases.
- Micro-autophagie est l'engloutissement direct de molécules du cytoplasme directement par le lysosome.
- Autophagie régulée par les protéines chaperonnes n'implique que la dégradation de protéines portant un motif qui est reconnu par le complexe HSC70 (heat shock cognate). Après reconnaissance et fixation, le complexe oriente la protéine cible vers le lysosome où celle-ci est transloquée et hydrolysée.

L'autophagie n'est pas un phénomène de mort directement en soi, c'est plutôt un mécanisme de défense que peut mettre en place la cellule saine ou cancéreuse face à un stress de courte période. Cependant, si ce stress ou cette privation de nutriments perdure sur une plus longue période, l'autophagie peut aboutir à la mort par apoptose ou par nécrose de la cellule (Eisenberg-Lerner et al., 2009; Fimia and Piacentini, 2010).

Des résultats récents ont montré que les ERO (espèces réactives d'oxygène) sont capables d'induire le processus d'autophagie. Bien qu'il subsiste encore beaucoup d'interrogations à l'heure actuelle, notamment sur les cibles des ERO et sur les voies de signalisation impliquées, il

semble que ce soit l'oxydation de certaines protéines impliquées dans le processus d'autophagie qui en soit la cause (Azad et al., 2009; Scherz-Shouval and Elazar, 2011).

I.2.2.6. Nécrose et nécroptose

La nécrose a été souvent écrite comme un type de mort non-contrôlée et qui n'est que très peu étudiée. La mort par nécrose déclenchée par blessure ou traumatisme aboutit à la lyse des cellules et à la libération de leur contenu cytoplasmique dans l'environnement extracellulaire et qui déclenche un processus d'inflammation. La mort des cellules nécrotiques est morphologiquement caractérisée par une augmentation de volume de la cellule (oncoses), un gonflement des organites et la rupture des membranes plasmiques suivie par la perte de contenu intracellulaire. Ce mécanisme se caractérise par une augmentation de la concentration de calcium cytoplasmique, d'espèces réactives d'oxygène et une diminution de l'ATP. Cependant, les recherches récentes ont démontré que dans certains cas ce type de mort cellulaire apparaît comme étant sous régulation d'où sa nouvelle appellation « nécroptose » (Fulda, 2013; Golstein and Kroemer, 2007; Proskuryakov et al., 2003).

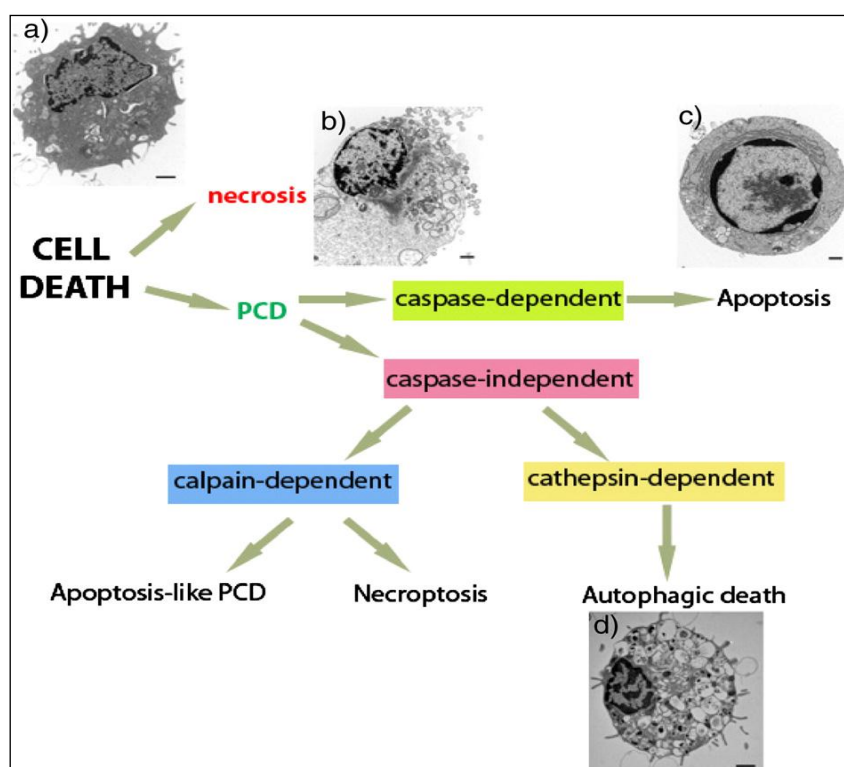


Figure 34 : Types de mort cellulaire et leurs caractéristiques morphologiques. Classification schématique des différents types de mort cellulaire. PCD (programmed cell death) : mort cellulaire programmée. Caractéristiques morphologiques de a) une cellule saine, b) une cellule nécrotique, c) une cellule apoptotique et d) une cellule autophagique. Images de micrographie électronique (Edinger and Thompson, 2004).

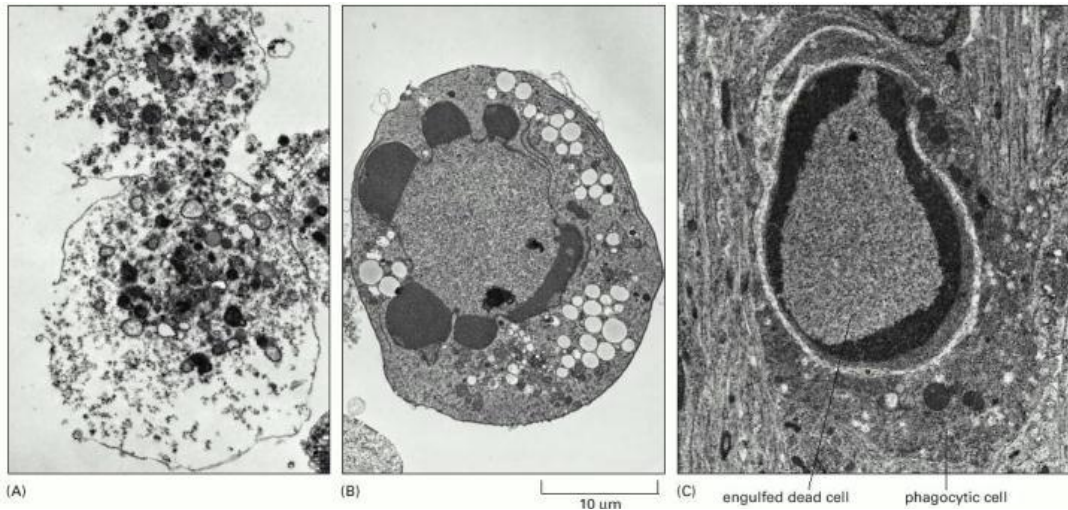


Figure 35 : Micrographies prises au microscope électronique montrant des cellules qui meurent de nécrose (A) ou d'apoptose (B et C). Les cellules en (A) et (B) meurent dans des boîtes de cultures alors que la cellule en (C) meurt dans un tissu en développement et a été phagocytée par une cellule voisine. Notez que la cellule en (A) semble avoir explosée alors que celles en (B) et (C) sont condensées et semblent relativement intactes. Les vacuoles visibles dans le cytoplasme de la cellule (B) sont des caractéristiques variables de l'apoptose.

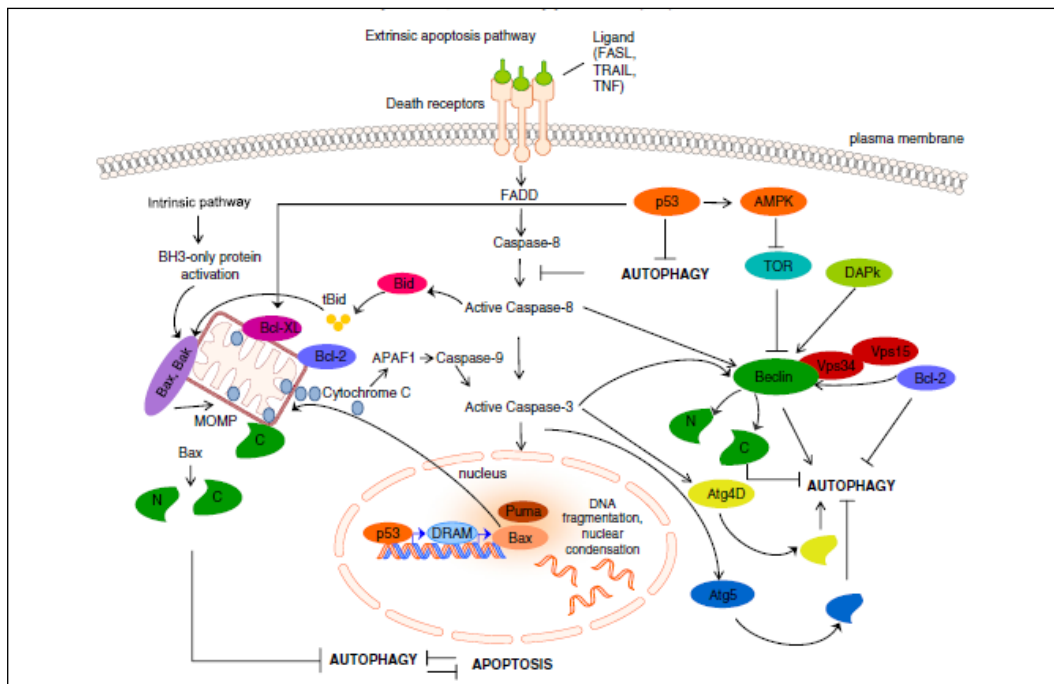


Figure 36 : interférence entre apoptose, nécrose et autophagie (Nikoletopoulou et al., 2013).

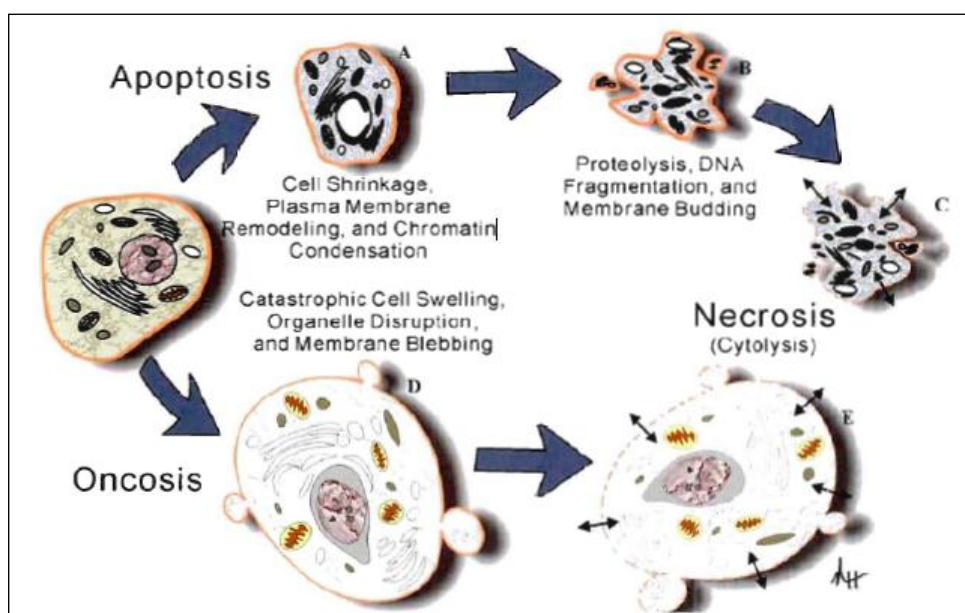


Figure 37 : Caractéristiques morphologiques de l'apoptose et de la nécrose. En dépit de la diversité des signaux de mort, toutes les cellules engagées dans le processus apoptotique montrent des modifications morphologiques et biochimiques similaires : (A) condensation de l'ADN et dislocation des organites ; (B) bourgeonnement de la membrane plasmique et formation des corps apoptotiques. Contrairement à l'apoptose, la nécrose, considérée comme une mort cellulaire passive caractérisée par une modification de la perméabilité membranaire entraînant une entrée massive d'eau, une dilatation du cytoplasme et des organites (D), la rupture des membranes et la libération dans le milieu environnant du contenu cytoplasmique (E), déclenchant ainsi une réaction inflammatoire (Bettaieb, 2009).

I.2.3. Autres approches thérapeutiques

I.2.3.1. Immunothérapie

Les cellules cancéreuses mettent en œuvre différents mécanismes pour échapper aux effecteurs de la défense. L'immunothérapie antitumorale est une méthode qui vise à renforcer les défenses naturelles de l'individu contre la tumeur. Ce traitement présente l'avantage d'épargner les cellules saines. On distingue trois formes d'immunothérapie :

- ✓ **L'immunothérapie spécifique** : Elle consiste à injecter un ou plusieurs antigènes tumoraux (antigène de télomérase, antigène de différenciation mélanocytaire), sous différentes formes, afin de stimuler une réponse immunitaire spécifique via les lymphocytes T *in vivo*.
- ✓ **L'immunothérapie non spécifique** : Elle consiste en l'induction d'une réponse immunitaire anti-tumorale indépendante d'un antigène spécifique. Ce type de stratégie permet de cibler la majorité des tumeurs sans nécessiter l'identification d'antigènes spécifiques. De plus, elle permet la stimulation d'une réponse immunitaire préexistante souvent bloquée par les mécanismes d'immunosuppression développés par la tumeur.

- ✓ **L'immunothérapie cellulaire adoptive** : Elle implique le transfert de cellules immunocompétentes à des patients atteints de cancer. Les cellules T, les macrophages, les cellules NK ont été utilisées dans ce type d'approche (Paul and Étienne, 2002).

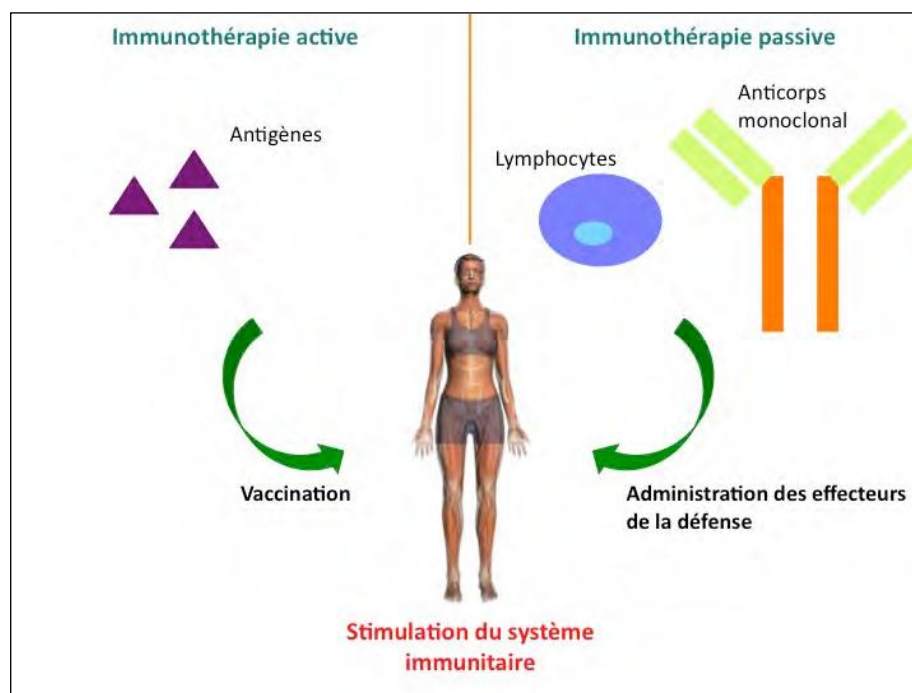


Figure 38 : L'immunothérapie active et passive. L'immunothérapie a pour but de stimuler le système immunitaire des patients (Hontaas, 2014).

Les recherches sur l'immunothérapie sont très prometteuses et plusieurs travaux sont en cours pour essayer de contourner les mécanismes développés par les cellules cancéreuses pour échapper aux réponses immunes induites par ces nouvelles thérapies et les rendre plus efficaces. Il est aussi envisagé de les associer aux thérapies actuelles telles que la chimiothérapie et la radiothérapie. En effet, la radiothérapie à faible dose rend les cellules tumorales plus sensibles aux réponses immunes consécutives à l'utilisation des vaccins et certains médicaments de chimiothérapie (doxorubicine, 5-FU, gemcitabine ou paclitaxel) augmentent la présentation antigénique des cellules cancéreuses les rendant plus vulnérables (Hontaas, 2014).

Les molécules utilisées en immunothérapie

- **Les cytokines** (*immunothérapie non spécifique*)

Ce sont des molécules qui ont une action antiprolifératrice sur les cellules tumorales mais aussi une action immunomodulatrice qui va augmenter l'activité des cellules tueuses NK et des macrophages.

✓ **L'interféron recombinant IFN- α 2b : Introna®**

Est indiqué dans le traitement des lymphomes, associé à la chimiothérapie, à titre d'adjuvant après résection chirurgicale des mélanomes malins, leucémies à tricholeucocytes en monothérapie, leucémie myéloïde chronique associé à la cytarabine ou myélome multiple en rémission.

✓ **L'interféron recombinant IFN- α 2a : Roferon®**

Possède les mêmes indications qu'**Introna®** sauf en cas de myélome multiple et de tumeurs carcinoïdes. Mais il est préconisé aussi dans le sarcome de kaposi, le cancer du rein métastatique, les lymphomes à cellules T.

Effets indésirables : syndrome pseudo grippal, troubles digestifs, troubles confusionnels, possible neutropénies, thrombopénies et élévation des transaminases.

✓ **Interleukine 2 (Aldesleukine) : Proleukin®**

Cet analogue de l'interleukine 2 humaine recombinante est utilisé en cancérologie dans le traitement de l'adénocarcinome rénal métastatique. Il régule la réponse immunitaire de différentes façons. Il stimule la croissance et la prolifération des lymphocytes T et active la production à partir des lymphocytes de cellules capables de lyser des cellules tumorales (Hontaas, 2014). L'interleukine 2 va être capable de générer des cellules lymphocytaires cytotoxiques : LAK (Lymphokine Activated Killer) et TIL (*Tumor Infiltrating Lymphocyte*) qui vont avoir une action antitumorale à partir du sang périphérique (LAK), ou du stroma tumoral (TIL). L'interleukine 2 peut aussi activer des cascades de production de cytokines antitumorales type interféron-gamma mais aussi le facteur de nécrose tumorale TNF (*Tumor necrosis factor*). Elle est indiquée dans les adénomes métastatiques du rein. Cependant, elle présente des effets indésirables tels que le syndrome de fuite capillaire avec apparition d'œdèmes, de troubles pulmonaires et cardiaques, hypersensibilité, fièvre, prurit, vomissements.

• **Vaccins contre les cancers (immunothérapie active)**

Le vaccin BCG lyophilisé (Immucyst®) est indiqué dans le cancer de la vessie et le cancer de la voie endovésicale. Le vaccin à papillomavirus (Gardasil®, Cervaxis®) est indiqué dans le cancer du col de l'utérus.

I.2.3.2. L-asparaginase

La L-asparaginase Kidrolase® est une enzyme injectable qui hydrolyse l'asparagine sanguine, la rendant ainsi indisponible pour les cellules leucémiques qui sont, au contraire des cellules normales, incapables de réaliser une synthèse *de novo* d'asparagine. Elle est peu toxique sur le

plan hématologique et expose, du fait de sa nature peptidique, essentiellement à un risque allergique.

I.2.3.3. Corticothérapie

Les corticoïdes sont utilisés comme agents immunosuppresseurs dans les leucémies aiguës ou chroniques, lymphomes non hodgkinien, la maladie de hodgkin et le cancer du sein.

I.2.3.4. Enzymothérapie

C'est une thérapie à base de combinaison d'enzymes protéolytiques jouant un rôle majeur dans le traitement biologique du cancer. Il s'agit d'une nouvelle approche thérapeutique très prometteuse, encore expérimentale.

I.2.3.5. Thérapie génique

Cette technique consiste en l'introduction dans une cellule, dite cible, d'un matériel génétique constitué d'un gène sous la dépendance d'une séquence de régulation. Cette séquence de régulation est habituellement un promoteur. Le gène est introduit soit directement sous forme d'ADN nu, soit grâce à un vecteur, dans le génome de la cellule cible. L'expression de ce gène modifiera les propriétés fonctionnelles de la cellule. En cancérologie, il s'agit d'une méthode thérapeutique visant à traiter la maladie en modifiant la séquence d'ADN des gènes impliqués dans la prolifération tumorale (Ardailou, 2002).

I.2.4. Traitements complémentaires

L'objectif de ces traitements est d'éviter les effets secondaires et l'immunosuppression des thérapies classiques. Parmi les traitements complémentaires on peut citer : La thérapie orthomoléculaire : Elle consiste à optimiser l'environnement cellulaire avec un bon régime alimentaire équilibré de molécules naturelles, en particulier, les antioxydants naturels comme les vitamines, les minéraux et les huiles végétales (Lesser, 1990).

I.2.4.1. Ozonothérapie

Elle consiste à utiliser l'ozone pour traiter les différentes affections et symptômes. L'ozone est connu pour stimuler la production d'antioxydants et prévient donc les agressions cytotoxiques des radicaux libres sur les protéines, les lipides et l'ADN, ce qui ralentit le développement et la progression des tumeurs (Menabde et al., 2006).

I.2.4.2. Hyperthermie (thermothérapie)

L'hyperthermie est une nouvelle méthode utilisée dans le traitement de certains types de cancers comme les cancers du cerveau, de la vessie, du rectum et de l'œsophage, ainsi que des pathologies urogénitales chroniques. Cette méthode peut être utilisée seule ou en combinaison avec la radiothérapie, la chimiothérapie et la thérapie génique. Le principe de ce traitement consiste à envoyer de la chaleur grâce à des ondes électromagnétiques jusqu'à la tumeur. Ces dernières étant mal vascularisées, elles sont incapables d'évacuer la chaleur ce qui induit leur mort. Souvent, l'application de la chaleur aboutit aussi à l'activation de l'ensemble du système immunitaire et à la lutte contre toutes les infections dissimulées (Manjili et al., 2002).

I.2.5. Phytothérapie

La phytothérapie consiste à utiliser des plantes comme médicaments pour rétablir et conserver le corps en bon état. Plus de 80 % de la population mondiale l'utilisent pour les divers problèmes de santé (Farnsworth and Kaas, 1981). Plusieurs études scientifiques ont confirmés les bienfaits des plantes médicinales dans la guérison ou le soulagement de plusieurs maladies y compris le cancer. En effet, un nombre importants d'études *in vitro* ont montré que les extraits bruts, aqueux ou hydro-alcooliques, de quelques plantes médicinales exercent un effet cytotoxique sur différentes lignées de cellules cancéreuses (Ray et al., 2010). Les flavonoïdes sont considérés parmi les molécules bioactives les plus importantes.

I.3. Toxicité et effets indésirables de la chimiothérapie

L'utilisation des médicaments cytotoxiques présente des inconvénients non négligeables. Ces composés manquent de sélectivité sur les cellules cancéreuses à prolifération rapide. Ils ont aussi la propriété d'agir sur les cellules normales à forte division mitotique (les cellules du sang, les cellules de la moelle osseuse, les cellules des cheveux et de la peau, les cellules des muqueuses buccale, gastro-intestinale, génito-urinaire) provoquant ainsi des effets indésirables gênants, parfois graves et irréversibles, notamment sont des nausées et vomissements, une myélotoxicité, une neurotoxicité, l'aménorrhée ou l'azoospermie, une toxicité rénale, nerveuse, hématologique et auditive. De ce qui suit, Il apparaît donc incontournable de chercher et de développer de nouvelles substances anticancéreuses d'origine naturelle qui soient efficaces avec beaucoup moins d'effets indésirables (Chauvergne and Hoerni, 1992; Descôteaux, 2013).

La toxicité des médicaments anticancéreux peut se diviser en une toxicité aiguë et une toxicité chronique.

- **La toxicité aiguë** apparaît quelques heures à quelques jours après l'administration du produit. Elle dure de quelques heures à quelques jours et semble étroitement liée à la dose administrée. Elle atteint l'appareil digestif (nausées et vomissements, diarrhées ou constipation), la peau et les phanères (mucites, alopecie, mélanodermie, troubles de la croissance des ongles), le système hématopoïétique (leucopénie, anémie, thrombopénie).
- **La toxicité chronique** prend tout son sens à une époque où les traitements ont considérablement augmenté le pronostic vital des malades. Elle peut se manifester plusieurs mois à plusieurs années après la fin d'un traitement. Il s'agit d'une toxicité pulmonaire, cardiaque, hématologique, oligo-azoospermie chez l'homme ou une aménorrhée chez la femme. Ainsi, par exemple, le traitement d'un cancer du sein par des anthracyclines peut provoquer une insuffisance cardiaque extrêmement sévère dix ans après le traitement (Monassier, 2012).

I.4. Chimio-résistance des cancers aux traitements conventionnels

L'administration répétée de la majorité des traitements cytotoxiques occasionne généralement une résistance intrinsèque ou acquise. C'est un problème majeur dans le traitement des cancers. La chimio-résistance peut impliquer plusieurs mécanismes, comme l'influx diminué et l'afflux augmenté des substances actives, l'inactivation du médicament, la modification des cibles moléculaires, la réparation ou la réversion des modifications cellulaires induites par les molécules actives ou l'abolition de l'apoptose (Descôteaux, 2013).

Les mécanismes de résistance aux anticancéreux sont multiples et impliquent des caractéristiques intrinsèques des tumeurs et cellules cancéreuses ainsi que de facteurs constitutionnels du patient et indépendants du traitement (terrain génétique).

- **Caractéristiques de la tumeur**

Un anticancéreux peut ne pas être actif parce que les cellules tumorales se multiplient trop lentement (trop peu de cellules sont affectées à un instant donné qui est celui de l'administration du traitement), qu'elle est peu vascularisée (inaccessibilité des médicaments) ou que sa localisation rend la diffusion des médicaments difficile (barrière hémato-encéphalique).

- **Caractéristiques génétiques du malade (terrain)**

De nombreux anticancéreux doivent être métabolisés soit pour être rendus actifs (activation de prodrogues) soit pour être éliminés. Une réduction d'activité métabolique activatrice (Irinotécan)

ou une augmentation du catabolisme (Cyclophosphamide, Bléomycine) peuvent conduire à une réduction d'activité des anticancéreux.

➤ **Caractéristiques moléculaires de la cellule cancéreuse**

La concentration intracellulaire du cytotoxique peut ne pas être suffisante en raison de :

- La surexpression de certaines protéines, comme la glycoprotéine Pgp 170, entraînant un flux du médicament cytotoxique du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire. La concentration intracellulaire du médicament est donc diminuée, réduisant ainsi son efficacité. Le gène MDR (multidrug resistance) codant pour la gp170, est amplifié dans la cellule cancéreuse ayant acquis une résistance, aboutissant à la surexpression de cette protéine membranaire.
- L'activité de transporteurs membranaires des médicaments : réduction de l'activité de transporteurs d'influx nécessaires à l'entrée du médicament cytotoxique ou surexpression de transporteurs d'efflux (majoration de la sortie) comme la glycoprotéine Pgp 170 qui conduit souvent une diminution de la concentration intracellulaire du médicament, réduisant ainsi son efficacité.
- L'activité de systèmes enzymatiques avec une réduction de l'activation intracellulaire (antifoliques) ou une majoration de la dégradation (désamination de la cytarabine).

On peut aussi observer des modifications de la cible de l'anticancéreux. Ces modifications peuvent être :

- Quantitatives : surexpression de la cible qui conduit à une posologie relative insuffisante du médicament (dihydrofolate réductase surexprimée lors d'un traitement par le méthotrexate).
- Qualitatives : mutations du site de fixation du médicament (mutations des topoisomérases I et II).

Finalement, on peut aussi assister à la mise en place de mécanismes de protection de la cellule cancéreuse par majoration de l'activité de systèmes de réparation de l'ADN ou protection vis-à-vis de la mort cellulaire programmée par apoptose par la surexpression de gènes antiapoptotiques (survivine et résistance aux taxanes) ou la répression de gènes pro-apoptotiques (inactivation du gène suppresseur de tumeurs p53) (Monassier, 2012).

Enfin et malheureusement, la plupart des agents chimiothérapeutiques sont aussi cytotoxiques pour les tissus sains, surtout si la méthode d'administration est intraveineuse. Ceci explique les nombreux effets secondaires de la chimiothérapie, qui sont pour la plupart du temps tardifs et qui

touchent certains organes en particulier, le sang, le cœur, le foie et les reins (Zelnak, 2007; Gerber, 2008). De plus, plusieurs types de résistance à la chimiothérapie ont été observés dans la pratique clinique et ils représentent à leur tour un grand obstacle pour la chimiothérapie. La résistance intrinsèque, la chimiorésistance acquise suite à la surexpression de protéines membranaires telles que les P-glycoprotéines (P-gp 170) et les protéines associées à la MDR (multidrug resistance) ou l'amplification de gènes codant pour des protéines de réparation de l'ADN sont des obstacles couramment rencontrés (Perez-Tomas, 2006).

Chapitre II : Phyto-aromathérapie et cancers

II.1. De la plante à la chimie antitumorale

II.1.1. Introduction

Au travers des âges, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base : nourriture, abris, vêtements et également pour ses besoins médicaux. L'utilisation thérapeutique des extraordinaires vertus des plantes pour le traitement de toutes les maladies de l'homme est très ancienne et évolue avec l'histoire de l'humanité. Bien qu'une grande partie du XX^{ème} siècle ait été consacrée à la mise au point de molécules de synthèse, la recherche de nouveaux agents pharmacologiques actifs *via* le screening de sources naturelles a conduit à la découverte d'un grand nombre de médicaments utiles qui commencent à jouer un rôle majeur dans le traitement de nombreuses maladies humaines (Touafek, 2010).

L'utilisation des plantes médicinales comme source de remède pour se soigner ou prévenir des maladies est originaire des millénaires jusqu'à la récente civilisation chinoise, Indienne et du Proche-Orient. L'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires des végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites.

Trouver un traitement pour certaines maladies telle que les cancers, les maladies neurodégénératives constituent un challenge important pour les scientifiques. Les substances naturelles d'origine végétale, restent un réservoir de nouveaux principes actifs aux activités peu ou pas explorées. Cette source semble inépuisable puisque seule une petite partie des 400000 espèces végétales connues ont été investiguées sur les plans phytochimique et pharmacologique, et que chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents (Touafek, 2010). Les composés phénoliques, les terpénoïdes, les stéroïdes et les alcaloïdes sont des exemples de métabolites secondaires aux nombreuses applications pharmaceutiques qu'il convient d'explorer pour des propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et anticancéreuses...etc (Epifano et al., 2007).

L'approche scientifique des plantes médicinales, propre à la démarche cartésienne et analytique de la vision occidentale, avec des études pharmacologiques et toxicologiques, a permis de décrypter leur composition chimique, de mettre en évidence l'activité de certains composants ou encore de déterminer les doses thérapeutiques ou toxiques. Ces analyses ont corroboré les usages

anciens de nombreuses plantes et la pertinence de ces médecines, reléguées au rang de l'archaïsme et de la superstition. A l'heure actuelle, l'usage de l'ethnopharmacologie, entre science et tradition, a permis de confirmer et d'orienter les recherches en prenant comme point de départ les usages des plantes dans la tradition (Berthoud, 2013).

II.1.2. A la découverte des principes actifs des plantes

La chimie végétale a fait des progrès considérables depuis le début du XIX^{ème} siècle. Constatant la forte activité des poisons végétaux et des drogues psychotropes sur les organismes vivants, c'est tout naturellement vers les plantes toxiques que se sont orientées les premières recherches chimiques. Ces investigations ont permis d'isoler des molécules pures puis de les identifier. C'est la découverte de la morphine en 1804, extraite du latex du pavot à opium (*Papaver somniferum*), qui représente encore aujourd'hui le médicament de référence contre la douleur. Depuis cette époque, la découverte de nouvelles molécules issues du règne végétal n'a cessé de progresser conjointement grâce à la perspicacité des chercheurs mais aussi au progrès des outils analytiques comme les chromatographies sur couche mince, liquide ou gazeuse, la spectrométrie de masse, la spectrophotométrie, la résonance magnétique nucléaire ou les microsondes laser. Les molécules isolées sont ensuite testées par des pharmacologues sur des modèles *in vivo*, des animaux vivants ou des modèles *in vitro* sur des organes isolés ou des cultures cellulaires pour évaluer leur activité thérapeutique. Le règne végétal fournit ainsi à l'industrie pharmaceutique environ le tiers de ses médicaments actuels obtenus par extraction, purification, hémisynthèse ou synthèse totale (quand le procédé d'extraction est très coûteux) (Fleurentin, 2016).

II.1.3. Progrès dans la recherche de nouvelles substances anticancéreuses

A l'heure actuelle, les plantes demeurent indéniablement une source importante de nouvelles matières premières de médicaments, soit parce que leurs constituants sont de précieux principes actifs, soit parce que les chimistes sont parvenus à modifier la structure de certaines molécules qu'elles renferment, afin de les rendre moins toxiques, plus efficaces, ou de leur conférer une meilleure biodisponibilité. L'importance du règne végétal n'a d'ailleurs jamais cessé d'être démentie, que ce soit à travers la découverte des anticancéreux (podophylline, ellipticine, camptothécine, vinorelbine, docétaxel...), des antipaludéens (quinine, artémisinine...), des antalgiques (morphine extraite de l'opium), des anesthésiques (curares, la toxiférine ou la tubocurarine extraite de *Strychnos toxifera*). Il n'existe aucun domaine thérapeutique pour lequel les plantes feraient défaut. En cancérologie, de nombreuses molécules cytotoxiques sont originaires de plantes, même si bien souvent, elles sont produites ensuite par synthèse ou

hémisynthèse. Ces médicaments anticancéreux, provenant du milieu naturel, ont montré leur efficacité dans le traitement de différents types de cancers. L'utilisation des substances naturelles en tant qu'agents anticancéreux a commencé par l'isolement de la podophylline à partir d'une plante de la famille des Berbéridacées (*Podophyllum peltatum*). La podophylline, étant trop toxique, a fait l'objet de modifications structurales pour donner naissance à deux composés antitumoraux (le téniposide Vumon® et l'étoposide Vépéside®) inhibiteurs de la topoisomérase II (Lv M and Xu, 2011). L'ellipticine, du groupe des intercalants dérivés non anthracycliques, fut isolée de la plante de l'Océanie de la famille des Apocynacées (*Ochrosia borbonica*) (Huet and Fleurentin, 2013).

Parmi les médicaments anticancéreux provenant des végétaux, il existe également des vinca-alcaloïdes tels que la vinblastine Velbe® et la vincristine Oncovin®, inhibiteurs de l'assemblage de la tubuline, isolées de la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*) et ses analogues hémisynthétiques, vinorelbine Navelbine® et vindésine Eldisine®. Les taxoïdes, poisons de fuseau et inhibiteurs du désassemblage des microtubules tels que le Paclitaxel Taxol®, isolé de l'If du Pacifique (*Taxus brevifolia*) et le Docétaxel Taxotère®, préparé par hémisynthèse à partir d'un diterpène isolé de l'If Européen (*Taxus baccata*). Les dérivés de la camptothécine comme le topotécan Hycamtin® et l'irinotécan Campto®, inhibiteurs de la topoisomérase I et provenant de l'étude chimique d'un arbre ornemental chinois (*Camptotheca acuminata*) (Lehmann, 2013).

II.2. Arsenal thérapeutique naturel contre le cancer

II.2.1. Introduction

L'apparition de phénomènes de résistance vis-à-vis de la chimiothérapie dans le cas du cancer mais aussi dans le cas de pathologies infectieuses, l'apparition de nouvelles maladies et épidémies comme le Sida, la maladie d'Alzheimer ou la grippe aviaire ainsi que les effets secondaires de certains médicaments et la diversité génétique des cancers appellent à l'amélioration des traitements actuels mais aussi à la découverte de nouveaux médicaments très actifs avec moins d'effets secondaires.

La Nature regorge de nombreuses molécules originales et innovantes qui peuvent être dotées de propriétés thérapeutiques intéressantes et qui ne demandent qu'à être décrites ou améliorées. De plus, la découverte de nouveaux environnements a mené à la découverte de nouvelles espèces vivantes et donc à encore plus de nouvelles substances inconnues qui cachent peut être des potentiels thérapeutiques.

Les recherches scientifiques et les connaissances actuelles en biotechnologie ont montré que les plantes, véritables petites usines pharmaceutiques, sont capables de synthétiser des milliers de molécules diverses qui leurs sont propres et de produire allègrement des substances nommées métabolites secondaires parfois difficilement synthétisables en laboratoire du fait de leurs structures complexes, du coût de production ou du rendement de leurs synthèses. La diversité des substances produites est tellement vaste qu'elle peut faire apparaître des substances auxquelles le chercheur n'aurait peut-être même jamais pensé (Gaascht, 2013).

II.2.2. Métabolites secondaires des plantes

Ce sont des biomolécules présentes dans une plante et qui ne participent pas aux processus essentiels de la survie de celle-ci : le métabolisme, la croissance ou la reproduction (métabolisme primaire) et qui a recours, quant à lui, aux acides nucléiques, aux protéines, aux glucides et aux lipides. Présents dans certaines plantes, ces molécules non-essentiels sont classées selon leur voie de biosynthèse. Structuellement très différents et parfois très complexes, les métabolites secondaires appartiennent à des familles chimiques très diverses telles que les alcaloïdes, les phénols, les flavonoïdes, les anthocyanes, les terpénoïdes, les stéroïdes. La synthèse de ces produits est très fortement influencée par les facteurs environnementaux (nature du sol, ensoleillement, climat) mais également par le niveau de développement de la plante. Ces substances ont comme rôle la survie de la plante dans son environnement. Certaines leur permettent de se protéger contre les prédateurs, les herbivores, les germes pathogènes ou encore contre d'autres plantes pour l'accès aux ressources (lumière, eau et substances nutritives). D'autres leur permettent, quant à elles, de résister au stress environnemental (sécheresse, carences en nutriments), d'attirer des insectes pollinisateurs (couleurs et odeurs) ou d'assurer la symbiose avec d'autres organismes (Gaascht, 2013).

A ce jour, plus de 200000 métabolites secondaires différents ont été découverts et décrits. Certains ont été détournés de leur utilisation première par l'homme et ont aujourd'hui trouvé des applications commerciales en tant que colorants, médicaments ou encore insecticides (Hartmann, 2007; Gaascht, 2013).

II.2.3. Chimio-prévention

Les recherches les plus récentes (dix dernières années) dans le domaine de la génétique font état de l'influence du phénomène appelé épigénétique. Cette branche de la biologie étudie l'impact des comportements individuels et de l'environnement sur l'expression (activation, répression) des gènes portés par les êtres humains. Il est désormais prouvé scientifiquement que l'alimentation, le niveau de stress, l'âge, la qualité de l'environnement, la prise de certains médicaments et la qualité des relations sociales entraînent des modifications importantes sur l'activité génétique, modifiant directement la vulnérabilité à développer, ou non, des maladies, dont le cancer siège en tête de liste (Bourbeau, 2016).

Il est affirmé donc que les habitudes de vie auraient un grand effet sur l'expression génétique pour assurer, ou non, la santé. L'épigénétique, qui rejoint intimement l'approche thérapeutique naturelle, laisse ainsi présager d'importantes modifications dans les années à venir en ce qui concerne la prise en charge des patients, cancérologie incluse. Il fait de plus en plus de sens, pour la majorité des gens, d'adresser les causes ayant permise la manifestation de leur maladie plutôt que de réprimer les symptômes ou combattre la maladie sans garantir à nouveau la santé. Le cancer ne se substitue pas à cette démarche fondamentale. En effet, la richesse de l'approche naturelle est utilisée comme complément à l'oncologie telle que pratiquée actuellement par certains praticiens dans le domaine des médecines complémentaires (Bourbeau, 2016).

Dans cet ordre d'idées, la chimio-prévention est une méthode de prophylaxie qui consiste à utiliser des molécules d'origine naturelle ne présentant pas d'effets toxiques et qui permettent d'empêcher, voire de bloquer l'apparition et le développement de certaines maladies dont les cancers. Bon nombre de ces substances naturelles sont des métabolites secondaires, capables d'interagir sur la modulation des signaux mitogènes, de survie cellulaire, d'apoptose, de régulation du cycle cellulaire, d'angiogenèse ou encore sur des processus intervenant dans le développement de métastases, se retrouvent naturellement au sein même de notre alimentation, notamment dans les fruits et les légumes. Parmi ces agents naturels, on peut notamment citer les flavonoïdes (carotte), les isothiocyanates (chou), les lycopènes (tomate), les indoles, les organosulfures (ail) et les polyphénols (curcuma) (Figure 46) (Surh, 2003). Les isothiocyanates, trouvés dans les légumes de la famille des Brassicacées (choux, brocolis, navets,...), peuvent stimuler l'activité d'enzymes impliquées dans la détoxification des produits carcinogènes. La vitamine C, présente en grande quantité dans les agrumes (oranges, citrons et pamplemousses), est capable de protéger la membrane et l'ADN de la cellule contre les dommages oxydatifs mais également de stimuler l'activité d'enzymes de détoxification. Le β -carotène (carottes, papayes et

potirons) a la capacité de protéger les cellules contre les dommages dus aux radicaux libres. L'épigallocatechine-3-gallate ou EGCG, une molécule contenue dans le thé vert, est l'une des molécules nutritionnelles les plus puissantes capables de contrecarrer l'angiogenèse et la formation de métastases nécessaires à l'invasion des tissus sains par les cellules cancéreuses. La curcumine (curcuma) est, quant à elle, majoritairement reconnue comme la molécule aux propriétés anti-inflammatoires et anticancéreuses les plus puissantes (Gaascht et al., 2010; Steinmetz and Potter, 1996).

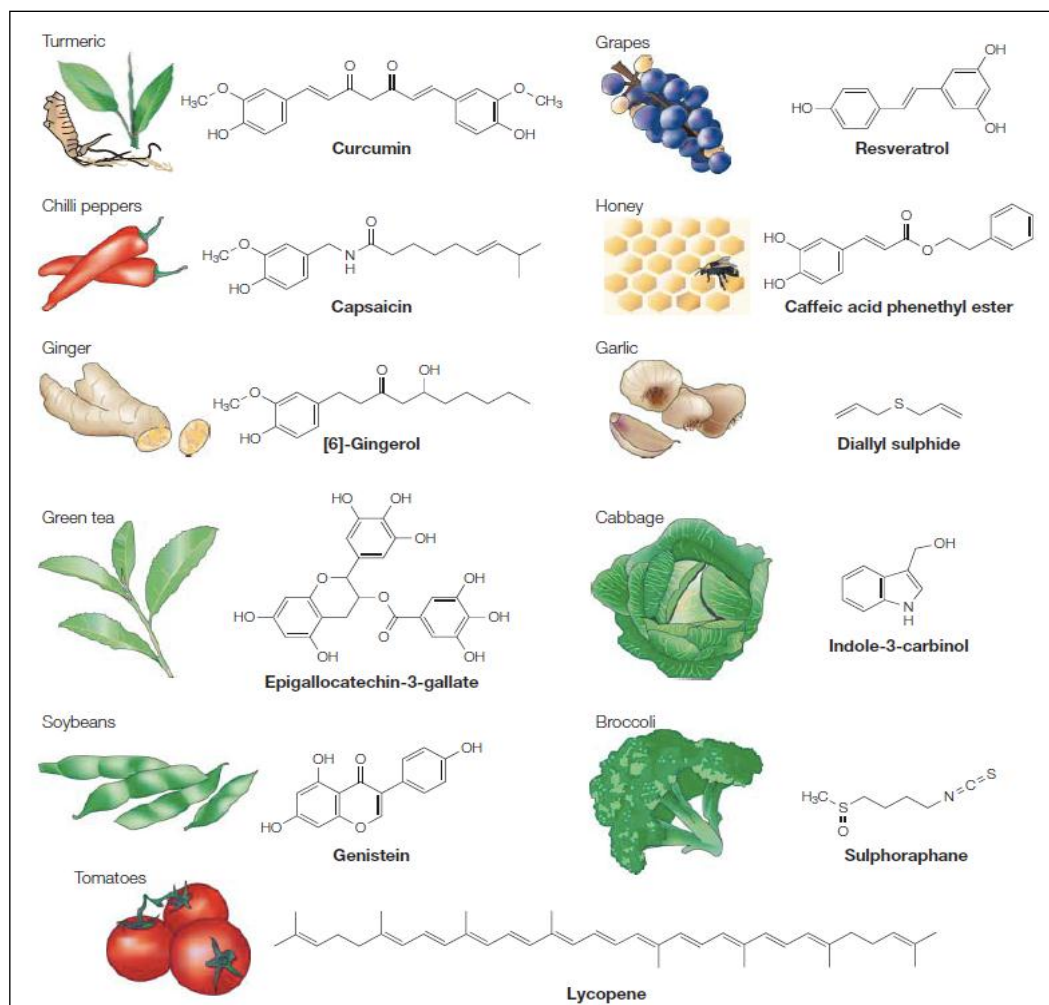


Figure 39 : Représentation schématique de molécules chimiopréventives d'origine naturelle et de leur source. D'après (Surh, 2003) (Gaascht, 2013).

Ces agents chimiopréventifs se retrouvent également dans les préparations alimentaires ayant comme ingrédients de base des fruits ou des légumes. Ainsi, il a été démontré que la molécule polyphénolique resvératrol, que l'on retrouve notamment dans les raisins, est un excellent agent chimiopréventif contre le cancer du foie (Bishayee et al., 2010). Le cacao et les produits

chocolatés sont également une grande source de molécules bioactives. Ils sont connus pour leur richesse en catéchines et en procyanidines, des molécules de la famille des flavonoïdes ayant des effets inhibiteurs sur différents processus de cancérogenèse (Maskarinec, 2009).

Bien que la cuisson ait un effet délétère sur la quantité de certaines molécules chimiopréventives thermosensibles contenues dans les légumes, les fruits et les épices, leur cuisson en présence d'huile, notamment d'huile d'olive, permet d'augmenter la biodisponibilité de ces molécules suite à un processus de micellisation. Ainsi, l'absorption des caroténoïdes contenus dans les carottes crues n'est que de 29% alors que ce taux passe à 52% lorsque ces mêmes légumes ont été cuisinés avec de l'huile (Hornero-Méndez and Mínguez-Mosquera, 2007).

Une autre étude a également démontré que la biodisponibilité du lycopène est bien meilleure dans la sauce tomate que dans une quantité équivalente de tomates crues ingérées. Cette nette augmentation de la biodisponibilité serait liée au hachage et la cuisson qui lysent énormément de cellules et permettent ainsi une plus grande libération de lycopène. L'adjonction d'huile lors de la préparation de la sauce tomate augmente également la biodisponibilité de ce métabolite secondaire chimiopréventif (Gärtner et al., 1997).

II.2.4. Régime hypotoxique et prévention du cancer

L'alimentation représente un pilier de la santé qui requiert une importance d'autant plus grande lors de traitement de chimiothérapie. Les cancérologues admettent qu'un régime alimentaire bien choisi a certainement une action préventive, au moins partielle, dans beaucoup de cancers. Une consommation équilibrée et régulière d'aliments contenant des agents protecteurs (fruits, légumes, épices) diminue de façon significative le risque de développer un cancer (Kirsh et al., 2007) et améliore l'efficacité de nombreux traitements médicamenteux, chimiothérapeutiques et radiothérapeutiques (Singh and Agarwal, 2006). La suppression des laits animaux, la suppression des céréales et la réduction marquée de la cuisson, revient à éliminer de nombreux facteurs cancérigènes, car :

- Les produits laitiers, les céréales modernes et les aliments cuits au-dessus de 110 °C sont de grands fournisseurs de molécules incassables par les enzymes humaines, donc susceptibles d'aller encrasser les cellules, par l'extérieur comme par l'intérieur.
- Le lait de vache contient des facteurs de croissance capables de faire grossir un veau de 200 Kilos en six mois. De tels facteurs pourraient être cancérigènes pour les humains, bien plus que leurs propres œstrogènes ou androgènes (Albanes, 1998).

- Les aliments chauffés au-dessus de 110 °C, en particulier les viandes grillées, sont bourrées de substances cancérigènes : composés nitrés, hydrocarbures aromatiques, polycycliques, amines hétérocycliques (Formand 1999), acrylamide (Mottram et al., 2002).

Des études statistiques, portant sur de vastes séries de malades atteints de telle ou telle variété de cancer, ont permis d'identifier des aliments dangereux et des aliments protecteurs. Le régime hypotoxique est fort indiqué dans la prévention des cancers et des leucémies. En effet, si l'on examine le tableau 8, on constate que, dans ce régime, les aliments dangereux sont très diminués ou absents, alors que les aliments protecteurs sont fortement représentés (Signalet, 2015).

Tableau 8 : prévention des cancers (Comparaison entre les données classiques et le régime hypotoxique) (Signalet, 2015).

ALIMENTS DANGEREUX	REGIME HYPOTOXIQUE
<p>Viandes</p> <p>Graisses en excès</p> <p>Graisses saturées animales</p> <p>Sucres en excès</p> <p>Aliments conservés</p> <p>Fumage</p> <p>Sel</p>	<p>Autorisées, mais crues</p> <p>Nettement diminuées</p> <p>Diminuées et crues</p> <p>Nettement diminués au profit des fruits et du miel</p> <p>Éliminés</p> <p>Toléré car rôle mineur par rapport à la cuisson</p> <p>Autorisé à dose modérée</p>
ALIMENTS PROTECTEURS	REGIME HYPOTOXIQUE
<p>Fruits</p> <p>légumes</p> <p>Huiles végétales</p> <p>Huiles de poisson</p> <p>Antioxydants vitamines A, C, E</p> <p>Minéraux Ca, Mg, Se</p>	<p>Abondants</p> <p>Abondants</p> <p>Abondantes mais obtenues par première pression à froid</p> <p>Abondantes (poisson cru)</p> <p>Prescrits</p> <p>Prescrits</p>
	ELEMENTS PROPRES AU REGIME HYPOTOXIQUE
	<p>Suppression des laits animaux</p> <p>Suppression des céréales domestiques</p> <p>Forte réduction des aliments cuits</p>

II.2.5. Approches thérapeutiques naturelles face au cancer

La santé est maintenue en équilibre en s'appuyant sur trois piliers majeurs qui sont, les émonctoires, l'immunité et le psychisme. Dans toutes les pathologies lourdes, cancers entre autres, il paraît nécessaire de préserver l'équilibre entre ces trois piliers, sans oublier le rôle déterminant de la diététique. Celle-ci devra être riche en vitamines naturelles, en oligo-éléments assimilables et en éléments antioxydants (tanins comme dans le thé vert, flavonoïdes comme

dans la propolis), la vitamine C (acérola, cassis, églantier, cynorhodon), la vitamine E (huile de germe de blé, de bourrache, de colza, d'onagre et surtout de Perilla qui recèle 65% d'oméga-3 et 92% de gamma-tocophérol, la partie active de la vitamine E), le bêta-carotène (myrtille, carotte) font partie des antioxydants. Il faudra donc donner la priorité à une alimentation naturelle basée sur les légumes, les légumineuses, les fruits et les huiles de première pression à froid (Willem, 2004).

Les approches thérapeutiques énumérées ci-dessous ne représentent en rien une prescription ni un protocole officiel mais une suggestion, émanant d'un professionnel qualifié, qui devra être évaluée par le thérapeute, afin de confirmer leur pertinence d'usage. Ces produits, ces plantes et ces huiles essentielles ne prétendent pas substituer un traitement allopathique justifié et ne cherchent pas à écarter l'expertise du corps médical. Le choix de produit reposera sur une compatibilité entière avec la médication et la démarche oncologique proposées.

II.2.5.1. Le premier pilier : libérer les émonctoires

Les émonctoires sont des organes d'épuration chargés d'éliminer les toxines de l'organisme : le foie, les reins, les intestins, les poumons et la peau. Ils nettoient le sang et compensent un certain temps les excès et les carences d'une alimentation déséquilibrée. Celle-ci trop riche en produits raffinés, en graisses saturées, en protéines, en sucres rapides à index glycémiques élevés et en sel engendre un encrassage de l'organisme. Ce type d'alimentation est également sources de carences en minéraux et en fibres. Cet encrassage a, entre autre, pour conséquence la production d'acidité et de mucus qui génèrent diverses pathologies digestive, cutanée, circulatoire, cancéreuse...

Le corps humain étant encrassé, il est indispensable de favoriser les émonctoires naturels en les stimulant et en augmentant la fonction libératoire des toxines. Le foie est le premier de tous ces émonctoires. C'est la grande usine d'épuration. Il apparaît indispensable d'en tenir compte lors de prescriptions de plantes dans les traitements anticancéreux souvent éminemment toxiques.

Parmi les plantes cholagogues, cholérétiques, actives sur les hépatocytes, nous citerons quelques majeures : Desmodium (*Desmodium adscendens*), chardon marie (*Silybum marianum*), romarin (*Rosmarinus officinalis*), artichaut (*Cynara scolymus*), pissenlit (*Taraxacum dens leonis*), boldo (*Peumus boldus*), chrysanthelium (*Chrysanthelium americanum*), radis noir (*Raphanus sativus niger*), fumeterre (*Fumaria officinalis*)...etc. (Willem, 2004).

Il faut bien sûr drainer les autres émonctoires :

- ❖ la digestion boldo *Peumus boldus*, mauve *Malva sylvestris*, séné *Cassia angustifolia*, artichaut *Cynara scolymus*, chicorée *Cichorium intybus*...
- ❖ la fonction rénale bouleau *Betula pendula*, queue de cerise *Prunus cerasus*, chiendent *Agropyron repens*, pissenlit *Taraxacum dens leonis*, asperge *Asparagus officinalis*, orthosiphon *Orthosiphon stamineus*...
- ❖ la fonction cutanée bardane *Arctium lappa*, pensée sauvage *Viola tricolor*...
- ❖ le système réticulo-endothélial bouleau *Betula pendula*, chêne *Quercus robur*, ginseng *Panax ginseng*...
- ❖ le drainage lymphatique par les huiles essentielles de cyprès (*Cupressus sempervirens*) et de lentisque pistachier (*Pistacia lentiscus*) (Willem, 2004).

Vitamines et oligo-éléments

Se protéger des radicaux libres, est une nécessité absolue. Pour cette raison, on prendra des substances antioxydantes directes ou indirectes. L'organisme humain détient des systèmes adaptés constitués d'enzymes : la catalase, la glutathion-péroxydase, la superoxyde dismutase (SOD). Cependant, ces enzymes ne s'animent que couplées avec des oligo-éléments tels que le zinc, le sélénium, le cuivre, le manganèse. Par contre, les vitamines (A, C, E), le bêta-carotène et les substances d'origine végétale fournies par la phytothérapie (surtout les flavonoïdes et les iridoïdes) piègent directement les radicaux libres (Willem, 2004).

✓ *Plantes antioxydantes riches en vitamines :*

- Bêta-carotène : précurseur de la vitamine A, les principales sources sont les légumes et les fruits jaunes ou verts (carotte, épinard, mangue, abricot...) la chlorella, la myrtille ou la spiruline.
- Vitamine C : l'acérola, le cynorrhodon, l'argousier, le kiwi, les agrumes...
- Vitamine E : le germe de blé, le soja, l'huile de périlla (98% de gamma-tocophérol qui est plus efficace que l'alpha-tocophérol).

✓ *Deux oligo-éléments antioxydants :*

- Le sélénium qui entre dans la composition de la glutathion-péroxydase.
- Le zinc est présent dans différentes métallo-enzymes (SOD=superoxyde dismutase).

✓ *Plantes antioxydantes riches en flavonoïdes :*

- Chardon marie (*Silybum marianum*) (la silymarine supprime ou diminue l'effet des substances qui induisent une nécrose ou une cirrhose du foie) ;

- Ginkgo (*Ginkgo biloba*) (les ginkgolides sont des piègeurs des radicaux libres à tropisme vasculaire) ;
- Thé vert (*Camellia sinensis*) (propriétés antioxydantes dues à la présence de polyphénols) (Willem, 2004).

II.2.5.2. Le deuxième pilier : l'immunité

- **Réguler le système hormonal**

Il s'avère souvent utile de réguler le système hormonal afin de renforcer l'immunité. Cette visée thérapeutique trouve toute son importance dans les cancers hormono-dépendants. Il existe des plantes sédatives à action centrale qui peuvent influencer le système hormonal.

- Actions sur les ovaires : l'alchémille (*Alchemilla vulgaris*) dynamise la sécrétion de la progestérone, le gattilier (*Vitex agnus castus*) inhibe la sécrétion œstrogénique, le grémil (*Lithospermum officinale*) freine l'hypophyse et diminue la sécrétion de la prolactine (Willem, 2004).
- Les surrénales sont stimulées par le cassis (*Ribes nigrum*, Bourgeons macérat glycéric 1D).
- La thyroïde est inhibée par le lycoper (*Lycopus europaeus*), le colchique (*Colchicum autumnale*) et les huiles essentielles de Girofle (*Syzygium aromaticum*) et de Myrte vert (*Myrtus communis*) la stimulent.
- ✓ Certaines huiles essentielles ont une action *hormone-like* :
 - HE Cyprès de Provence (*Cupressus sempervirens*)
 - HE Epinette noire (*Picea mariana*)
 - HE Fenouil doux (*Foeniculum dulcis*)
 - HE Pin sylvestre (*Pinus sylvestris*)
- ✓ Plusieurs plantes stimulent les défenses immunitaires. Parmi les majeures, nous retenons :
 - Le lapacho (*Tabebuia impetiginosa*) est une plante qui protège le foie. Elle a des vertus antivirales, antiparasitaires, antimycosiques et probiotiques, c'est une plante majeure immunostimulante.
 - L'échinacée (*Echinacea angustifolia*) est également une plante antivirale et probiotique, avec des propriétés anti-inflammatoires. Tout comme le lapacho, cette plante a aussi d'immenses capacités immunostimulantes.

- Le desmodium (*Desmodium adscendens*) d'Afrique est une des plus grandes plantes régénératrices de la cellule hépatique. Le foie est le garant de l'immunité. Par cette fonction, le desmodium est immunostimulant. Il est également antiviral.
- Le gui (*Viscum album*) stimule l'immunité cellulaire et humorale.
- La chlorella (*Chlorella vulgaris*) stimule la production d'interféron, l'activité macrophagique et la sécrétion du TNF (*tumor necrosis factor*).
- Le jus de noni (*Morinda citrifolia*) est antioxydant, anticancéreux et immunostimulant (Amy, 2012).
- Le ginseng (*Panax ginseng*) antioxydant, il stimule le système réticulo-endothélial en activant la phagocytose, la production d'immunoglobulines, de globules blancs, de lymphocytes T et B ainsi que des lymphokines et des interférons (Willem, 2004).

- **L'importance des huiles essentielles**

Les huiles essentielles phénolées, à aldéhydes et à alcools sont immunostimulantes et immunomodulantes. Par ailleurs, elles ont une activité antibactérienne et antivirale incomparable (hépatite, sida, sclérose en plaque) (Willem, 2004).

- HE *Daucus carota* (carotte cultivée semences)
- HE *Melaleuca alternifolia* (arbre à thé feuille)
- HE *Origanum compactum* (origan compact sommité fleurie)
- HE *Pelargonium x asperum* (géranium rosat fleur)
- HE *Ravensara aromatica* (ravensare aromatique feuille)
- HE *Satureja montana* (sarriette des montagnes sommité fleurie)
- HE *Syzygium aromaticum* (girofle clou)
- HE *Thymus vulgaris* CT *Thujanol* (thym vulgaire à Thujanol sommité fleurie)

II.2.5.3. Le troisième pilier : le mental

Si le mental fléchit, il s'ensuivra une dépression immunitaire. Les plantes sédatives à action centrale rééquilibrent le psychisme.

- **Les plantes majeures**

- Le millepertuis (*Hypericum perforatum*) appelée également « l'herbe de mélancolie », a pour fonction principale de stimuler la sécrétion des médiateurs chimiques cérébraux dont la mélatonine (comme le *Chrysanthellum americanum*) mais de façon beaucoup plus

intense. Riche en polyphénols dont les flavonoïdes, le millepertuis possède également une action antioxydante.

- L'aubépine (*Crataegus oxyacantha*) est sédative du système nerveux central, antispasmodique surtout du cœur.
- Dans les syndromes dépressifs, la valériane (*Valeriana officinalis*), le houblon (*Humulus lupulus*) et la passiflore (*Passiflora incarnata*) compléteront le millepertuis ainsi que la ballote (*Ballota foetida*) (vagotonique, sédative et anxiolytique). (Willem, 2004).
- Enfin il est très utile de dynamiser l'énergie vitale de l'individu. Plusieurs plantes sont conseillées : le ginseng (*Panax ginseng*), l'éleuthérocoque (*Eleutherococcus senticosus*), le guarana (*Paullinia Cupana*), le schisandra (*Schisandra chinensis*), sans oublier les abeilles au travers de leur gelée royale (Willem, 2004).

- **Les huiles essentielles et le système nerveux**

Les huiles essentielles utilisées sont antispasmodiques, calmantes, sédatives, relaxantes :

- HE *Cananga odorata* (ylang-ylang)
- HE *Chamaemelum nobile* (camomille romaine)
- HE *Citrus aurantium ssp aurantium* (petit grain bigarade)
- HE *Citrus reticulata* (mandarine)
- HE *Lavandula vera* (lavande vraie)
- HE *Ocimum basilicum ssp basilicum* (basilic exotique)
- HE *Origanum majorana* (marjolaine à coquilles) (Willem, 2004).

II.2.5.4. Soins de support et l'amélioration de la qualité de vie des patients atteints d'un cancer

Les traitements conventionnels en cancérologie ont avancé, certes, avec de meilleurs résultats pour bon nombre de cancers, mais parfois avec des effets secondaires importants et qui entraîne même des séquelles. C'est pourquoi l'objectif de la cancérologie a évolué : ce n'est plus seulement de guérir ou de prolonger la survie dont il est question, mais aussi de prendre en charge des patients dans leur globalité d'être et de préserver ou d'améliorer leur qualité de vie en prenant en compte également leur avis. En effet, ceux-ci sont le plus à même d'apprécier la qualité de vie qu'ils souhaitent. Grâce à cette amélioration, leur prise en charge n'en sera que meilleure, ce qui, de plus, favorisera l'optimisation de la stratégie thérapeutique. Les soins de support, apparus dans les années 1990, visent à assurer la meilleure qualité de vie possible aux patients sur les plans physique, psychologique et social à tout moment de la vie. Ils peuvent être

prodigués tout au long de la maladie (Giraud, 2016b). Il est désormais reconnu que l'arsenal thérapeutique naturel complète parfaitement les interventions médicales, et ce, en toute compatibilité et sécurité, pour le mieux-être des patients. Les objectifs directement visés par l'approche complémentaire sont essentiellement les suivants :

- Minimiser les complications associées à la chirurgie, à la radiothérapie et à la chimiothérapie ;
- Développer une meilleure tolérance au traitement et augmenter son efficacité ;
- Réduire la toxicité du traitement et maximiser le retour à la santé.

Pour atteindre ces objectifs, les approches naturelles, telles que la médecine chinoise, la naturopathie, la phytothérapie, l'aromathérapie et l'homéopathie, chercheront à influencer le plus grand nombre possible de mécanismes impliqués dans le développement, la progression, la destruction et l'élimination des cellules cancéreuses.

Voici les éléments majeurs sur lesquels un thérapeute qualifié sera en mesure de travailler avec le support de suppléments et de bons changements alimentaires :

- Relancer et renforcer l'immunité ;
- Bloquer l'angiogenèse ;
- Réduire le processus inflammatoire excédentaire ;
- Favoriser l'apoptose ;
- Réduire la synthèse d'enzymes et de facteurs de croissance essentiels à la survie des cellules cancéreuses ;
- Créer de l'interférence dans la multiplication des cellules cancéreuses, limiter l'invasion et les métastases ;
- Protéger l'ADN des cellules saines et détruire celle des cellules devenues cancéreuses ;
- Faciliter la détoxification des organes.

Les traitements du cancer sur lesquels les médecines complémentaires offrent de grands bénéfices sont la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie :

- Pour la chirurgie, l'approche naturelle permet d'accélérer la réparation des tissus en stimulant la production de nouvelles cellules saines, favoriser une cicatrisation souple, lutter contre l'infection et contrôler l'inflammation.
- Pour la radiothérapie, nous chercherons à augmenter d'abord l'efficacité du traitement, réduire les risques de fibrose induite par la radiation, protéger les cellules saines

environnant l'endroit ciblé par le traitement, réduire les dommages causés à la peau, protéger les vaisseaux sanguins et diminuer l'athérosclérose qui se développe suite au traitement.

- Concernant la chimiothérapie, la démarche adaptée sera fonction de l'agent ou la combinaison d'agents de chimiothérapie sélectionnés par l'oncologue, leur mode d'action, les effets secondaires qui leurs sont propres, la durée du traitement et le type de cancer. Nous chercherons à réduire la résistance des cellules au traitement choisi, à protéger le bagage génétique sainement exprimé, à limiter les dommages sur le cœur, les reins, le foie et les nerfs et finalement à limiter les impacts dégénératifs pouvant contribuer à la récurrence d'un second cancer chimio-induit (Bourbeau, 2016).

II.2.5.4.1. A quel moment de la maladie peut-on utiliser l'aromathérapie ?

L'aromathérapie peut s'utiliser à tous les stades de la maladie : dès l'annonce de la maladie, au cours des traitements allopathiques (en pré- ou postopératoire, pendant et après la chimiothérapie, pendant la radiothérapie, au cours d'un traitement d'hormonothérapie), au cours des rémissions, à la fin des traitements allopathiques, au moment des soins palliatifs (Giraud, 2016b).

II.2.5.4.2. Aide précieuse de l'aromathérapie dans l'amélioration de la qualité de vie

▪ Dès l'annonce de la maladie :

Les huiles essentielles telles que l'HE du petit grain bigarade (*Citrus aurantium ssp aurantium* feuilles), de la mandarine (*Citrus reticulata* zeste) aideront à combattre les angoisses, les peurs liées à la maladie et aux traitements (Giraud, 2016b).

▪ Après une intervention chirurgicale

- pour la prévention des hématomes ainsi que pour une meilleure cicatrisation et prévention des cicatrices chéloïdes (hypertrophiques), l'HE de l'hélichryse italienne (*Helichrysum italicum ssp serotinum*) apportera toute son aide dans les jours suivant l'intervention (Giraud, 2016b).
- pour diminuer l'œdème lymphatique pouvant survenir après des curages ganglionnaires : Les mélanges d'huiles essentielles à base d'HE de l'hélichryse italienne (*Helichrysum italicum ssp serotinum*), HE de citron (*Citrus limonum* zeste), HE de tea tree (*Melaleuca alternifolia*) et d'HE de niaouli (*Melaleuca quinquenervia cineoliferum*) associées à des huiles végétales en massage éviteront bien des ponctions de lymphes après certaines interventions chirurgicales.

▪ *Au moment de la chimiothérapie*

Les médicaments utilisés en chimiothérapie entraînent parfois des effets secondaires importants. L'aide aromathérapique va les diminuer voire empêcher leur apparition et de ce fait diminuer considérablement la prise de médicaments allopathiques qui sont prescrits pour gérer ces effets secondaires.

❖ *Troubles de l'appareil digestif (nausées et vomissement)*

L'HE de citron (*Citrus limonum* zeste) (Yavari et al., 2014) permet de diminuer considérablement les nausées, les vomissements et également la diminution nette de la prise d'antiémétiques classiques voire leur suppression totale. L'huile essentielle de menthe poivrée (*Mentha x piperita*) (Ghani and Ibrahim, 2013) peut y être associée également si les vomissements sont importants.

❖ *Troubles stomatologiques*

Les mucites (inflammation de la cavité buccale) font partie des effets secondaires fréquents des chimiothérapies. Elles sont l'expression soit de la toxicité directe de l'agent utilisé, soit de l'immunodépression secondaire facilitant les mycoses. Elles peuvent s'observer avec la grande majorité des protocoles, mais sont plus fréquentes avec le méthotrexate, d'autant plus que les doses sont plus importantes, le Fluoro-uracile (5 FU®) en continu, les alcaloïdes de la pervenche : Vinblastine (Velbé®), Vincristine (Oncovin®), Vindésine (Eldisine®), Vinorelbine (Navelbine®). Elles se localisent souvent dans la cavité buccale, mais peuvent s'étendre à l'ensemble du tube digestif (Giraud, 2016b).

Les préparations à base d'HE de lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*), d'HE de tea tree (*Melaleuca alternifolia*) et d'HE de niaouli (*Melaleuca quinquenervia*) diluées dans une huile végétale de germe de blé et utilisées en émulsion avec la salive sont très efficaces pour combattre ces affections buccales aphtes et mycoses (Giraud, 2016b).

❖ *La constipation*

La constipation est fréquente et ses causes en sont diverses : ce peut être la maladie cancéreuse elle-même comme les localisations digestives et péritonéales, les modifications du mode de vie (alimentation, alitement) et les médicaments : morphiniques, chimiothérapie et produits associés. En effet, les antiémétiques, en particulier les sétrons (tels que Ondansétron Zophren®, Granisétron Kytril®) peuvent être responsables de phénomènes de constipation parfois durables et opiniâtres (Giraud, 2016b).

L'HE de basilic (*Ocimum basilicum ssp basilicum*) et l'HE de gingembre (*Zingiber officinalis*) aident à combattre la constipation.

❖ *Le goût modifié*

L'huile essentielle de citron (*Citrus limonum*) aide à retrouver le goût normal des aliments. De nombreux médicaments modifient le goût comme le docétaxel (Taxotère®) (Giraud, 2016b).

❖ *Trouble cutanés des pieds et des mains*

Certaines chimiothérapies et des thérapeutiques ciblées occasionnent des troubles trophiques cutanés des extrémités, tel que le syndrome main-pied appelé aussi érythrodysesthésie palmoplantaire. Ce syndrome peut être délétère en termes de qualité de vie lors des chimiothérapies. Les chimiothérapies responsables du syndrome main-pied sont la capécitabine (Xéroda®), Topotécan (Hycamtin®), Docétaxel (Taxotère®), Doxorubicine (Caelyx®). Les thérapeutiques ciblées telles que Cétuximab (Erbix®), Sorafénib (Nexavar®) et le Sunitinib (Sutent®) sont aussi responsables du syndrome main-pied (Giraud, 2016b).

Ce syndrome peut être atténué par les huiles essentielles en massage de l'HE lavande aspic (*Lavandula latifolia spica*), de l'HE tea tree (*Melaleuca alternifolia*), de l'HE héliochryse italienne (*Helichrysum italicum ssp serotinum*) diluée avec une huile végétale (Giraud, 2016b).

❖ *L'acné médicamenteuse*

L'utilisation des anticorps monoclonaux à visée anti-VEGF, ou anti-EGF a fait apparaître de nouveaux effets secondaires à type d'acné purulente du visage et de la partie supérieure du corps. Cet effet secondaire peut être traité par aromathérapie, ce qui permet d'éviter la prescription des antibiotiques comme la doxycycline. Les principales molécules donnant l'acné sont la capécitabine (Xéroda®), Cétuximab (Erbix®), Erlotinib (Tarceva®), Panitumumab (Vectibix®). L'application d'hydrolat de lavande officinale est très utile sur la zone acnéique ainsi qu'une prise par voie orale de l'HE tea tree (*Melaleuca alternifolia*) (Giraud, 2016b).

❖ *Les œdèmes*

Les œdèmes et épanchements des séreuses liés au docétaxel (Taxotère®) n'apparaissent pas ou disparaissent avec l'HE de citron (*Citrus limonum*). Bien d'autres huiles essentielles sont efficaces pour diminuer ces œdèmes : l'HE de cyprès (*Cupressus sempervirens*), de lentisque pistachier (*Pistacia lentiscus*), de romarin officinal à 1,8 cinéole (*Rosmarinus officinalis cineoliferum*) (Giraud, 2016b).

❖ *Epistaxis (saignement de nez)*

Certains traitements occasionnent des épistaxis comme le Bévacicumab (Avastin®), l'HE de ciste ladanifère (*Cistus ladaniferus*) deux à trois gouttes sur une mèche de coton arrête le saignement (Giraud, 2016b).

▪ *Au moment de la radiothérapie*

Les effets secondaires sont différents d'une personne à l'autre, selon le type de l'irradiation, selon la zone traitée et selon l'état général du malade. Les principaux effets secondaires sont :

- ✓ Un érythème de la peau à l'endroit de la zone irradiée ;
- ✓ En cas d'irradiation de la bouche, du cou, du haut du thorax : des aphtes, des difficultés pour avaler, un manque de salive ;
- ✓ En cas d'irradiation de l'abdomen : des nausées, des diarrhées ;
- ✓ En cas d'irritation du petit bassin : des troubles urinaires, des diarrhées.

L'huile essentielle de niaouli (*Melaleuca quinquenervia cineoliferum*) est intéressante pour prévenir les radiodermites provoquées par la radiothérapie, surtout pour les radiothérapies du sein et les radiothérapies cervicales (cou) (Giraud, 2016b).

▪ *Au moment d'une hormonothérapie*

Les HE telles que hélichryse italienne (*Helichrysum italicum ssp serotinum*), HE saro (*Cinnamosma fragrans*) soulagent bien les douleurs induites par les traitements d'hormonothérapie comme Létrozole Femara®, Anastrozole Arimidex®, Exémestane Aromasine® (Giraud, 2016b).

▪ *Au moment des soins palliatifs*

La voie d'administration des huiles essentielles la plus intéressante sera celle du massage, ainsi que la diffusion atmosphérique. Les douleurs pourront être atténuées par certaines HE comme les HE de menthe poivrée (*Mentha x piperita*), de saro (*Cinnamosma fragrans*), de basilic (*Ocimum basilicum*). Ces HE pourront permettre de diminuer les doses des antalgiques, tels que les morphiniques qui entraînent parfois des effets secondaires gênants (Giraud, 2016b).

L'anxiété, les angoisses et les troubles du sommeil seront atténués avec les HE telles que lavande vraie (*Lavandula vera*), mandarine (*Citrus reticulata*), petit grain bigarade (*Citrus aurantium ssp aurantium* feuille), estragon (*Artemisia dracunculus*), marjolaine à coquilles (*Origanum majorana*), mais bien d'autres huiles essentielles pourront être également utilisées.

Les escarres répondent bien aussi aux traitements des huiles essentielles comme l'hélichryse italienne (*Helichrysum italicum ssp serotinum*), le ciste ladanifère (*Cistus ladaniferus*), la myrrhe (*Commiphora myrrha*), le pistachier (*Pistacia lentiscus*).

Le hoquet souvent difficile à traiter en allopathie répondra bien à des huiles essentielles antispasmodiques comme HE estragon (*Artemisia dracunculus*) (Giraud, 2016b).

Les HE peuvent également apporter leurs aides dans bien d'autres domaines en soins palliatifs pour la fin de vie, où les HE comme l'encens oliban (*Boswellia carterii*), la myrrhe (*Commiphora myrrha*), la pruche (*Tsuga canadensis*) ou le nard de l'Himalaya (*Nardostachys jatamansi*) se révèlent d'une très grande efficacité pour apaiser le mourant (Giraud, 2016b).

En conclusion, l'aromathérapie, à côté des autres médecines complémentaires, peut améliorer considérablement la qualité de vie des patients atteints de cancer au cours des différentes étapes de la maladie, tant au moment des traitements allopathiques, qu'à la fin des traitements conventionnels, qu'au moment des rémissions, ou encore lors des soins palliatifs. La société Américaine d'oncologie clinique (ASCO) a déclaré que la mesure de la qualité de vie était devenue un des éléments essentiels dans l'évaluation de l'impact des thérapeutiques anticancéreuses (Giraud, 2016b).

II.3. Données actuelles sur quelques plantes médicinales et huiles essentielles anticancéreuses.

II.3.1. Exemples de plantes médicinales anticancéreuses

De nombreux malades atteints de cancers ont recours à des plantes médicinales en plus de la prise en charge de la médecine dite conventionnelle. Parmi les plus utilisées, on trouve le curcuma (*Curcuma longa*) et le thé vert (*Camellia sinensis*). Des études épidémiologiques suggèrent un effet protecteur d'une consommation importante de thé vert sur plusieurs types de cancers. Les données cliniques sont par ailleurs trop limitées pour conclure sur l'intérêt de ces plantes chez les malades atteints de cancers. Malgré une évaluation qui reste insuffisante, ces plantes peuvent être utilisées par des malades qui cherchent, dans les produits naturels, des moyens d'améliorer leurs chances de guérison, d'éviter les récives ou d'augmenter leur durée de vie (Huet and Fleurentin, 2013).

En 2006, 42 % des médicaments anticancéreux ayant été utilisés en thérapeutique étaient d'origine naturelle dont une part importante d'origine végétale ou fongique (Newman and Cragg, 2012). Les plantes concernées sont néanmoins toxiques et fournissent par extraction ou par

hémisynthèse, ces médicaments dispensés généralement dans des services hospitaliers spécialisés en oncologie. Certains cancers sont aujourd'hui curables mais les décès imputés à cette maladie restent nombreux. Les traitements présentent par ailleurs de fortes toxicités générant des effets secondaires sources d'inconfort important pour les malades.

Quelques plantes sont plébiscitées pour leurs propriétés anticancéreuses et semblent constituer un recours important parmi les malades atteints de cancers (Molassiotis et al., 2005). L'usage du curcuma (*Curcuma longa* L.) et du thé vert (*Camelia sinensis* L.) semble ainsi répandu chez les malades à travers le monde. Ces deux plantes ont pour point commun d'avoir fait l'objet de nombreuses études pharmacologiques précliniques ayant mis en évidence leur capacité à interférer à plusieurs stades des processus de cancérisation. Différents modèles expérimentaux ont ainsi permis de mettre en évidence la capacité d'extraits ou de molécules actives pures à inhiber plusieurs mécanismes impliqués dans le processus cancéreux (Huet, 2012).

II.3.2. Activités antioxydante et antitumorale des huiles essentielles

L'activité antioxydante des huiles essentielles est attribuable à certains types de molécules: les phénols (thymol, carvacrol...), les alcools monoterpéniques (linalol, menthol, géraniol, citronellol, terpinéol, terpinène-4-ol, alpha-bisabolol...), les oxydes monoterpéniques (1,8-cinéole), les aldéhydes monoterpéniques (citral = géraniol + néral, citronellal...), les cétones monoterpéniques (menthone, pulégone, carvone...) et quelques monoterpènes (alpha et gamma-terpinène) ou sesquiterpènes (caryophyllène), un alkylbenzène (la myristicine), enfin des composés organosulfurés volatils (sulfure, disulfure et trisulfure de diallyle). Ces composés volatils, aux propriétés antioxydantes, assurent une activité chimiopréventive chez le rat et la souris (Bonnafoos, 2013). En général, ces huiles essentielles constituées de terpénoïdes exercent une action de chimioprévention (activation des phases d'inductions des enzymes qui interviennent dans la détoxification : exemple : glutathion S-transférase) et des activités chimiothérapeutiques (exemple : inhibition de la prolifération des cellules tumorales) observables sur des modèles de tumeurs induites chez des rongeurs (Bonnafoos, 2013).

II.3.2.1. Des études très récentes concernant les huiles essentielles avec ou sans identification de molécule active

Les vapeurs volatiles de l'huile essentielle de *Litsea cubeba* produiraient sur le carcinome du poumon non à petites cellules deux effets distincts : induction de l'apoptose et blocage de la prolifération cellulaire cancéreuse (Seal et al., 2012). Une étude portant sur la bioactivité de 20

huiles essentielles d'origine herbacées ou agrumes (Mitoshi et al., 2012) a été effectuée en termes d'activité inhibitrice de l'ADN polymérase de mammifères, d'activité inhibitrice de la croissance de cellules cancéreuses du côlon, activité anti-allergique, activité de libération de la β -hexosaminidase dans les cellules basophiles de rat leucémique (traitées avec du calcium ionophore) et activité antioxydante. Parmi toutes les huiles essentielles testées, celle de la camomille matricaire (*Matricaria chamomilla*) a montré la plus forte inhibition, l'effet le plus significatif sur les cellules cancéreuses en croissance et sur la dégranulation des mastocytes, lui conférant la possibilité d'être utilisée comme candidate en bioactivité en accompagnement thérapeutique. Pour examiner le mécanisme d'action sous-jacente à l'activité anticancéreuse de l'huile essentielle de tea tree (*Melaleuca alternifolia*) (Ireland et al., 2012), des chercheurs ont effectué des modifications des cellules immunitaires chez des souris porteuses de tumeurs sous-cutanées, en réponse à des traitements topiques d'huile essentielle de tea tree (diluée à 10% dans du diméthylsulfoxyde DMSO). Ces changements ont été évalués par cytométrie en flux et immunohistochimie. La cytotoxicité directe de l'huile essentielle sur les cellules tumorales *in vivo* a été évaluée par microscopie électronique à transmission. Il a été défini que des études ultérieures devraient se concentrer sur l'amélioration de la cytotoxicité directe de l'huile essentielle de tea tree en augmentant la pénétration épidermique pour permettre une optimisation de la libération des composés terpéniques *in situ*, afin de participer efficacement à la clairance des tumeurs, à long terme. En se basant sur les usages traditionnels d'utilisation des huiles essentielles de certaines espèces d'eucalyptus pour des fins thérapeutiques, une étude *in vitro* a été effectuée sur le potentiel cytotoxique des huiles essentielles de feuilles (jeunes et adultes) d'*Eucalyptus benthamii* et de ses terpènes (alpha-pinène, terpinène-4-ol et gamma-terpinène) sur des lignées cellulaires cancéreuses (Döll-Boscardin et al., 2012), et a confirmé le potentiel antitumoral. L'huile essentielle de noix de muscade (*Myristica fragrans*) ainsi que son composé, la myristicine, montrent un effet inhibiteur significatif sur la croissance des lignées de cellules cancéreuses du côlon (Piras et al., 2012). L'huile essentielle de romarin officinal (*Rosmarinus officinalis*) et ses trois composés principaux, 1,8-cinéole, alpha-pinène, bêta-pinène, ont été évalués *in vitro*, sur leurs activités antibactériennes et sur leurs propriétés cytotoxiques sur les lignées de cellules cancéreuses du carcinome de l'ovaire et du foie, activités importantes et doses dépendantes (Wang et al., 2012). Des études ont porté sur la composition de l'huile essentielle du basilic (*Ocimum basilicum*) et la relation avec l'activité *in vitro* anticancéreuse (Kathirvel and Ravi, 2012), sur des lignées cellulaires de cancer cervical (humain), des lignées cellulaires de carcinome épithélial laryngé (humain) et sur des fibroblastes embryonnaires de souris. Les résultats ont révélé une cytotoxicité potentielle. Devant la nécessité de développer de nouvelles

stratégies thérapeutiques, et en partant du fait que la majorité des médicaments anticancéreux sont d'origine naturelle, l'étude de la cytotoxicité de l'huile essentielle de sauge officinale (*Salvia officinalis*) ainsi que ses composants monoterpéniques majoritaires (thuyone, bêta-pinène, 1,8-cinéole) a permis de démontrer un effet très positif en utilisation en oto-rhino-laryngologie (Sertel et al., 2011a). L'huile essentielle d'origan et son extrait éthylacétate ont été évalués quant à leurs activités positives : antimalaria, antioxydante et cytotoxique. L'évaluation a été positive et a démontré la non-toxicité de cette huile essentielle (El Babili et al., 2011). L'huile essentielle de thym (*Thymus vulgaris*) inhibe la croissance cellulaire des carcinomes épidermoïdes (tête et cou). Les gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la mort cellulaire et le processus de cancérisation pourraient être des cibles impliquées dans l'activité cytotoxique de l'huile essentielle de thym au niveau transcriptionnel. Les trois voies les plus réglementées de manière significative par l'huile essentielle de thym étaient la signalisation de l'interféron, la N-glycanes biosynthèse et la signalisation régulée extracellulaire des kinases 5 (Sertel et al., 2011b).

Afin d'identifier l'induction sélective de l'apoptose dans des lignées cellulaires de la peau, aux stades précancéreux et cancéreux, l'huile essentielle de bois de rose (*Aniba rosaeodora*) a été étudiée (Sœur et al., 2011). Le potentiel antimicrobien et anticarcinogène de l'huile essentielle d'écorce de cannelle (*Cinnamomum zeylanicum*), soutient les possibilités d'usage dans les formules naturelles applicables en topique (Unlu et al., 2010). Des analyses menées avec l'huile essentielle de tea tree (*Melaleuca alternifolia*) ont montré que cette essence était capable d'inhiber la croissance des cellules du mélanome par l'intermédiaire du terpinène-4-ol, qui interfère sur les mécanismes de migration et d'invasion des cellules de mélanome sensibles et insensibles aux médicaments (Bozzuto et al., 2011). L'activité pro-apoptotique de l'huile essentielle de verveine officinale (*Verbena officinalis*) et de son composé citral serait due à une activation directe de la procaspase-3 (De Martino et al., 2009). Des résultats ont été obtenus avec l'utilisation d'huile essentielle extraite du jus d'orange (*Citrus sinensis*) très riche en limonène et fournissant des preuves convaincantes du potentiel apoptotique et anti-angiogénèse de l'huile essentielle de jus d'orange sur les cellules du cancer du côlon (Chidambara Murthy et al., 2012).

II.3.2.2. Des études très récentes concernant l'identification de molécules actives, extraites des huiles essentielles

Le potentiel thérapeutique de plusieurs huiles essentielles a attiré l'attention de chercheurs, qui ont décidé de les tester pour mettre en évidence une activité anticancéreuse, profitant du fait que leur mécanisme d'action est différent de celui des agents chimiothérapeutiques. Des rapports

antérieurs ont indiqué que des composés spécifiques des huiles essentielles, de la classe des monoterpènes, pouvaient présenter de multiples effets pharmacologiques, ce qui expliquerait l'effet suppresseur de tumeur enregistré avec les terpènes. Dans le cas de cette étude, il est démontré que le myrténal (aldéhyde monoterpénique naturel), agit comme un agent antinéoplasique contre des carcinomes hépatocellulaires induits expérimentalement chez le rat (Babu et al., 2012a). De nouvelles stratégies sont en cours d'exploitation pour améliorer les réponses à la chimiothérapie en ce qui concerne les cellules endométriales, avec l'utilisation des terpénoïdes présents dans l'huile essentielle de gingembre (*Zingiber officinalis*) (Liu et al., 2012). Le myrténal existe dans la composition des huiles essentielles de cumin (*Cuminum cyminum*), de poivre noir (*Piper nigrum*), de menthe poivrée (*Mentha x piperita*) et d'eucalyptus (*Eucalyptus sp*). Il montre une excellente activité antioxydante par destruction des radicaux libres, et une activité anticancéreuse vis-à-vis des carcinomes hépatocellulaires chez le rat (Babu et al., 2012b). Les composés phénoliques trouvés dans les plantes ont démontré, depuis quelques années, leurs potentialités en matière de promotion santé. L'eugénol (4-allyl-méthoxyphénol) est le composé actif du clou de girofle (*Syzygium aromaticum*), mais aussi de la noix de muscade (*Myristica fragrans*), du basilic (*Ocimum basilicum*), de la cannelle (*Cinnamomum zeylanicum*) et du laurier noble (*Laurus nobilis*). Des études ont mis en évidence l'activité antiproliférative et le mécanisme moléculaire de l'apoptose, induite par l'eugénol contre les cellules cancéreuses *in vitro* et également sur des modèles animaux (Jaganathan and Supriyanto, 2012.). Une étude a montré l'activité protectrice du bornéol, constituant de nombreuses huiles essentielles, sur les hépatocytes de rat, contre les dommages de l'oxydation exogène sur l'ADN (Horváthová et al., 2012). L'hypothèse du mode d'action de la pulégone sur les tumeurs urétrales induites chez le rat serait une cytotoxicité suivie d'une prolifération de cellules régénératives (Da Rocha et al., 2012). Le carvacrol induit la mort cellulaire après apoptose générée par les espèces réactives de l'oxygène (Liang and Lu, 2012.). L'huile essentielle d'ail (*Allium sativum*) est un constituant prioritaire pour prévenir le développement du cancer colorectal. Cet effet est dû au disulfure de diallyl, qui induit sélectivement un stress redox dans les cellules cancéreuses (plutôt que dans les cellules normales), amenant à la mort cellulaire apoptotique (Altonsy and Andrews, 2011). L'alpha-bisabolol, alcool sesquiterpénique, présent dans de nombreuses huiles essentielles (par exemple la camomille matricaire *Matricaria chamomilla*), a une activité antigliomale dans le cadre des tumeurs pancréatiques (Seki et al., 2011). Le curcuma (*Rhizoma curcumae*) est une plante employée couramment dans la médecine traditionnelle chinoise, et son huile essentielle est utilisée en chine pour traiter des cancers. Une revue a eu pour but de résumer et d'analyser systématiquement les propriétés anticancéreuses des terpénoïdes (β -élémane, furanodiène,

furanodiènone, curcumol et germacrène), composés principaux de cette plante, dans le but de développer de nouveaux médicaments (Lu et al., 2012). Sachant que l'oxyde de β -caryophyllène est un sesquiterpène isolé des huiles essentielles telles que celles de la goyave (*Psidium guajava*), de l'origan (*Origanum compactum*), de la cannelle (*Cinnamomum zeylanicum*), du clou de girofle (*Syzygium aromaticum*), du poivre noir (*Piper nigrum*) (Park et al., 2011). Des recherches ont montré que cette molécule était capable d'interférer sur les multiples cascades de signalisation impliquées dans les processus tumorigènes, et qu'elle pourrait être utilisée en emploi thérapeutique à la fois pour la prévention et pour le traitement des cancers (Bonnafous, 2013).

II.4. Mécanismes d'action cytotoxique des huiles essentielles

II.4.1. Introduction

Les huiles essentielles sont des substances volatiles, de composition complexe, contenues dans certaines espèces végétales botaniquement définies susceptibles de synthétiser des essences. Les huiles essentielles sont obtenues soit par extraction à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par des procédés mécaniques appropriés sans chauffage. Elles peuvent être obtenues aussi par extraction à froid (Santoyo et al., 2005), le CO₂ supercritique, l'extraction assistée par ultrasons ou par micro-ondes (Kimbaris et al., 2006). L'extraction des huiles essentielles ne doit pas entraîner de changement significatif dans leurs compositions moléculaires. Le terme « huiles » vient de leur propriété de se solubiliser dans les graisses, alors que le terme « essentielles » désigne l'odeur dégagée par la plante productrice (Chemat et al., 2012). Les huiles essentielles sont des composés hydrophobes, miscibles uniquement à l'alcool et aux huiles végétales, elles sont inflammables (point éclair très bas pour certaines), elles ne contiennent aucun corps gras (Bonnafous, C., 2013).

II.4.2. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges de structures très complexes, pouvant contenir de cinquante à trois cents composés différents ; cependant, la plupart des huiles essentielles comportent vingt à soixante molécules (Langenheim, 1994; Pengelly, 2004). Ces substances sont très volatiles, appartenant pour la grande majorité, à la famille des terpènes et des sesquiterpènes (Bonnafous, 2013). Les phénylpropanoïdes et les autres composés (azotés, nitriques et sulfuriques) se retrouvent avec des fréquences plus faibles et en proportion similaire (Friedrich, 1975).

II.4.3. Cytotoxicité des huiles essentielles

Les propriétés antitumorales des huiles essentielles sont connues depuis longtemps et ont fait l'objet de nombreuses publications qui ont confirmé par des études *in vitro*, leur action cytotoxique contre des lignées cellulaires tumorales représentant différents types de cancer. En général, la cytotoxicité des huiles essentielles est principalement due à la présence de phénols (carvacrol, thymol, eugénol), d'aldéhydes (citral, cinnamaldéhyde) et d'alcools (linalol) (Bruni et al., 2004, Sacchetti et al., 2005). Ce sont généralement des huiles essentielles riches en de telles molécules qui présentent la plus grande efficacité cytotoxique contre des lignées cellulaires cancéreuses humaines. Certaines huiles essentielles des plantes (comme l'eucalyptus, la camomille, l'armoise et la verveine officinale) ont le pouvoir d'activer l'apoptose dans les cellules tumorales. D'autres sont capables de perturber le potentiel membranaire mitochondrial (Bouyahya et al., 2016).

II.4.4. Mécanismes d'action anticancéreuse des huiles essentielles

Bien que plusieurs recherches aient été réalisées dans le domaine de la chimiothérapie en utilisant des substances isolées à partir de plantes aromatiques, peu d'études ont abordé le mécanisme par lequel une huile essentielle dans sa totalité (totum) ou l'un de ses constituants agit sur les cellules tumorales. Et même si la plupart des études rapportent une toxicité spécifique sur les cellules cancéreuses en l'absence d'une toxicité sur les cellules témoins, certains composés tels que le safrole ou l'isoeugénol sont bien connus comme des molécules dangereuses, et l'évaluation de la toxicité des constituants des huiles essentielles *in vitro* et, en particulier, *in vivo* est d'une importance cruciale (Bakkali et al., 2008).

Les mécanismes mis en jeu sont très divers, allant des niveaux structuraux à des niveaux moléculaires (régulation de transcription génique), en passant par des niveaux métaboliques (production des espèces réactives d'oxygène chez les cellules cancéreuses). L'activité cytotoxique rapportée des huiles essentielles ou de leurs constituants comprend l'induction de la mort cellulaire par apoptose et/ou nécrose, en activant les protéines pro-apoptotiques directement ou via les voies de signalisation, en arrêtant le cycle cellulaire directement ou via l'inhibition de l'activité des protéines-kinases, et elles peuvent modifier le potentiel membranaire des cellules cancéreuses (Bouyahya et al., 2016). Certains de ces effets sont attribuables à la nature lipophile et aux faibles poids moléculaires des constituants des huiles essentielles qui leur permettent de traverser les membranes cellulaires, en modifiant les couches de phospholipides, en augmentant la fluidité de la membrane qui devient anormalement perméable, ce qui entraîne une fuite de

radicaux, le cytochrome-c, les ions de calcium et les protéines, comme dans le cas du stress oxydatif (Bakkali et al., 2008). La réduction de la production d'ATP, l'altération du gradient de pH et la perte de potentiel mitochondrial ne sont que les conséquences des membranes cellulaires perturbées. En outre, les huiles essentielles peuvent également agir comme pro ou antioxydants, affectant l'état redox cellulaire (Wei and Shibamoto, 2010; Azmi et al., 2006; Tuttolomondo et al., 2013).

II.4.4.1. Activation de l'apoptose par les caspases

L'apoptose est le résultat des voies de signalisation très complexes conduisant à l'activation des gènes impliqués dans la mort cellulaire programmée. Par ailleurs, des mutations dans les gènes qui régulent l'apoptose peuvent induire des défauts dans ceux-ci et, par conséquent, génèrent des maladies humaines diverses, y compris le cancer (Lowe and Lin, 2000). L'apoptose des cellules cancéreuses se produit par l'activation de certaines protéines de la famille des caspases. Les terpènes, composés majoritaires des huiles essentielles, ont montré leur effet dans l'activation de ces protéines. Les caspases 3 et 9 sont activées dans les cellules leucémiques cultivées en présence de limonène ou de géraniol (caspase 3) dans de nombreux cancers (sur des cellules et tumeurs), en particulier dans la prostate (Kim et al., 2012) ou dans le cancer du rein (caspases 3, 8 et 9) (Ahmad et al., 2011). Autres terpènes (le β -caryophyllène) peuvent aussi activer les caspases (caspase 3) (Jaafari et al., 2012; Park et al., 2011), α -bisabolol (caspase 3, 8 et 9) (Carnesecchi et al., 2002), ou β -élémane (caspases 3, 7, 9 et 10) dans différentes lignées cellulaires de cancers de la prostate, de gliome, du sein, du côlon et du poumon (Manikandan et al., 2010), et le thymol (caspase 3, 8 et 9) dans la leucémie (Deb et al., 2011). Enfin, le germacrone active les caspases 3, 7 et 9 (Zhong et al., 2011). Du point de vue biochimique, ceci passe par la phosphorylation et l'activation de protéines (p53, Bax, et p21/waf) impliquées dans la cascade d'événements qui conduit finalement à l'activation de ces caspases, qui vont donner le signal aux cellules cancéreuses de se détruire, enrayant ainsi la prolifération cellulaire propre au cancer. Ceci passe également par une baisse de l'expression des gènes bcl-2 et des protéines associées (anti-apoptotiques donc protectrices de l'activité cellulaire) dans les cellules cancéreuses (Giraud, 2016b). La variation de ces marqueurs évolue significativement notamment avec le géraniol à partir de 0,25 mM dans les cultures cellulaires et 60 mg/kg dans les tumeurs chez l'animal (Kim et al., 2011). L' α -bisabolol agit en particulier sur les protéines bcl-2 dans les leucémies par exemple (Cavalieri et al., 2011). Le β -élémane agit aussi sur la voie p53, bcl-2 (Li et al., 2005) ainsi que l'eugénol (Pal et al., 2010).

II.4.4.2. Modification du potentiel de membrane de la cellule cancéreuse et des mitochondries

Actuellement, plusieurs recherches démontrent que l'effet bénéfique des terpènes contre le cancer est associé à un changement dans la polarisation de la membrane des cellules cancéreuses et en particulier de leurs mitochondries. En effet, les terpènes sont très liposolubles et ont une affinité pour les membranes cellulaires (Giraud, 2016b). L'induction de l'apoptose par le géraniol (alcool monoterpénique) dans le cancer de la prostate est associée à une dépolarisation de la membrane des mitochondries dans les cellules cancéreuses de la prostate à partir de 25 mM pendant 24-48 heures (Kim et al., 2011). Les cellules cancéreuses sont souvent hyperpolarisées et cette dépolarisation induite par les terpènes permet de rétablir les mécanismes normaux dans la cellule, y compris l'apoptose (Giraud, 2016b). Le α -bisabolol (sesquiterpénol) et le thymol (phénol monoterpénique) sont également efficaces *in vitro* contre les leucémies lymphoïdes et myéloïdes aiguës en dépolarisant la membrane des mitochondries (Deb et al., 2011; Cavalieri et al., 2011). Le germacrone (cétone monoterpénique) semble avoir également un effet dépolarisant sur la membrane mitochondriale des cellules cancéreuses dans le cancer du sein, et le géraniol induit la dépolarisation de la membrane des cellules du côlon (Cardozo et al., 2011; Chen et al., 2011).

D'autres terpènes, tels que le β -élémane (sesquiterpène), modifient également la membrane des cellules cancéreuses. Sous l'action des terpénoïdes, les mitochondries des cellules cancéreuses libèrent des cofacteurs tels que le cytochrome-c, qui activera l'apoptose d'une manière caspase-dépendante. L'une des voies est l'ouverture des pores de transition à travers la membrane mitochondriale, ce qui permet du coup l'augmentation de la perméabilité mitochondriale interne de la membrane à l'eau et les molécules de taille inférieure à 1,5 kDa (Bouyahya et al., 2016). Les terpénoïdes tels que le α -bisabolol semblent cibler ce système (Darra et al., 2008; Cavalieri et al., 2009). La variation du potentiel de la membrane peut moduler l'ouverture ou la fermeture des canaux ioniques (qui peut altérer le pH intracellulaire) et induire des réactions multiples dans la cellule. Par exemple, le thymol et le carvacrol à 200 μ M semblent capables d'induire l'apoptose via la voie mitochondriale par l'ouverture des canaux calciques, qui produit la libération de Ca^{2+} dans le réticulum endoplasmique des cellules cancéreuses de l'ostéosarcome (Chang et al., 2011; Hsu et al., 2011; Liang and Lu, 2012).

II.4.4.3. Inhibition de l'inflammation et du stress oxydant

L'inflammation et le stress oxydatif sont des phénomènes associés à la progression du cancer, mais seraient aussi probablement associés à sa genèse (Giraud, 2016b). De nombreuses études ont démontré que les effets anticancéreux de certains composés des huiles essentielles sont associés à la diminution de l'inflammation et au stress oxydatif. (Giraud, 2016b). Le limonène, par exemple, restaure les taux de glutathion réduit (antioxydant central de l'organisme : GSH), de glutathion peroxydase (GPx), de catalase et de glutathion réductase (Chaudhary et al., 2012). L'eugénol rétablit également les niveaux de glutathion dans la peau soumise à l'agent cancérigène DMBA (7,12-dimethylbenz[α]anthracène), et le géraniol inhibe la production de facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) qui est un facteur de transcription clé des protéines pro-inflammatoires dans le corps (Kaur et al., 2010; Ahmad et al., 2011). Le lien entre l'action inflammatoire de NF- κ B et le développement du cancer, la résistance thérapeutique dans le développement de tumeurs, l'angiogenèse et la métastase dans le cancer est bien établi et décrit (Brown et al., 2008). L'eugénol réduit en effet le NF- κ B dans le traitement des carcinomes gastriques induits chez le rat (Manikandan et al., 2011). D'autres études ont montré que des composés comme l'eugénol diminuent l'inflammation en agissant sur d'autres facteurs tels que la cyclo-oxygénase-2 (COX-2), des cytokines et des facteurs inflammatoires, tels que l'IL-1 β , IL-6, TNF- α et PGE-2 (Hussain et al., 2011).

II.4.4.4. Production de radicaux libres dans la cellule cancéreuse

Le stress oxydant et l'inflammation sont néfastes à une échelle globale et incontrôlée dans l'organisme. Cependant une augmentation spécifique de radicaux libres et du stress oxydant dans la cellule cancéreuse a un effet antitumoral (Giraud, 2016). Plusieurs constituants terpéniques des huiles essentielles tels que le β -caryophyllène peuvent induire spécifiquement la production des espèces réactives d'oxygène dans les mitochondries des cellules cancéreuses sans augmenter le niveau du stress oxydatif dans les cellules normales (Park et al., 2011). Le thymol semble produire un intermédiaire radicalaire phénoxy stable qui génère des radicaux libres et des dérivés oxydés de quinones et qui est associé à la mort de cellules de mélanome (IC₅₀ = 400 μ M) (Satooka and Kubo, 2012) et dans des cellules d'ostéosarcome (IC₅₀ comprise entre 200 et 400 μ M) (Chang et al., 2011). Le thymol augmente en particulier la production du peroxyde d'hydrogène dans la mitochondrie de cellules cancéreuses (Deb et al., 2011). L'eugénol produit aussi un stress oxydant au sein de la cellule cancéreuse et diminue son taux de glutathion (Yoo et al., 2005).

II.4.4.5. Arrêt du cycle cellulaire

Jaafari et al. et Yin et al. ont montré que le thymol induit l'arrêt de transition du cycle cellulaire de la phase G₀ à la phase G₁ (Jaafari et al., 2012; Yin et al., 2012). Par ailleurs, la thymoquinone cible la voie Atk et provoque l'arrêt du cycle cellulaire par l'inhibition de la cycline D₁ et induit l'apoptose dans les cellules cancéreuses du sein (Rajput et al., 2013). D'autres études *in vitro* ont démontré que la préexposition des cellules tumorales à la thymoquinone suivie par le traitement à la gemcitabine ou oxaliplatine a augmenté l'inhibition de croissance en comparaison avec gemcitabine ou oxaliplatine utilisées seules. Les mécanismes impliquent la dérégulation de l'expression de NF-κB, des gènes de la famille de Bcl-2 et des gènes antiapoptotiques dépendant du NF-κB (Banerjee et al., 2009). Sethi et al. ont également montré que ce composé est impliqué dans l'activation des voies d'apoptose via la suppression de NF-κB (Sethi et al., 2008). Chez l'homme, la thymoquinone inhibe la prolifération cellulaire dans les mélanomes, induit la chimiosensibilisation et active les voies de transcription de STAT (*the Signal Transducer and Activator of Transcription*) (Li et al., 2010). Une autre étude réalisée par Yazan et al. a suggéré que ce composé avait un effet cytotoxique en induisant l'apoptose via une voie de signalisation dépendante de p53 (Yazan et al., 2009; Bouyahya et al., 2016).

II.4.4.6. Effet anti-angiogénique

Il est bien confirmé que les tumeurs sont irriguées par des vaisseaux sanguins néoformés (angiogénèse) qui leur apportent des nutriments. Les composés des huiles essentielles comme les terpènes et certains polyphénols sont susceptibles de diminuer et d'empêcher la formation de ce réseau sanguin approvisionnant la tumeur (Giraud, 2016b). Une étude a été faite sur le limonène chez des souris nudes (Lu et al., 2004) et montre que la densité des microvaisseaux est de $5,32 \pm 4,26$ dans le groupe supplémenté avec du limonène contre $18,64 \pm 2,81$ pour le groupe contrôle. L'expression du VEGF (*vascular endothelial growth factor*) était de $29,71 \pm 8,92$ dans le groupe limonène contre $45,77 \pm 4,79$ pour le groupe contrôle. Le β-élémane (Chen et al., 2011) réduit aussi significativement le VEGF à partir de 20 μM. L'administration de 100 mg/kg d'eugénol (trois fois par semaine) induit l'apoptose dans les cellules tumorales et diminue significativement le VEGF ainsi que les métalloprotéases matricielles, démontrant ainsi clairement un effet anti-angiogénique (Manikandan et al., 2010).

II.4.4.7. Modifications des histones

Les histones sont des protéines essentielles dans l'organisme. Elles jouent des rôles fondamentaux dans la plupart des processus biologiques impliqués dans la manipulation et l'expression de l'ADN. Celui-ci, s'enroule autour de ces protéines pour former des structures appelées nucléosomes (Giraud, 2016b). Les modifications des histones influencent sur la structure de la chromatine par acétylation, phosphorylation et méthylation. En effet, la charge positive des histones basiques permet une interaction forte avec les groupements phosphate de l'ADN qui portent des charges négatives. Certains terpènes comme le β -élémane agissent par ce mécanisme. Il inhibe la croissance de cellules cancéreuses par l'augmentation de l'histone H₁. Le rôle de cette protéine est de stabiliser l'enroulement de l'ADN sur le nucléosome. Elle est considérée comme inhibiteur de la transcription (Bao et al., 2012).

II.4.4.8. Potentialisation de certaines chimiothérapies

Certaines chimiothérapies sont potentialisées par certains composés d'huiles essentielles. Le limonène augmente l'activité du docétaxel (Yang and Ping Dou, 2010), tout comme le géraniol (Kim et al., 2011). Le β -caryophyllène potentialise l'activité du paclitaxel (Legault and Pichette, 2007) ainsi que le cisplatine qui est potentialisé par le β -élémane (Li et al., 2009).

II.5. Données de la médecine traditionnelle marocaine dans le traitement des cancers

La position géographique du Maroc, la diversité de son climat et de son écologie (côtes méditerranéenne et atlantique, montagnes de l'Atlas et du Rif, régions désertiques du Sahara) ont favorisé le développement d'une flore très riche estimée à environ 4200 espèces de plantes endémiques (Hmamouchi, 2001). Les plantes médicinales occupent une place importante et privilégiée dans la médecine traditionnelle marocaine. Elles sont largement utilisées pour traiter diverses maladies telles que, les troubles digestifs, respiratoires, cardiovasculaires, dermatologiques, métaboliques, les rhumatismes, les cancers...etc. Les enquêtes ethnopharmacologiques menées dans différentes régions du Maroc ont permis d'inventorier plusieurs recettes traditionnelles utilisées pour traiter différentes pathologies (Bellakhdar, 1997). L'importance du secteur des plantes médicinales et aromatiques et leurs produits dérivés (extraits, huiles essentielles...) ne cesse d'augmenter en relation, d'une part, avec l'augmentation accrue de la demande mondiale enregistrée ces dernières années et d'autre part, avec le nombre croissant d'utilisateurs et la diversité des domaines d'application. Cet intérêt a suscité la mise en œuvre d'un plan d'action nationale et d'une stratégie de développement du secteur des plantes

médicinales et aromatiques par la valorisation des plantes médicinales et du développement du savoir ancestral et des connaissances spécifiques des espèces végétales. D'autre part, de nombreux laboratoires et centres de recherche au Maroc ont commencé à s'intéresser aux plantes médicinales et aromatiques et ont pu rassembler d'importantes données scientifiques et techniques sur les ressources naturelles dans ce domaine (Merghoub, 2011).

Médecine alternative et complémentaire au Maroc :

Le Maroc ne dispose pas d'une réglementation rigoureuse et encourageante concernant la médecine complémentaire et surtout celle basée sur les plantes médicinales. Elle est essentiellement représentée par la médecine traditionnelle. En effet, la médecine traditionnelle marocaine qui prend ses origines dans la médecine arabe et islamique occupe une place prépondérante dans la vie des gens. C'est la somme totale des connaissances, des compétences et des pratiques qui reposent, rationnellement ou non, sur les théories, les croyances et les expériences propres à notre culture. Cette médecine se base essentiellement sur l'utilisation des plantes médicinales et aromatiques (Brahmi et al., 2011).

Pour l'année 2010, il est estimé que 39% (hommes 16,4%, femmes 22,4%) des patients traités aux départements de chimiothérapie et au département de radiothérapie de l'Institut National d'Oncologie de Rabat, ont utilisé des plantes médicinales. Cette utilisation intervient avant, après ou cours des traitements conventionnels (Kabbaj, 2012). Plusieurs autres auteurs ont montré que l'utilisation de la médecine traditionnelle est comprise entre 55% et 90% selon le lieu d'origine des tradipraticiens (El Beghdadi, 1991; Jaouad, 1992; Bellakhdar, 1997).

Parmi les plantes les plus citées au cours de ces enquêtes, on trouve *Aristolochia longa* (Berztem), *Trigonella foenum-graecum* (Halba), *Cassia absus* (Habba sawda) et *Nigella sativa* (Sanouj) sont les plus utilisées (tableau 10). Parmi ces plantes, certaines ont été rapportées comme ayant prouvé scientifiquement leur activité anticancéreuse (tableau 11).

Tableau 9 : Principales plantes utilisées dans le traitement des cancers en médecine traditionnelle marocaine (kabbaj et al., 2012).

Nom scientifique	Vernaculaire marocain	Partie utilisée	Mode d'administration	Type de cancer
<i>Aristolochia longa</i>	Berztem	Racine	Moulue avec du miel	Général
<i>Lepidium sativum</i>	Hab Errachad	Graine	Moulue avec du miel	Poumon, Estomac
<i>Inula viscosa</i>	Magramane	Feuille, Fleur	Moulue avec du miel	Sein
<i>Euphorbia resinifera</i>	Zaggûm	Parties aériennes	Moulue avec du miel	Général
<i>Cassia absus</i>	Habba sawda	Graine	Moulue avec du miel	Général
<i>Cicer arietinum</i>	Homos	Graine	Moulue avec du miel	Poumon
<i>Marrubium vulgare</i>	Marrîwa	Feuille	Décoction	Digestif
<i>Origanum compactum</i>	Zaâtar	Feuille	Infusion	Estomac, Gencive
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	Halba	Graine	Moulue avec du miel	Digestif
<i>Linum usitatissimum</i>	Zariâat al khatane	Graine	Moulue avec du miel	Lymphome
<i>Nigella sativa</i>	Sanouj	Graine	Moulue avec du miel	Général

Tableau 10 : Liste de quelques plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle marocaine rapportées comme ayant une activité anticancéreuse (kabbaj et al., 2012).

Espèce botanique	Vernaculaire marocain	Référence
<i>Allium cepa</i>	Bassal	(Yang et al., 2004)
<i>Argania spinosa</i>	Argane	(El Babili et al., 2010)
<i>Artemisia herba-alba</i>	Chih El khorrassani	(Nibret and Wink, 2010)
<i>Artemisia vulgaris</i>	Chih	(Nibret and Wink, 2010)
<i>Capparis spinosa</i>	Kebbar	(Lam and Ng, 2009)
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Mkhinza	(Ruffa et al., 2002)
<i>Crocus sativus</i>	Zaâfrane	(Bakshi et al., 2009)
<i>Euphorbia resinifera</i>	Zaggûm	(Lavie et al., 1963)
<i>Ficus carica</i>	Kharmouss beldi	(Marwat et al., 2011)
<i>Inula viscosa</i>	Magramane	(Danino et al., 2009)
<i>Linum usitatissimum</i>	Zariâat al kathane	(Abarzua et al., 2007)
<i>Nigella sativa</i>	Sanouj	(Worthen et al., 1998)
<i>Olea europaea</i>	Zaytoune	(Mijatovic et al., 2011)
<i>Petroselinum crispum</i>	Maâdnousse	(Zhang et al., 2006)
<i>Phœnix dactylifera</i>	Tamer	(Biglari et al., 2008)
<i>Pistacia lentiscus</i>	Drou	(Balan et al., 2007)
<i>Punica granatum</i>	Roumane	(Oliveira et al., 2010)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Yazir	(Cao et al., 2001)
<i>Salvia officinalis</i>	Salmiya	(Masuda et al., 2002)
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	Halba	(Raju et al., 2004)
<i>Zingiber officinale</i>	Skinjbire	(Kim et al., 2005)

Une autre enquête a rapporté que la consommation des plantes était la modalité la plus utilisée avec une fréquence de 69%. La consommation de miel naturel était rapportée par 68% des patients. L'eau de ZamZam (eau bénie de la Mecque) était employée dans 32% des cas. Alors que 9% des patients utilisaient des mélanges sans connaître leurs compositions. Les pratiques spirituelles étaient retrouvées chez 65% des utilisateurs de médecine traditionnelle. La nigelle (Sanouj), l'aristoloche (Berztem), le fenugrec (Halba), le marrube blanc (Marrîwa), l'ansérine

(Mkhinza), le thym (Zâitra), le cresson alénois (Hab Errachad), le romarin (Yazir) et l'armoise (Chih) sont les plantes les plus utilisées (Lahiaoui, 2016).

Une attention toute particulière doit être apportée à l'aristoloche (*Aristolochia Longa*) qui est de loin la plante la plus utilisée (Brahmi et al., 2001), appelé en arabe chajarat rostom, en dialecte marocain : berztem. Des travaux scientifiques ont été effectués pour confirmer ou infirmer ses usages traditionnels. Bien que l'aristoloche augmente le pouvoir phagocytaire des globules blancs, elle est rarement utilisée à des fins thérapeutiques car l'acide aristolochique est très toxique. En effet, les aristoloches sont très toxiques et irritantes et l'eau contenue dans leurs fleurs a pu provoquer des ophtalmies graves, des troubles respiratoires et digestifs. Il a en outre un effet cancérigène et tératogène (Hmamouchi, 2001).

Malgré l'existence de la médecine moderne pour le traitement du cancer, la médecine traditionnelle continue d'être la thérapie pour la grande partie défavorisée de la population marocaine. La médecine traditionnelle marocaine doit bénéficier au même titre que la médecine conventionnelle d'études scientifiques pour évaluer ses éventuels bénéfices, ses toxicités et ses interactions avec le traitement officiel afin de pouvoir l'intégrer dans les protocoles de traitement des cancers.

Chapitre III : Verveine citronnée

III.1. Historique, systématique botanique et répartition géographique

III.1.1. Historique

Le genre *Lippia* appartient à la famille des verbénacées et se compose d'environ 200 espèces d'herbacées, d'arbustes et de petits arbres souvent aromatiques (Terblanché and Kornelius, 1996). La verveine citronnée, *Lippia citriodora* (H.B. & K.) ou *Aloysia citriodora* Palau, est une plante médicinale originaire d'Amérique du Sud (Argentine, Chili, Pérou...) où elle pousse entre 2000 et 3000 m d'altitude. Elle n'a été introduite en Europe que vers la fin du XVIII^e siècle. Elle est cultivée au Maroc depuis plus d'un siècle. Le genre *Lippia*, auquel appartient cette plante, a été dédié au médecin botaniste Français Auguste Lippi (1678-1704), assassiné en Abyssinie au cours d'une de ses missions. Le nom arabe « Lwiza » dérive, d'un vernaculaire italien, aloysia (nom chilien de la plante), en l'honneur à Maria Luisa, princesse de Parme et épouse de Charles IV d'Espagne ; qui a donné l'appellation scientifique d'*Aloysia* (Bellakhdar, 2006).

III.1.2. Systématique botanique

Le nom commun "Verveine citronnée" provient du latin « Verbena », qui signifiait « branche feuillue ». Cette espèce est parfois aussi appelée communément verveine du Pérou, verveine odorante, verveine à trois feuilles, verveine des Indes, herbe Louise, thé arabe, aloyse citronnée, citronnelle et lwiza en dialecte marocain. Le genre *Aloysia* diffère du genre *Verbena* par le fruit drupacé à deux graines et non à quatre akènes et par le calice à 4 sépales au lieu de cinq. Il comprend 37 espèces d'arbustes à feuilles caduques ou persistantes des régions chaudes d'Amérique du nord et du sud (www.tela-botanica.org/).

✓ **Position systématique** (wikipedia.org/wiki/Aloysia_citriodora)

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Asteridae
Ordre	Lamiales
Famille	Verbenaceae
Genre	<i>Lippia</i> ou <i>Aloysia</i>
Nom binominal	<i>Lippia citriodora</i> ou <i>Aloysia citriodora</i>

✓ **Combinaison spécifique**

Lippia citriodora H.B. & K. (Figure 40)

Lippia triphylla (L'Hér.) Kuntze,

Aloysia citriodora Palau,

Aloysia triphylla (L'Hér.) Britton,

Verbena triphylla L'Hér.,

Zapania citrodora Lam. (www.tela-botanica.org/).



Figure 40 : Plante de *Lippia citriodora* dans un champ de culture (photo prise par nos soins).

✓ **Botanique**

C'est un sous-arbrisseau de la famille des verbénacées, appelée aussi verveine à trois feuilles (triphylla), atteignant les deux mètres de haut. Il est formé de tiges ramifiées qui portent des feuilles couramment pétiolées, verticillées par trois ou quatre et lancéolées, dégageant une odeur citronnée agréable au froissement, d'où son appellation de verveine citronnée. Les fleurs sont petites, bleu-roses ou blanches, regroupées en épi lâche vers les extrémités, donnant de petits fruits charnus renfermant un noyau. (Fleurentin, 2016).

III.1.3. Répartition géographique

Elle est aujourd'hui répandue dans diverses régions tropicales et subtropicales (Chine, Kenya, etc.), dans les zones tempérées chaudes de l'Europe (Espagne, un peu le Midi de la France) et de l'Afrique du nord (Maroc, Algérie), en Australie et en Nouvelle-Zélande.

La culture de la verveine citronnée est facile dans des sols au pH neutre, fertiles bien drainés et bien ensoleillés. Elle ne supporte pas les fortes gelées, perd ses feuilles en hiver et ne doit être arrosée que très peu durant la saison froide. Elle exige un sol frais en été, l'excès d'humidité entraîne la pourriture de ses racines (Botrel, 2001). Elle se sème au printemps sous châssis car elle a besoin de chaleur pour germer et pour s'enraciner. Les plantes adultes peuvent se multiplier aisément par éclats des pieds à l'automne ou par marcottage ou bouturage ; ce dernier, plus délicat, est recommandé de préférence au printemps quand la sève se met à monter, ou en fin d'été, quand elle descend.

III.2. Composition chimique principale des feuilles

La plante fraîche contient 0,1 à 0,3% d'une huile essentielle composée principalement d'aldéhydes monoterpéniques (citral = géranial et néral), des monoterpènes (limonène), des alcools monoterpéniques (géranol, nérol, alpha-terpinéol), des sesquiterpènes (béta-caryophyllène, ar-curcumène), des oxydes (1,8 cinéole, oxyde de caryophyllène), des cétones monoterpéniques (méthylhepténone)...etc. Elle est également riche en flavonoïdes (vitexine, lutéoline-7-O-glucoside, apigénine-7-O-glucoside, salvigénine, eupafoline, hispiduline, artémistine, hespéridine), en iridoïdes (verbénaline, acide géniposidique et du verbascoside), en polyphénols, en mucilages, en tanins, en minéraux... (Bellakhdar, 2006; Fleurentin, 2016).

III.3. Propriétés pharmacologiques et indications thérapeutiques de la plante et de l'HE

Utilisations dans la médecine traditionnelle

Lippia citriodora (verveine citronnée) est utilisée en médecine traditionnelle marocaine pour ses feuilles sous forme d'infusions pour les propriétés suivantes : Antispasmodique, digestive, stomachique, sédative (Bellakhdar, 2006). L'huile essentielle extraite de ses feuilles séchées est indiquée pour l'anxiété, le stress, l'insomnie, certaines dépressions, la fatigue nerveuse, la sclérose en plaques, le psoriasis, la tachycardie, les rhumatismes (Baudoux, 2010).

Fleurentin a rapporté qu'au XIX^e siècle en Europe, la verveine citronnée était indiquée dans les troubles digestifs comme les gastralgies, les dyspepsies et les flatulences grâce à ses effets stomachiques et antispasmodiques. Elle était aussi utilisée dans les migraines, les vertiges, les bourdonnements d'oreille, les états nerveux, la fatigue intellectuelle et contre la fièvre. L'huile essentielle est traditionnellement utilisée comme décontracturante par voie orale et conviviale en diffusion. Les feuilles fraîches coupées sont utilisées comme condiments pour aromatiser les desserts et les légumes (Fleurentin, 2016).

✓ **Propriétés pharmacologiques**

En phytothérapie, cette espèce est réputée pour ses propriétés sédatives, stomachiques et antispasmodiques. En aromathérapie, l'huile essentielle de *Lippia citriodora* développe les actions suivantes : anti-inflammatoire puissante, sédative puissante, eupeptique, stimulante vésiculaire et pancréatique, *hormone-like* (thyroïde, pancréas) (Franchomme et al., 2004). Elle présente aussi une action bactéricide puissante sur la flore pathogène buccale (Fleurentin, 2016).

✓ **Indications thérapeutiques**

En phytothérapie :

La plante de la verveine citronnée est traditionnellement utilisée dans les troubles mineurs du sommeil, les indigestions, les gastralgies. Son infusé, sucré et légèrement salé, est une excellente boisson hygiénique qui facilite les éructations du nourrisson et permet, par fortes chaleurs de le réhydrater (Bellakhdar, 2006; Fleurentin, 2016).

En aromathérapie :

L'huile essentielle de *Lippia citriodora* est indiquée dans : angoisse, stress, insomnie, certaines dépressions, fatigue nerveuse, sclérose en plaque, entérocolite, amibiase, kyste amibien, maladie de Crohn, cystite colibacillaire, psoriasis, coronarite, hypertension, maladie de Hodgkin, malaria, prévention des crises d'asthme, rhumatismes (Franchomme et al., 2004; Baudoux, 2010).

✓ **Forme d'emploi**

Sous forme d'infusion : Les rameaux sont récoltés peu avant la floraison, rassemblés en bouquets puis séchés. Les feuilles séchées, sont mondées avant d'être consommées (Lenoir, 2011). 10 à 20 g de feuilles par litre d'eau bouillante, sont infusés pendant 10 mn puis filtrés. Une tasse le soir est indiquée dans les troubles du sommeil. 3 tasses par jour, après les repas, sont indiquées dans les lourdeurs d'estomac et les gastralgies. Chez le nourrisson, l'infusé sucré, additionné d'une cuillère à soupe d'eau de fleur d'oranger, peut être administré au biberon ou à la cuillère, après la tétée, pour faciliter les éructations et préparer au sommeil. Une pincée de sel est ajoutée à l'infusé pour un usage comme réhydratant (Bellakhdar, 2006).

Sous forme d'huile essentielle : l'huile essentielle, extraite par hydrodistillation à la vapeur d'eau (le rendement est faible 0,1 à 0,2%), est indiquée dans : les troubles du sommeil, le stress, l'angoisse, la déprime, la fatigue nerveuse, les névralgies, les inflammations musculo-squelettiques, les cystites, les entérocolites (Franchomme et al., 2004; Baudoux, 2010).

- 2 gouttes sur un mouchoir à respirer plusieurs fois par jour selon les besoins.
- Quelques gouttes dans un diffuseur d'huiles essentielles, à diffuser dans la chambre à coucher pendant 20 à 30 minutes pour induire un bon sommeil avec en plus une fragrance très agréable.
- En usage externe : faire un massage, à diluer jusqu'à 5% dans une huile végétale.
- En bain : diluer, préalablement dans une base neutre pour bain (5 à 10 gouttes d'huile essentielle pour un bouchon de base neutre pour bain).
- En usage interne : 1 goutte en dilution dans 15 gouttes de dispersant (Solubol) puis compléter par une boisson, ou 1 à 2 gouttes dans une matière grasse pour l'associer à un met culinaire (Franchomme et al., 2004; Baudoux, 2010).

➤ **Propriétés pharmacologiques démontrées**

- *Effet antispasmodique et relaxant musculaire*

Les extraits hexaniques et le citral relâchent les contractions de l'utérus isolé de rat stimulé par des prostaglandines (PGF-2). Chez l'animal, l'huile essentielle s'oppose aux spasmes induits par l'histamine sur l'intestin isolé de cobaye (Fleurentin, 2016).

- *Effet antioxydant et antiradicalaire puissant*

Des extraits aqueux des feuilles de *Lippia citriodora* ont un effet antiradicalaire puissant sur les radicaux superoxydes, hydroxyles et l'acide hypochloreux (Valentão et al., 2002).

- *Effet anti-inflammatoire*

Un extrait hexanique et le citral s'opposent à l'œdème de la patte de rat induit par la carragénine ; une autre expérience a montré l'action d'un extrait sur une inflammation de l'intestin induite chez le rat par le dextrane sulfate de sodium : les cellules de l'intestin sont moins atteintes (Fleurentin, 2016).

- *Autres effets*

Deux flavonoïdes (artémistine, hespéridine) sont analgésiques chez la souris.

L'huile essentielle possède des propriétés antibactériennes vis-à-vis de streptocoques et de lactobacilles (Fleurentin, 2016). Elle est également bactéricide contre *Helicobacter pylori*, *in vitro*, sans développer de résistance acquise (Ohno et al., 2004).

✓ *Précaution d'emploi*

Aucune précaution d'emploi aux doses thérapeutiques recommandées pour la verveine citronnée. En revanche, l'huile essentielle est irritante pour la peau à l'état pur (il y a risque de photosensibilisation après exposition au soleil) (Franchomme et al., 2004) et ne doit pas être administrée chez la femme enceinte, chez la femme allaitante, chez l'enfant de moins de 8 ans et chez le sujet épileptique (Baudoux, 2010; Fleurentin, 2016).

Deuxième partie : Expérimentation

Matériel et méthodes

1. Matériel végétal

La plante étudiée est l'espèce : *Lippia citriodora* H.B. & K. (Figure 40).

Nous avons procédé à la cueillette de la verveine citronnée dans différentes régions du Maroc, jugées à culture potentielle de cette plante. Sa culture conventionnelle a lieu dans des champs dénués de toute utilisation des pesticides. Il s'agit de :

- Agadir (région d'Oulad Tayma) : représentant le Sud et la côte Atlantique
- Beni Mellal (région Laâyta) : où nous avons examiné de vastes champs de culture, représentant le centre et la plaine du Maroc.
- Berkane (région avec des champs de culture) : représentant l'Est du Maroc
- Demnat (région de montagne) : représentant le moyen Atlas et l'altitude
- Marrakech (région Ait Imour) : région à grand potentiel de culture et de vente de la verveine citronnée à l'échelle nationale et internationale.

Ces différentes régions représentées et sous différents facteurs de pluviométrie, de température et d'irrigation, permettent à l'étude menée, de porter un jugement valable sur la variation de la composition chimique en fonction de la localisation géographique et sous différents climats. Tous les échantillons ont été collectés entre Juillet et Août de l'année. C'est pendant cette période de l'année que la plante produit le maximum d'huile essentielle au niveau de ses feuilles (Sarrazin et al., 2012). La verveine citronnée est une plante aisément identifiable sur le plan botanique.

2. Extraction de l'huile essentielle à partir des échantillons issus de différentes régions étudiées du Maroc

Les feuilles de la verveine citronnée des différentes provenances ont subi un séchage à l'ombre et dans un milieu aéré pendant deux semaines. L'huile essentielle est extraite par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de laboratoire type Clevenger (100 g de feuilles coupées dans 1,5 l d'eau distillée) pendant 3h à une température inférieure à 100 °C. A la fin du processus de distillation, la phase organique (l'huile essentielle) est séparée de l'hydrolat (phase aqueuse) avec de l'éther. Après évaporation douce, l'éther est éliminé et on obtient l'huile essentielle. Le rendement, étant très faible, variait de 0,1% à 0,2% par rapport à la matière sèche.

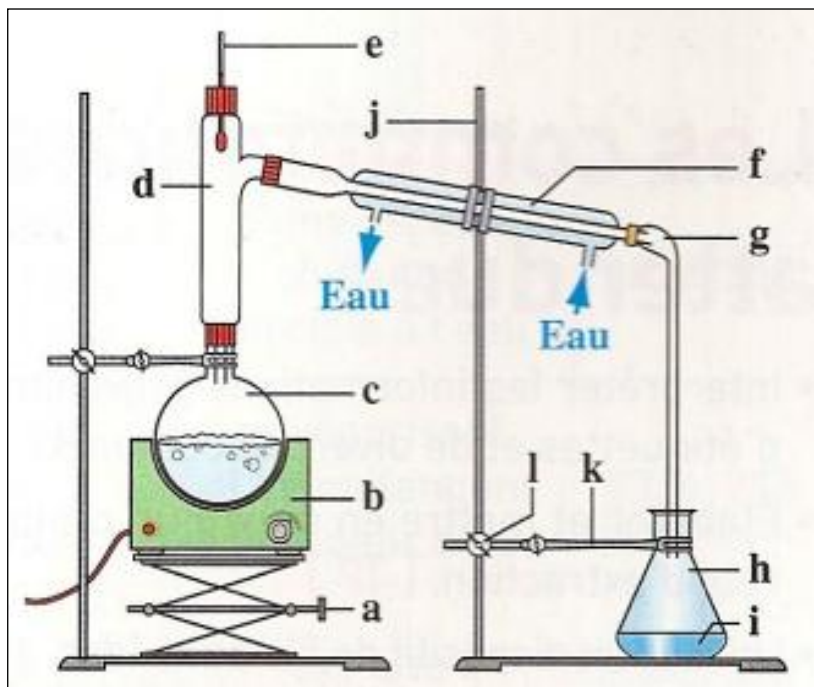


Figure 41 : Montage expérimental de l'hydrodistillation (appareil type Clevenger).

a: support élévateur ; b: chauffe-ballon ; c: ballon monocol ; d: tête de colonne ; e: thermomètre ; f: réfrigérant droit ; g: pis de vache ; h: erlenmeyer ; i: distillat ; j: support ; k: pince ; l: noix.

http://perso.ens-lyon.fr/thomas.rossi/perso.ens-lyon/Seconde_files/TP12_1.pdf

Caractéristiques de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* distillée :

- Aspect : liquide mobile, limpide
- Couleur : jaunâtre, plus ou moins foncé
- Odeur : caractéristique, citronnée, fraîche
- Densité à 20°C : 0,879

3. Détermination de la composition chimique de l'HE de chaque échantillon par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/MS)

L'analyse des échantillons d'HE de chaque région a été effectuée avec un chromatographe en phase gazeuse. Un appareil sur Trace GC ULTRA équipé d'un détecteur FID et d'une colonne capillaire (30 m x 0,25 mm ; épaisseur de film de 0,25 µm) de type DB-5 (méthylpolysiloxane avec 5% de phényle), le volume d'injection (1µl). La chromatographie est couplée à un spectromètre de masse Q Polaris MS (avec un piège à ions 70 eV). Le programme de température était de 40 °C pendant 2 min, puis porté à 180 °C à une vitesse de 4 °C/min. Le gaz vecteur était l'hélium (1,4 ml / min).

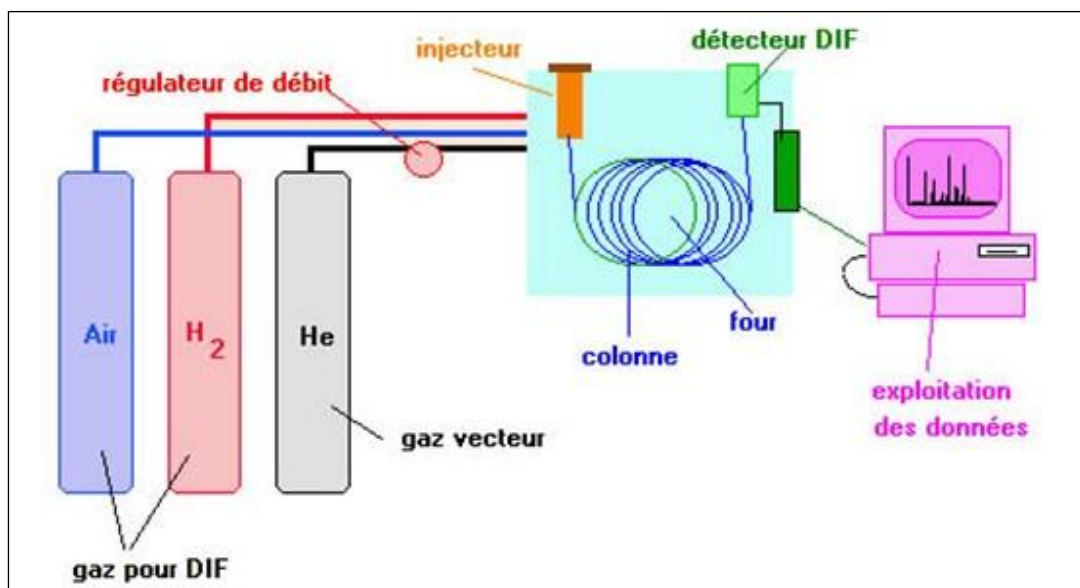


Figure 42 : Schéma d'un appareil de CPG (chromatographie en phase gazeuse), muni d'un détecteur à ionisation de flamme (DIF). Le chromatographe est équipé d'un injecteur diviseur, d'une colonne capillaire et d'un détecteur à ionisation de flamme. Les données sont traitées par un système informatique.
http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/dosart/imgArt/chromato/chromato_gaz1.html

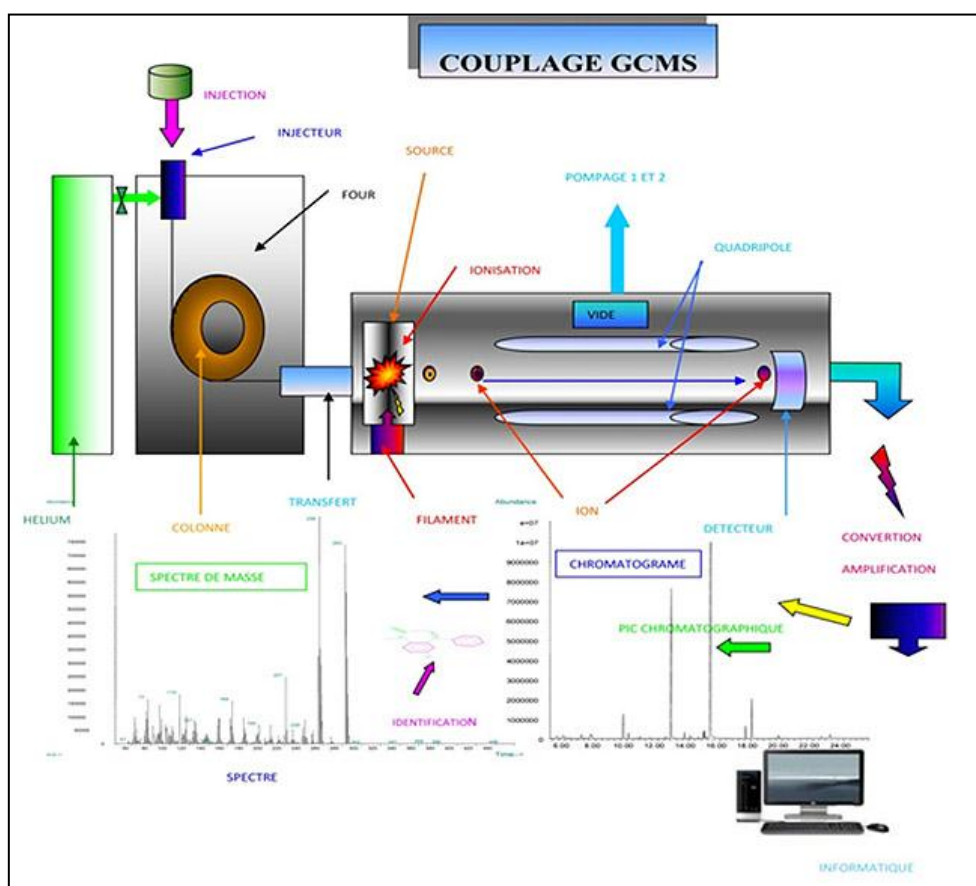


Figure 43 : Schéma de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM). La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) est une technique d'analyse fréquemment utilisée dans les laboratoires de toxicologie. Il s'agit d'un couplage entre une méthode de séparation des constituants d'un échantillon (CG) et une méthode de quantification (dosage) des molécules d'intérêt ainsi séparées (SM). <http://laboratoire-labex.fr/principe-analytique-laboratoire-labex.html>

4. Etude de l'activité cytotoxique de l'HE de *Lippia citriodora in vitro*

4.1. Lignées tumorales étudiées

Les lignées de cellules tumorales utilisées sont les suivantes :

- P815 : lignée du mastocytome murin (lignée non adhérente)
- MCF7 : lignée de l'adénocarcinome de sein humain (lignée adhérente)
- VERO : lignée du carcinome de rein du singe vert Africain (lignée adhérente)

Ces lignées sont gracieusement fournies par le professeur G. Lemaire, Institut de biochimie de l'Université de Paris XI. Elles sont entretenues et cultivées en routine au laboratoire d'oncologie expérimentale et substances naturelles, immunopharmacologie cellulaire et moléculaire de la Faculté des Sciences et Techniques de Beni Mellal.

4.2. Culture cellulaire

Les lignées de cellules tumorales sont maintenues en cryoconservation dans de l'azote liquide. Au besoin de réaliser différents tests, les cellules subissent deux à trois passages après leur décongélation et mise en culture. Les cryotubes sont récupérés de l'azote liquide et leur contenu est rapidement décongelé et transféré dans des tubes à centrifugation en présence de milieu de culture complet (RPMI Sigma Aldrich complet supplémenté avec 5% de SVF, 100 µl/ml de pénicilline, 100 µl/ml de streptomycine). Les cellules sont lavées 2 à 3 fois avec du PBS en centrifugeant à 1400 tours/mn pendant 10 mn pour éliminer le DMSO. Après lavage, le surnageant est jeté et le culot est récupéré dans des flasques à ouverture inclinée et ventilée en présence du milieu de culture complet. L'incubation a eu lieu à 37 °C sous une atmosphère humide à 5% de CO₂.

Dans le cas des cellules adhérentes (MCF7 et VERO) et après avoir jeté le surnageant contenu dans le flasque de culture, les cellules sont lavées par du PBS avant de les décoller. Ce lavage a pour but d'éliminer les traces restantes du sérum de veau fœtal qui est considéré comme un inhibiteur de l'action de la trypsine. Ensuite, On ajoute 1 ml de Trypsine-EDTA (0,25% et 0,1%, respectivement) et les cellules sont incubées à 37 °C. Ces dernières se décollent du plastique au bout de quelques minutes. La suspension cellulaire est alors récupérée et lavée deux fois par centrifugation avec du PBS puis répartie dans de nouveaux flasques avec du milieu de culture. L'incubation est effectuée à 37 °C et à 5% de CO₂.

Comptage cellulaire

Avant de réaliser les tests de cytotoxicité, on procède au comptage cellulaire pour déterminer le volume de la suspension cellulaire correspondant au nombre de cellules à mettre dans chaque puits d'une plaque de microtitration. A 20 μl de la suspension cellulaire, on ajoute 160 μl de milieu de culture et 20 μl d'une solution de bleu de trypan. Ce dernier colore les cellules mortes exclues du comptage. Pour dénombrer les cellules, on utilise la lame de Malassez sur laquelle on dépose une goutte (10 à 25 μl) du mélange à l'aide d'une micropipette. Après avoir attendu quelques minutes pour que les cellules sédimentent, on peut compter le nombre de cellules dans les 25 rectangles quadrillés, généralement on compte dans 10 rectangles, au microscope au grossissement 400. Le volume d'un rectangle quadrillé étant de 0,01 μl , en comptant 10 rectangles, il suffit alors de multiplier le résultat par 10 000 pour obtenir le nombre de cellules par ml.

Le but étant d'obtenir une suspension de 1 à 1,5 x 10⁴ cellules /ml à incuber dans 100 μl de milieu de culture complet par puits à fond plat des plaques de micro-culture de 96 puits (Thermo Fisher Scientific). Cette micro-culture ainsi obtenue est mise en incubation 24 heures avant la réalisation des tests de cytotoxicité.

4.3. Test au MTT (Methyl Thiazol Tetrazolium)

Les essais de cytotoxicité ont été réalisés pour différentes huiles essentielles de *Lippia citriodora* issue de différentes régions sur chaque lignée de cellules (P815, MCF7 et VERO), en utilisant le test au MTT (Sigma Aldrich) : 3-(4,5- diméthylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyl tétrazolium bromide, comme décrit et modifié par Mosmann (Mosmann, 1983; Ait Mouse et al., 2012). Toutes les expériences ont été réalisées avec des cellules lavées au PBS (Sigma Aldrich) et à une densité cellulaire de l'ordre de 1,5 x 10⁵ / ml dans des plaques de microtitration à fond plat à 96 puits (Thermo Fisher Scientific) dans 100 μl de milieu complet par puits. Ensuite, la stimulation a été effectuée en ajoutant 100 μl de milieu de culture complet contenant différentes concentrations des huiles essentielles testées (dissoutes dans du DMSO Sigma Aldrich) dans chaque puits. Après 48 heures d'exposition des cellules à ces concentrations d'huiles essentielles testées à 37 °C et à 5% de CO₂, 100 μl de milieu ont été soigneusement aspirés de chaque puits et remplacés par 20 μl de solution de MTT (5 mg/ml de PBS -Sigma Aldrich-). Après incubation dans les mêmes conditions pendant 4 heures, les plaques ont été traitées avec 80 μl d'une solution de HCl / isopropanol (24: 1) pour dissoudre le formazan intracellulaire de couleur bleue, produit par les cellules vivantes. Une heure plus tard, l'absorbance (densité optique DO) des plaques a été

déterminée par spectrophotométrie à deux longueurs d'ondes (540 et 630 nm) en utilisant un appareil Multiskan EX (Labsystem, Helsinki, Finlande). Le DMSO (0,5%) a été utilisé comme témoin négatif et le méthotrexate (MTX) comme témoin positif.

La viabilité (%) a été évaluée par la formule suivante :

$$\% \text{ Viabilité} = (\text{DO} / \text{DO}_0) \times 100 \text{ ou } \% \text{ Cytotoxicité} = (1 - \text{DO} / \text{DO}_0) \times 100$$

DO est la densité optique de la solution dans les puits contenant des cellules traitées avec des huiles essentielles et DO₀ est la densité optique de la solution dans les puits contenant des cellules traitées avec le DMSO (témoin négatif). Le test a été effectué en triplicata.

5. Effet de l'HE de *Lippia citriodora* sur les cellules normales PBMC

Nous avons réalisé ce test pour évaluer l'effet des différentes huiles essentielles de *Lippia citriodora* sur les cellules humaines normales en utilisant, de la même manière, le test au MTT. Pour cela, nous avons collecté le sang dans des tubes contenant un anticoagulant (l'héparine), sous surveillance médicale et à partir de prélèvements chez des volontaires sains exempts de toutes maladies.

Les cellules mononucléaires du sang périphérique humain (PBMC) ont été isolées en utilisant le test standard au Ficoll qui sert à réaliser un gradient de densité. Dans un tube contenant environ 6 ml de Ficoll, on verse doucement, avec une pipette, le même volume de sang humain dilué au 1/2 dans du PBS. On maintient le tube très incliné et on dépose le sang par la pipette au niveau de l'ouverture pour qu'il ne se mélange pas avec le Ficoll. On obtient alors deux couches bien séparées ; celle du sang (en haut) et celle du Ficoll (en bas). En menant une centrifugation à 1400 tours/mn pendant 30 mn, on obtient quatre couches superposées qui sont du haut vers le bas : le sérum, les globules blancs, le Ficoll et les globules rouges. Ces globules blanc ont été récupérés soigneusement dans un tube stérile puis ont été lavés deux fois par du PBS. Ensuite, nous avons mené le test de cytotoxicité des huiles essentielles et du cisplatine (témoin positif) dans les mêmes conditions avec lesquelles nous avons réalisé l'essai sur les cellules tumorales.

Le pourcentage de viabilité des cellules a été déterminé par la formule suivante :

$$\% \text{ Viabilité} = (\text{DO} / \text{DO}_0) \times 100 \text{ ou } \% \text{ Cytotoxicité} = (1 - \text{DO} / \text{DO}_0) \times 100$$

DO = densité optique des cellules traitées avec les huiles essentielles
DO₀= densité optique des cellules non traitées (contrôle négatif).

6. Etude de l'apoptose

6.1. Test de fragmentation de l'ADN

Les cellules des lignées tumorales P815 et MCF7 (environ 10^6 cellules dans 10 ml du milieu de culture), ont été traitées avec les doses IC_{50} des huiles essentielles de *Lippia citriodora* issues des différentes régions étudiées. Après 24 h d'incubation dans les mêmes conditions décrites pour les tests de cytotoxicité, les cellules ont été lavées dans du PBS et traitées avec le tampon de lyse (100 mM de Tris HCl, 0,5 M d'EDTA, 10% de SDS, 5 M de NaCl et 20 mg/ml de protéinase Kinase). Les échantillons ont été incubés à 37 °C pendant 3 heures sous agitation constante. Ensuite, l'ADN précipité par 500 μ l d'isopropanol, a été récupéré et réparti dans des tubes Eppendorfs dans une solution du Tris HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,5. La dissolution complète de l'ADN requiert quelques heures (peut nécessiter toute une nuit) sous agitation constante à 37 °C. Enfin, 10 μ l de la solution Tampon de charge (50% glycérol, 1 mM EDTA pH 8, 0,25% bleu de bromophénol) ont été rajoutés et l'ADN est soumis à une électrophorèse horizontale à 50 V, 30 mA, pendant 4 à 5h à 1,8 % (m/v) de gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium (1 mg/ml). Les bandes colorées de bromure d'éthidium, montrant la fragmentation de l'ADN (180-200 pb), fournissent une confirmation sur la mort cellulaire programmée (Alam, 2003).

Le marqueur de poids moléculaire utilisé est λ Hae III Φ X. Les fragments d'ADN séparés (échelles d'ADN) ont été visualisés en utilisant un trans-illuminateur UV (310 nm). Les cellules non traitées ont servi de témoin négatif.

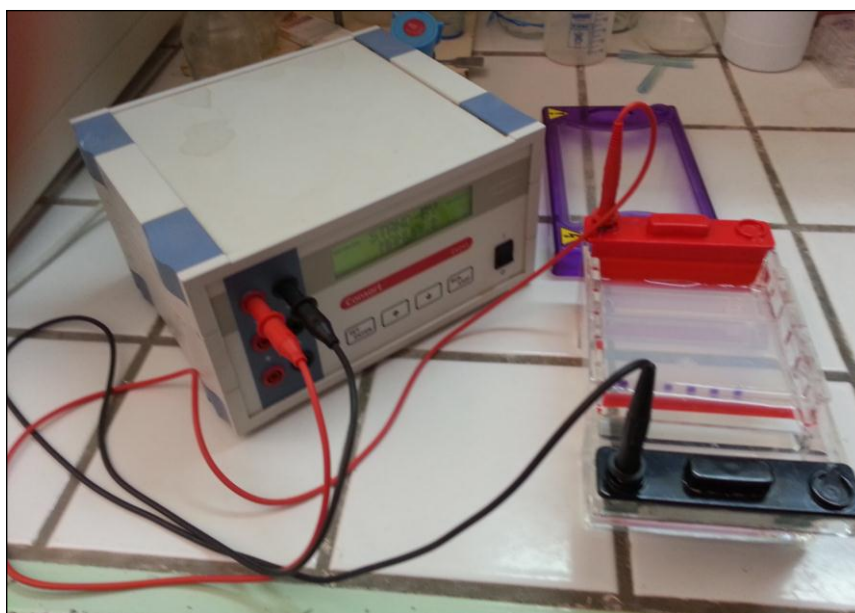


Figure 44 : Dispositif d'électrophorèse horizontale sur gel d'agarose.

6.2. Test des caspases à l'annexine V-biotine- streptavidine FITC

L'essai est basé sur la capacité de l'annexine V (vert fluorescent) à se lier à la phosphatidylsérine exposé sur la surface des cellules subissant une apoptose.

Les cellules (environ 10^6 cellules dans 10 ml du milieu de culture), traitées avec des IC_{50} des HE de *Lippia citriodora*, ou le méthotrexate comme témoin positif, ont été incubées pendant 24h à 37 °C dans une atmosphère humide à 5% CO_2 . Elles ont été recueillies dans un tube à centrifugation de 15 ml et centrifugées à 1400 tours/mn pendant 10 minutes. Après un lavage au PBS, les cellules ont été transférées dans des tubes Eppendorfs dans 0,5 ml de milieu de culture. On y ajoute 20 μ l de la solution tampon de fixation et 5 μ l d'annexine-biotine. La suspension est ensuite passée au vortex puis incubée à 4 °C pendant 30 mn à l'obscurité. Après centrifugation (1400 tours/mn) et lavage au PBS, 250 μ l de la solution de tampon de fixation et 20 μ l de Streptavidine-FITC (20 μ l de la solution mère de Streptavidine-FITC plus 500 μ l de la solution Binding Buffer) ont été rajoutés et suivi d'une incubation à 4 °C pendant 30 mn à l'obscurité. Enfin, 20 μ l de la suspension cellulaire ont été mis entre lame et lamelle et observés au microscope à fluorescence équipé de filtres (microscope type OLYMPUS DP71).

7. Etude de l'activité cytotoxique *in vitro* de la combinaison de l'HE *Lippia citriodora* et de la combinaison de l'oxyde de caryophyllène avec le cisplatine

L'essai de synergie a été réalisé pour la combinaison, d'une part de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* et d'autre part pour la combinaison de l'oxyde de caryophyllène avec le cisplatine. Ce test a été réalisé *in vitro* sur la lignée P815 en utilisant le MTT.

L'expérimentation a consisté à appliquer, d'une part, une dose constante de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* ($IC_{30}=3,40 \mu\text{g/ml}$) et d'autre part une dose constante de l'oxyde de caryophyllène ($IC_{30}=3 \mu\text{M}$) sur une culture cellulaire dans des plaques de microtitration de 96 puits (Thermo Fisher Scientific) et à l'apport de concentrations décroissantes en partant de la concentration initiale de 100 μM de cisplatine et en arrivant à la concentration finale de 0,78 μM .

L'effet synergique, additif ou antagoniste a été évalué en calculant l'indice de combinaison CI (combination index). Ce dernier est calculé par l'équation de Chou-Talalay dont la formule générale est la suivante (Chou and Talalay, 1984) :

$$CI = (D)_1 / (D_x)_1 + (D)_2 / (D_x)_2$$

(D)₁ et (D)₂ sont les doses respectives de cisplatine et de l'HE de *Lippia citriodora* donnant X% d'effet en association. (D_x)₁ et (D_x)₂ sont les doses, respectivement, de cisplatine et de l'HE de *Lippia citriodora* donnant X% d'effet quand ils sont utilisés seuls.

Un CI < 1 indique une synergie, > 1 indique un antagonisme et un CI = 1 indique une additivité.

8. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR en temps réel)

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une technique essentielle en biologie moléculaire. Elle est hautement sensible et spécifique pour la détection des acides nucléiques. C'est une méthode qui a révolutionné l'analyse quantitative des gènes et de leurs ARN messagers. Elle permet de quantifier en temps réel l'amplification d'une séquence d'intérêt. Cette technique s'effectue en plusieurs étapes. La première étape consiste à extraire les ARN totaux des cellules. Ensuite vient une étape de conversion des ARN messagers (ARNm) en ADN complémentaire (ADNc) grâce à une réaction de transcription inverse. Et enfin, les ADNc d'intérêt sont amplifiés et quantifiés par une méthode faisant intervenir un marqueur moléculaire fluorescent SYBR Green.

Dans notre protocole expérimental, les cellules de la lignée tumorale MCF7 (environ 10⁵ cellules/ml) ont été cultivées dans des plaques à 6 puits et traitées avec des huiles essentielles de *Lippia citriodora* (IC₃₀) pendant 6h et 12h à 37 °C et à 5% de CO₂. Le méthotrexate a été utilisé comme témoin positif.

L'ARN total a été extrait des cellules cultivées à l'aide d'un ARN d'isolat II Minikit (Bioline), conformément aux instructions du fabricant. Pour éviter une éventuelle contamination de l'ADN, une digestion par Ambion Turbo DNase (Life Technologies, US) a été effectuée sur les échantillons d'ARN. Les concentrations d'ARN ont été mesurées à 260 nm par Nanodrop 8000. La qualité et la pureté des préparations ont été déterminées en mesurant le rapport d'absorption DO 260 : DO 280 nm (doit être compris entre 1,8 et 2,0). Les échantillons d'ARN traités par la DN-ase, ont été transcrits en sens inverse en utilisant la transcriptase inverse SuperScript III et l'oligo (dT) (Bazargani et al., 2006) (Invitrogen, Carlsbad, CA) sur 1 µg d'ARN total suivant les recommandations du fabricant (volume final de 20 µl). Les ADN-c ont ensuite été stockés à -20 °C jusqu'à utilisation dans l'amplification de la PCR en temps réel.

L'ADN-c du premier brin a été utilisé comme matrice pour des amplifications PCR en temps réel avec des amorces spécifiques de gènes (confirmé par la PCR conventionnelle et la PCR en temps réel). KAPA SYBR Green qPCR Kit (Kapa Biosystems, Cape Town, SA) a été utilisé pour la

détection des gènes étudiés (tableau 11). Toutes les amorces ont été synthétisées au niveau de la plate-forme de la génomique fonctionnelle du CNRST, Rabat, Maroc.

Tableau 11 : Séquences des amorces des gènes étudiés.

Gène	Séquences des amorces 5'-3'
GAPDH	F: CAA GGT CAT CCA TGA CAA CTT TG
	R: GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA G
Bcl2	F: GTG AAC TGG GGG AGG ATT GT
	R: GGA GAA ATC AAA CAG AGG CC
Bax	F: ATG GAC GGG TCC GGG GAG CA
	R: CCC AGT TGA TGC CGT CA
p53	F: TCA GAT CCT AGC GTC GAG CCC
	R: GGG TGT GGA ATC AAC CCA CAG
c-jun	F: GAC TGC AAA GAT GGA AAC GA
	R: GTT GCT GGA CTG GAT TAT CA

La PCR a consisté en 10 µl de SYBR Green Fast Ready Mix, 300 nM de chaque amorce sens et antisens, 200 ng d'ADN-c, et complétés avec de l'eau stérile pour un volume final de 20 µl. Les réactions PCR sont conduites sur le thermocycleur RotorGene 6000 (Corbett Research, Australie) avec les paramètres suivant : 95 °C pendant 3 min (dénaturation initiale), puis 40 cycles à 95 °C pendant 10 secondes (dénaturation) et 60 °C pendant 30 secondes (hybridation des amorces et d'élongation) et une courbe de fusion finale de 65 °C à 95 °C par 0,1 °C d'intervalle. Chaque échantillon est répété en dupliquata. Les contrôles négatifs sont également inclus et contiennent tous les éléments du mélange réactionnel sans l'ADN-c.

L'analyse des données d'expression des gènes par la quantification relative (RQ) de Bcl-2, Bax, p53 et c-jun après traitement par l'HE de *Lippia citriodora* a été calculée en utilisant la PCR quantitative en temps réel et la méthode de calcul des Ct : $2^{-\Delta\Delta Ct}$ dans laquelle : $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (gène cible) - ΔCt (calibrant), avec : $\Delta Ct = Ct$ (gène cible) - Ct (gène endogène), basée sur la méthode de Livak et Schmittgen, 2001 (Livak and Schmittgen, 2001).

9. Etude préclinique de l'activité antitumorale de l'HE de *Lippia citriodora*

Le modèle animal de cette étude, *in vivo*, est constitué de souris (DBA₂/H²d), achetées au centre d'élevage animal d'Orléans (France). Dans cette étape préclinique, l'objectif est de se rapprocher des conditions physiopathologiques dans lesquelles se développe le cancer. Ainsi, nous induisons

une tumeur solide chez ces souris par des xénogreffes à l'aide d'injection en sous-cutané des cellules de la lignée P815. L'administration des quantités bien précises de l'huile essentielle de *Lippia citriodora*, permettra de suivre sa pharmacocinétique (absorption, distribution, métabolisme et élimination), d'étudier son activité thérapeutique réelle et sa toxicité potentielle.

Nos expérimentations animales se sont déroulées dans des conditions du respect de l'éthique et selon les principes relatifs aux soins et à l'utilisation des animaux de laboratoire. Les souris DBA₂ ont été maintenues en élevage dans des conditions ne risquant pas des infections par des agents pathogènes spécifiques. L'alimentation et l'abreuvement sont fournis ad-libitum à une température de 25 °C et une photopériode de 12 heures. Les souris qui ont été utilisées dans nos expériences sont âgées de 6 à 8 semaines et ont un poids moyen de 20 g.

Les cellules tumorales P815 étaient recueillies par centrifugation à 1400 tours/mn pendant 10 mn à température ambiante. Les culots obtenus ont été lavés deux fois avec du PBS et remis en suspension dans 1 ml de PBS et comptées. Environ 10⁷ cellules vivantes, mises en suspension dans un volume de 100 µl de PBS, ont été injectées en sous-cutané, sous anesthésie à l'éther, à des souris. A bout de quelques jours, une tumeur primitive s'est développée. Lorsque celle-ci a atteint un volume palpable, ces souris dites « donatrices » ont été sacrifiées et leurs tumeurs ont été dissociées en petits morceaux de tailles similaires qui ont servi de xénogreffes sur des souris utilisées pour les essais. Après 10 jours de repos, et lorsque les tumeurs deviennent palpables, les souris ont été réparties en trois lots de six souris chacun.

Groupe A : souris greffées recevant des doses $D_1 = 50 \text{ mg/Kg}$ de poids corporel (1,5 µl de l'HE de *Lippia citriodora* de Berkane, la plus cytotoxique, dilués dans 100 µl d'huile végétale de Maïs) administrées par gavage.

Groupe B : souris greffées recevant des doses $D_2 = 100 \text{ mg/Kg}$ de poids corporel (3 µl de l'HE de *Lippia citriodora* de Berkane, la plus cytotoxique, dilués dans 100 µl d'huile végétale de Maïs) administrées par gavage.

Groupe C : souris greffées ne recevant que 100 µl d'huile végétale de Maïs administrés par gavage (lot témoin).

Les traitements ont été effectués à partir du 10^{ème} jour. Le poids des souris ainsi que le volume tumoral ont été mesurés tous les deux jours pendant 30 jours. Le volume tumoral pour chaque souris est déterminé par des mesures des dimensions des tumeurs à l'aide d'un pied à coulisse selon la formule suivante :

Volume tumoral (cm³) = (D x d²)/2. Où « D » est la longueur et « d » est la largeur des tumeurs mesurées aux jours des traitements, comme décrit par Yoshikawa et al. (Yoshikawa et al., 1995).

10. Etude de l'activité antibactérienne de l'HE de *Lippia citriodora*

10.1. Evaluation de l'activité antibactérienne sur milieu gélosé

10.1.1. Conditions de culture bactérienne

Les souches bactériennes (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) ont été aimablement fournies par le laboratoire de Bioprocess et Biointerface dirigé par le professeur Hassan Latrache, de la Faculté des Sciences et Techniques de Beni Mellal. Ces bactéries ont été maintenues en culture sur milieu nutritif de Mueller-Hinton.

10.1.2. Méthode de diffusion sur disques (aromatogramme)

La méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode de disques est une technique qualitative permettant de déterminer la sensibilité des bactéries vis-à-vis d'une substance réputée antibactérienne. Cette méthode repose sur le pouvoir de diffusion des huiles essentielles à l'intérieur d'une boîte de Pétri, dans un milieu nutritif solide (Mueller Hinton).

La détermination des diamètres d'inhibition des huiles essentielles de *Lippia citriodora* sur les cultures bactériennes d'*Escherichia coli* ATCC 25922, de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 a été réalisée (en triplicata) par la méthode de diffusion sur disques selon le NCCLS (the National Committee for Clinical Laboratory Standards, dénommé CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) (NCCLS/CLSI, 2002).

Les bactéries à tester ont étéensemencées sur des boîtes de Pétri contenant le milieu de Mueller-Hinton puis incubés à 37 °C pendant 24 heures, afin d'obtenir des colonies jeunes et bien isolées. Après ce temps d'incubation, 1 à 2 colonies bactériennes bien isolées et parfaitement identiques ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine, émulsionnées dans un tube contenant 2 ml d'eau physiologique stérile puis agitées au vortex. La densité de l'inoculum a été ajustée à 0,5 McFarland grâce à un turbidimètre (l'absorbance à 625 nm doit être comprise entre 0,08 et 0,13). Cette dilution a permis d'avoir une suspension bactérienne à 10⁸ UFC/ml. L'inoculum de chaque espèce bactérienne a été réalisé par dilution dans de l'eau physiologique de la manière suivante :

- *Pseudomonas aeruginosa*, 10 µl de l'inoculum est dilué dans 10 ml d'eau physiologique.
- *Escherichia coli*, 100 µl de l'inoculum est dilué dans 10 ml d'eau physiologique.

- *Staphylococcus aureus*, 1000 µl de l'inoculum est dilué dans 10 ml d'eau physiologique.

Le milieu de culture gélose de Mueller-Hinton en surfusion a été réparti dans des boîtes de pétri de 90 mm de diamètre afin d'obtenir une épaisseur de 5 mm de gélose. Après solidification, ces boîtes de Pétri ont été inondées, à leurs surfaces, avec 100 µl de l'inoculum de chaque espèce bactérienne et répartis uniformément, après séchage, des surfaces de la gélose.

Les disques de papier Whatman n°1 stériles de 6 mm de diamètre (Jirovetz et al., 2006) ont été imprégnés d'une quantité de 6 µl d'huiles essentielles de *Lippia citriodora* et placés de manière aseptique sur la surface de la gélose Mueller-Hinton inoculée, puis, les boîtes de Pétri,ensemencées, ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures. Des disques imprégnés d'antibiotiques standards (6 mm) ont été utilisés comme témoins positifs : Ceftriaxone (30 µg), Ofloxacin (5 µg) et des disques vierges ont été utilisés comme témoins négatifs.

L'absence de croissance bactérienne exprimant une activité antimicrobienne se traduit par un halo translucide autour du disque, de même couleur que la gélose stérile et dont le diamètre est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse (exprimé en mm). Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'huile essentielle. Plus il est petit, plus la bactérie est résistante (Fauchère and Avril, 2002).

10.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB)

Les tests de détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales bactéricides (CMB) ont été réalisés en triple test par la méthode standard de microdilution en bouillon de Mueller-Hinton (NCCLS/CLSI, 2002). Des concentrations d'huiles essentielles de *Lippia citriodora* ont été solubilisées dans du DMSO (Sigma-Aldrich) avec des dilutions en série décroissantes (1:2) à partir de 2,5% (v/v) et ont été mises en contact avec des suspensions bactériennes, préparées comme précédemment et ajustées 0,5 McFarland (10^8 UFC/ml), dans des puits d'une microplaque de microtitration à 96 puits (Thermo Fisher Scientific) puis incubée à 37 °C pendant 24 h. Le témoin non traité (puits contenant des bactéries avec du DMSO à une concentration de 1%) a été inclus dans le test comme témoin négatif. Après incubation, la croissance bactérienne a été évaluée par la mesure des densités optiques, dans les puits (à 600 nm) avec un spectrophotomètre (Multiskan EX). La CMI a été déterminée comme suit :

$$\text{Cytotoxicité (\%)} = [(\text{DO témoin non traité} - \text{DO huiles essentielles}) / \text{DO témoin non traité}] \times 100$$

DO huiles essentielles : est la densité optique de la suspension dans les puits contenant des bactéries traitées aux huiles essentielles et DO témoin non traité : est la densité optique de la suspension dans les puits contenant des bactéries avec du DMSO et sans huiles essentielles (contrôle négatif).

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration de l'huile essentielle à laquelle la bactérie ne montre pas de croissance visible (aux alentours de 90% de cytotoxicité). La CMB est définie comme étant la plus faible concentration de l'huile essentielle à laquelle les bactéries incubées ont été complètement tuées (aux alentours de 99% de cytotoxicité).

Analyses statistiques

Les données ont été exprimées en tant que valeurs moyennes \pm SEM de trois expériences différentes, chacune d'elles a été réalisée en double. La signification statistique a été déterminée avec l'analyse de la variance à un facteur suivie d'un test post hoc de Scheffe. Les différences ont été considérées statistiquement significatives à $p < 0,05$.

11. Mesure de l'activité antiradicalaire de l'HE et de l'extrait hydro-alcoolique des feuilles de *Lippia citriodora*

Ce test s'inscrit dans le cadre de la recherche de l'effet antioxydant des extraits des feuilles de *Lippia citriodora*. La méthode appliquée pour mesurer cette activité est celle du piégeage des radicaux libres à l'aide du DPPH•

*Préparation de l'extrait hydro-alcoolique des feuilles de *Lippia citriodora**

Les feuilles de *Lippia citriodora* ont été séchées et broyées et une extraction par la méthode Soxhlet dans un mélange eau/éthanol a été réalisée. Le solvant a été ensuite évaporé dans un évaporateur rotatif. L'extrait lyophilisé obtenu, à côté de l'HE déjà obtenue par la distillation avec la méthode Clevenger ; ont servi dans l'expérimentation.

Principe du test

En présence de composés antioxydants, le radical DPPH•, de couleur bleue, est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 540 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH• qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon. Le suivi de la décoloration est réalisé par spectrophotométrie. La concentration inhibitrice IC₅₀ (µg/ml), correspondant à la réduction de 50% des radicaux DPPH, permet d'évaluer le pouvoir antioxydant de l'extrait analysé comparé à celui de l'acide ascorbique (antioxydant de référence) (Brand-Williams et al., 1995; Kedare and Singh, 2011).

Protocole

Une solution de DPPH• (4 mg dans 100 ml de méthanol 90%) a été préparée à l'avance. L'HE, l'extrait hydro-alcoolique et la vitamine C (contrôle positif) ont été dissous dans une solution de méthanol (90%) (Brand-Williams et al., 1995; He and Venant, 2004; Popovici et al., 2010). Ensuite, la solution de DPPH, préparée, a été ajoutée à raison de 100 µl par puits dans des plaques de microtitration de 96 puits à fond plat contenant au préalable des dilutions en cascade sur chaque colonne de 8 puits de l'HE, de l'extrait hydro-alcoolique à tester (la concentration initiale avant cette cascade de dilutions est de 400 µg/ml), de la vitamine C (contrôle positif) ou du méthanol (contrôle négatif). Après une incubation de 30 minutes à l'obscurité, la densité optique est mesurée à 540 nm contre celle d'un blanc qui ne contient que la solution méthanolique de DPPH. L'activité antiradicalaire AAR (%) de l'échantillon testé, correspondant au pourcentage d'inhibition du radical DPPH, est calculée selon la formule suivante :

$$\text{AAR (\%)} = (1 - \text{DO}_{\text{test}} / \text{DO}_{\text{blanc}}) \times 100$$

DO_{test} étant la densité optique dans les puits contenant l'HE, l'extrait hydro-alcoolique ou la vitamine C et DO_{blanc} étant la densité optique des puits de contrôle contenant la solution méthanolique de DPPH (40 mg/l). Les résultats obtenus sont des moyennes d'essais effectués en trois répétitions.

Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés en moyennes (SD) à partir d'au moins trois répétitions. Les comparaisons de la lyse cellulaire suite au traitement de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* ont été réalisées en utilisant le test t de Student. L'analyse de variance unilatérale suivie d'un test de Scheffé post hoc a été utilisée pour comparer les niveaux d'expression des gènes cibles des cellules MCF7 traitées à l'huile essentielle. $P < 0,05$ a été considéré comme statistiquement significatif. ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Résultats et discussion

I. Composition chimique de l'HE de *Lippia citriodora*

Les caractéristiques physiques de l'HE *Lippia citriodora*, obtenue par distillation à la vapeur d'eau à partir des feuilles de la plante cultivée, dans différentes régions du Maroc sont les suivantes :

- Aspect : liquide mobile, limpide ;
- Couleur : jaune plus ou moins foncée ;
- Odeur : caractéristique (citronnée, fraîche) ;
- Densité à 20 ° C (0,879).

La composition chimique de cette huile essentielle a été déterminée par la technique de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/MS). La figure 45 représente les spectres chromatographiques obtenus. Comme représenté sur cette figure, cette composition est différente d'une région à l'autre. En outre, parmi les 72 pics révélés, 64 pics (96%) ont été identifiés (selon la base de données de l'Institut national des normes et de la technologie ou NIST, une agence du département du commerce des Etats-Unis). 24 pics représentent environ 80% des composés et 8 pics (environ 4%) représentent des molécules inconnues (Tableau 12).

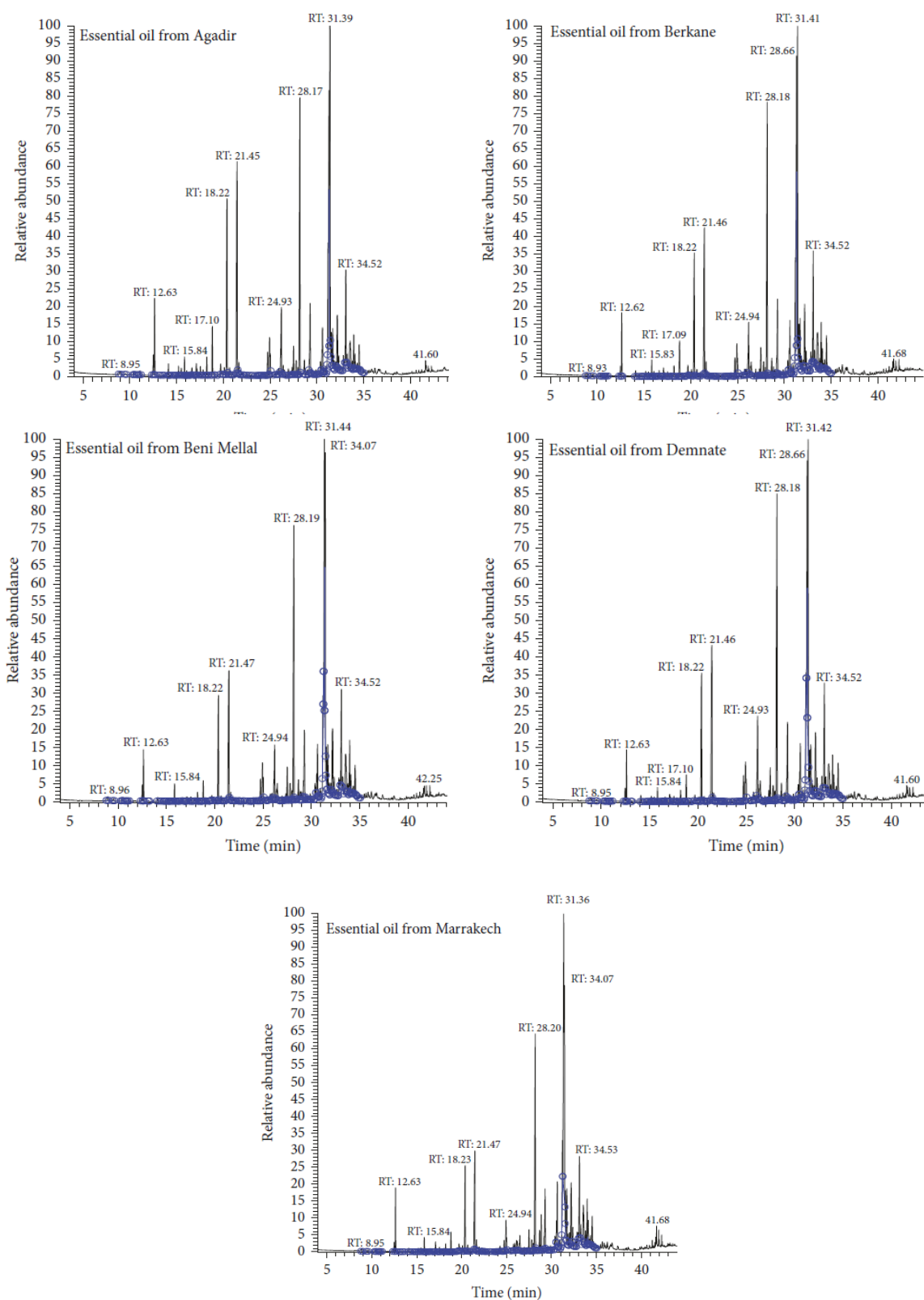


Figure 45 : Chromatogrammes des HE de *Lippia citriodora* de différentes régions étudiées du Maroc.

Tableau 12 : Composition chimique des HE de *Lippia citriodora* analysée par CPG/MS.

N°	Component ^a	RI ^b	%					Identification
			AG	BM	BE	DE	MA	
1	α -pinène	909	0.23	0.39	0.17	0.21	0.20	RI,MS
2	α -thuyène	927	0.09	0.14	0.08	0.09	0.08	RI,MS
3	β -pinène	964	0.14	0.14	0.09	0.12	0.09	RI,MS
4	Sabinène	972	0.04	0.05	0.03	0.04	0.04	RI,MS
5	6-méthyl-5-heptèn-2-one	987	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	RI,MS
6	β -myrcène	988	0.03	0.02	0.02	0.02	0.04	RI,MS
7	α -terpinène	1017	0.12	0.10	0.08	0.08	0.09	RI,MS
8	Paracymène	1024	0.02	-	-	-	-	RI,MS
9	Limonène	1027	0.71	0.63	0.36	0.5	0.39	RI,MS
10	1.8-cinéole	1031	1.97	1.44	1.66	1.41	1.97	RI,MS
11	Cis β -ocimène	1037	0.02	0.02	-	0.02	0.01	RI,MS
12	Trans β -ocimène	1045	0.04	0.03	0.05	0.03	0.05	RI,MS
13	γ -terpinène	1054	0.33	0.13	0.15	0.18	0.14	RI,MS
14	trans-sabinène hydrate	1096	0.29	0.14	0.17	0.17	0.13	RI,MS
15	Camphénol, 6-	1110	0.08	0.04	0.05	0.06	0.05	RI,MS
16	Cis-limonène oxyde	1117	0.16	0.10	0.14	0.13	0.22	RI,MS
17	Campholène aldéhyde	1125	0.58	0.26	0.4	0.4	0.40	RI,MS
18	Trans-p-mentha-2.8-diéno	1127	0.18	0.17	0.16	0.10	0.12	RI,MS
19	Cis-p-mentha-2.8-dièn-1-ol	1131	0.33	0.18	0.20	0.21	0.15	RI,MS
20	Trans verbéno	1144	0.64	0.34	0.47	0.38	0.45	RI,MS
21	Cis verbéno	1153	7.78	4.87	5.22	5.82	4.41	RI,MS
22	3-Cyclohexène-1-Carboxaldéhyde. 1. 3.4-triméthyl-	1171	0.70	0.63	0.59	0.53	0.62	RI,MS
23	Cis-p-mentha-1(7) .8-dièn-2-ol	1185	0.13	0.09	0.14	0.07	0.07	RI,MS
24	Verbényl éthyl éther	1186	0.31	0.30	0.24	0.35	0.31	RI,MS
25	2-carène	1189	1.71	0.86	1.11	1.03	0.84	RI,MS
26	Myrténol	1193	0.58	0.33	0.36	0.37	0.32	RI,MS
27	Trans-2-carèn-4-ol	1222	0.53	0.29	0.43	0.33	0.42	RI,MS
28	D-carvone	1223	0.27	0.22	0.26	0.19	0.34	RI,MS
29	Cis-carvéol	1226	0.06	0.03	0.04	0.05	0.03	RI,MS
30	Nérol	1228	1.85	2.16	1.56	2.05	1.60	RI,MS
31	Néral	1242	10.02	7.23	8.57	8.18	6.37	RI,MS
32	Pipéritone	1250	0.15	0.11	0.14	0.12	0.07	RI,MS
33	2. 6.6-Triméthyl-1-cyclohexène-1-acétaldéhyde	1254	0.27	0.12	0.19	0.18	0.15	RI,MS
34	aldéhyde périllique	1257	0.03	0.03	0.02	0.03	0.04	RI,MS
35	Para-cymèn-7-ol	1289	0.05	0.09	0.13	0.05	0.10	RI,MS

36	8. 11.14- acide eicosatriénoïque (Z. Z. Z)-	1294	0.04	0.05	0.03	0.03	0.03	RI,MS
37	1-(1.3-diméthyl-buta-1.3-Diényl)- 3.7.7-triméthyl-2-oxa- bicyclo[3.2.0]hépt-3-ène	-	0.03	0.03	0.03	0.03	0.06	RI,MS
38	Trans carvyl acétate	1342	0.07	0.07	0.07	0.08	0.04	RI,MS
39	Eugénol	1356	0.19	0.22	0.20	0.21	0.31	RI,MS
40	Géranyle acétate	1365	0.66	1.22	0.91	1.29	1.06	RI,MS
41	α -copaène	1375	1.25	1.73	1.27	1.45	2.16	RI,MS
42	Isolédène	1377	3.48	4.46	3.89	4.19	4.04	RI,MS
43	7-Tétracyclo [6.2.1.0 (3.8)0(3.9)] Undécanol. 4. 4. 11.11- tétraméthyl-	-	0.10	0.17	0.12	0.14	0.13	RI,MS
44	Di-épi- α -cédrene	1412	0.67	0.96	0.67	0.82	0.68	RI,MS
45	β -caryophyllène	1420	3.11	3.26	2.77	4.18	1.85	RI,MS
46	ζ -élémente	1433	2.30	3.04	2.77	2.99	2.93	RI,MS
47	α -bergamotène trans-	1434	0.09	0.09	0.08	0.09	0.04	RI,MS
48	Aromadendrène	1440	0.06	0.05	0.06	0.1	0.05	RI,MS
49	α -humulène	1453	0.6	0.49	0.59	0.61	0.20	RI,MS
50	Alloaromadendrène	1460	1.66	1.36	1.02	1.30	1.00	RI,MS
51	Germacrène-D	1480	0.28	0.39	0.29	0.36	0.31	RI,MS
52	Ar- curcumène	1483	11.47	13.38	11.28	14.15	11.30	RI,MS
53	β -guaïène	1490	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	RI,MS
54	Tricyclo[5.2.2.0(1.6)]undécan-3- ol.2-Méthylène-6.8.8-triméthyl-	1498	0.49	0.68	0.56	0.56	0.65	RI,MS
55	α -muurolène	1499	-	0.04	-	0.04	-	RI,MS
56	ζ -himachalène	1505	0.34	0.60	0.47	0.46	0.64	RI,MS
57	Calaménène	1514	0.09	0.16	0.11	0.12	0.13	RI,MS
58	9-Isopropyl-1-méthyl-2- méthylène-5- oxatricyclo[5.4.0.0(3.8)]undécane	1522	0.05	0.09	0.07	0.08	0.09	RI,MS
59	Υ -cadinène	1523	0.17	0.26	0.19	0.23	0.22	RI,MS
60	ζ -cadinène	1524	3.89	5.04	4.57	4.99	4.86	RI,MS
61	β -spathuléol	1576	13.27	10.19	15.61	9.42	13.42	RI,MS
62	Trans-caryophyllène oxyde	1580	13.52	13.25	14.14	13.28	14.22	RI,MS
63	Lédène oxyde (I)	1631	1.75	2.96	2.41	2.25	3.01	RI,MS
64	Cédren-13-ol, 8-	1657	-	0.02	0.03	0.01	0.05	RI,MS
65	Alloaromadendrène oxyde-(1)	1672	3.06	4.26	4.37	3.79	4.35	RI,MS

66	Alloaromadendrène oxyde-(2)	1678	0.28	0.50	0.4	0.4	0.79	RI,MS
67	Eudesma-4-11-diène-2-ol	1690	0.31	0.46	0.46	0.45	0.62	RI,MS
68	Trans nuciférol	1727	2.31	3.10	2.60	3.10	3.86	RI,MS
69	Cis nuciférol	1734	2.17	3.30	2.32	2.80	3.17	RI,MS
70	Murolan-3.9(11)-diène-10-péroxy	-	0.36	0.53	0.5	0.48	0.73	RI,MS
71	Lédène oxyde (II)	2062	0.35	0.45	0.47	0.45	0.57	RI,MS
72	Tricyclo[5.2.2.0(1.6)]undécane-3-ol.2-méthylène-6.8.8-triméthyl-	-	0.97	1.25	1.31	1.33	1.35	RI,MS

a) Les composés sont énumérés dans l'ordre de leur élution à partir d'une colonne de type DB-5. b) Indice linéaire de rétention tiré du NIST 08, Institut national des normes et de la technologie, bibliothèque spectrale de masse (NIST / EPA / NIH). AG: HE d'Agadir. BM: HE de Beni Mellal. BE: HE de Berkane. DE: HE de Demnat. MA: HE de Marrakech.

Tableau 13 : Principaux composés majoritaires de l'HE de *Lippia citriodora* analysés par CPG/SM.

Molécules	% AG	% BM	% BE	% DE	% MA
Trans-caryophyllène oxyde	13.52	13.25	14.14	13.28	14.22
β-spathuléol	13.27	10.19	15.61	9.42	13.42
Ar- curcumène	11.47	13.38	11.28	14.15	11.30
Néral	10.02	7.23	8.57	8.18	6.37
Cis verbéol	7.78	-	5.22	5.82	-

AG: HE d'Agadir. BM: HE de Beni Mellal. BE: HE de Berkane. DE: HE de Demnat. MA: HE de Marrakech.

L'analyse du tableau 12 a révélé une composition chimique variable aux niveaux quantitatif et qualitatif. Le résultat n'a pas montré l'existence de chémotypes. En effet, les principales molécules qui dominent la composition chimique, appartiennent à cinq familles biochimiques, à savoir les sesquiterpènes (Ar-curcumène 12,32%), les oxydes terpéniques (oxyde de caryophyllène 13,68%), les sesquiterpénols (spathuléol 12,38%), les aldéhydes monoterpéniques (8,07% néral) et les monoterpénols (cis-verbéol 6,28%). Ces molécules constituent environ 53 % (Tableau 13). D'autres composés comme le β -caryophyllène, l'isolédène, l'élémane, le 1,8 cinéole, le copaène et le nérol sont également présents avec des taux variables. Cependant, le limonène et la 6-méthyl-5-heptène-2-one, composés constants dans l'HE de *Lippia citriodora* d'origine marocaine à des proportions variant respectivement de 14% pour le premier et de 3% pour le second, sont présents dans les HE étudiées dans ce présent travail à un taux très faible avec une moyenne allant de 0,02% à 0,5% (Bellakhdar et al., 1994).

Il est connu que la composition chimique des huiles essentielles, en général, est variable selon le climat, la nature du sol, l'altitude. Elle dépend, aussi, de la période de cueillette au cours du

cycle végétatif, des conditions de récolte, de l'opération de séchage et de stockage et des méthodes d'extraction utilisées (Catalan et al., 2002; Santos Gomes et al., 2005).

D'autre part, certains auteurs ont rapporté différents chémotypes de l'HE de *Lippia citriodora*. En effet, l'HE d'Argentine est riche en cétones (mercénone 36,50%, α -thuyone 13,10%), alors que le limonène n'en est qu'à 6,87% (Zygaldo et al., 1994). En outre, l'HE de Turquie a présenté un taux des citrals (néral, géraniol) allant de 17,90% à 27,10% et du limonène avec un taux moyen de 16% (Özek et al., 1996). Les composés majoritaires de l'HE du Portugal étaient le géraniol allant de 26,80% à 38,30%, le néral allant de 20,80% à 29,60% et le limonène allant de 5,70% à 20,60% (Santos Gomes et al., 2005). La majorité des composés, trouvés dans les HE de *Lippia citriodora* étudiées, étaient quantitativement et qualitativement différents de ceux rapportés dans la littérature. Par exemple, les taux moyens du limonène et du géraniol étaient respectivement de 17% et 9% dans l'HE du Maroc (feuilles récoltées au mois de Mai). Le limonène n'est que de 0,52% et le géraniol n'est pas détecté dans les HE actuellement étudiées (feuilles récoltées entre le mois de Juillet et le mois d'Aout). Cependant, les taux des sesquiterpènes (β -caryophyllène, Ar-curcumène, β -élémane), des oxydes terpéniques (oxyde de caryophyllène), des alcools monoterpéniques (cis-verbénol) et des sesquiterpènes (spathuléol) étaient plus élevés (Bellakhdar et al., 1994). Enfin, il est intéressant de noter que le limonène, le β -caryophyllène, le p-cymène, le linalol, le citral, l' α -pinène et le 1,8-cinéole sont des composés courants des huiles essentielles de *Lippia sp* et peuvent être responsables des effets biologiques spécifiques et des propriétés pharmacologiques attribuées au genre *Lippia* (Pascual et al., 2001).

II. Propriétés antitumorales de l'HE de *Lippia citriodora*

II.1. Cinétique de cytotoxicité *in vitro* de l'HE de *Lippia citriodora*

La compréhension des mécanismes d'activité pharmacologique d'un composé passe par l'étude de son effet au cours du temps. Pour cela nous avons suivi la cinétique de lyse des cellules P815 sous l'effet des HE de *Lippia citriodora* pendant 24 h et 48 h. L'objectif est de déterminer la durée d'incubation optimale pour l'obtention d'un maximum de cytotoxicité et d'approcher le profil dont l'allure peut être associée à un type de mécanisme d'activité précis (Figure 46).

Comme le montre cette figure, les HE étudiées ont montré un très fort effet cytotoxique contre cette lignée tumorale. Cette activité cytotoxique commence tôt et augmente avec la dose et la durée d'exposition. En effet, à 24h d'incubation, la lyse cellulaire par l'HE est différente d'une région à l'autre. Les cytotoxicités d'Agadir ($IC_{50} = 19,27 \mu\text{g/ml}$) et de Berkane ($IC_{50} = 20,75 \mu\text{g/ml}$) sont plus marquées vis-à-vis de la lignée cellulaire P815 que celle de Marrakech ($IC_{50} =$

29,67 µg/ml), de Demnat (IC₅₀ = 37,06 µg/ml) et de Beni Mellal (IC₅₀ = 40,50 µg/ml). En outre, à 48h d'incubation, la cytotoxicité de toutes les HE a augmenté avec un effet plus prononcé de celui de Berkane (IC₅₀ = 06,60 µg/ml), de Beni Mellal (IC₅₀ = 06,84 µg/ml) et de Demnat (IC₅₀ = 07,74 µg/ml) que celui de Marrakech (IC₅₀ = 10,49 µg/ml) et d'Agadir (IC₅₀ = 15,38 µg/ml) (Tableau 14).

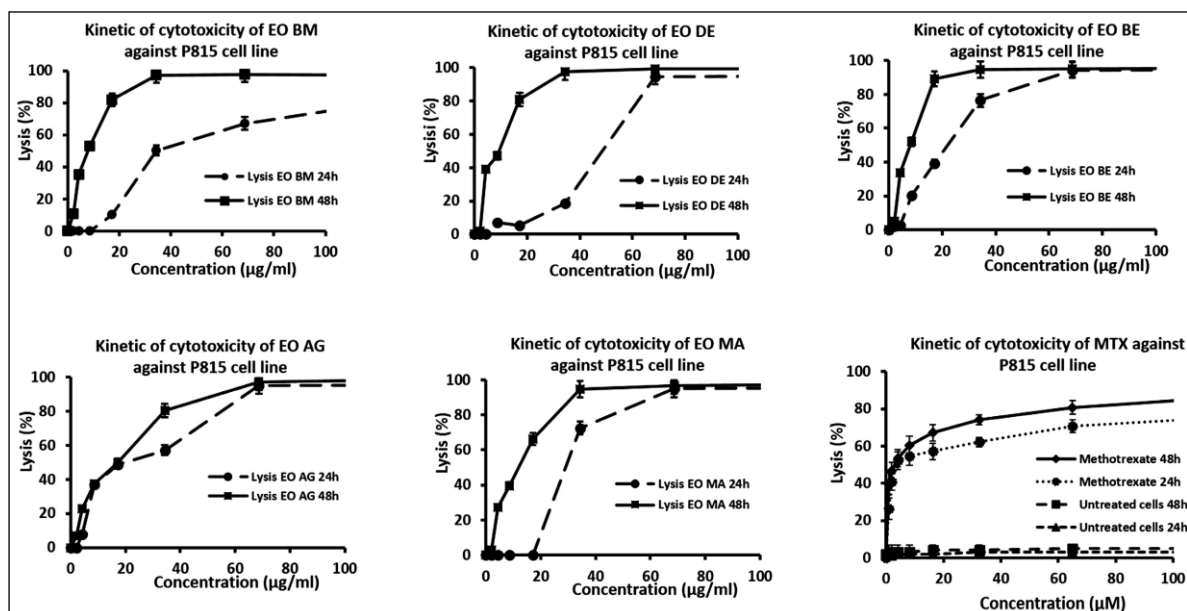


Figure 46 : Cinétique de cytotoxicité *in vitro* de l'HE de *Lippia citriodora* sur la lignée P815. Les cellules ($1,5 \times 10^5$ / ml) ont été traitées avec des concentrations croissantes des HE. Après 24 ou 48 h, la lyse cellulaire a été déterminée comme décrit dans matériel et méthodes. Les données sont la moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes. AG: Agadir. BM: Beni Mellal. BE: Berkane. DE: Demnat. MA: Marrakech. MTX: Le méthotrexate a été utilisé comme témoin positif.

Tableau 14 : Valeurs des IC₅₀ de l'HE de *Lippia citriodora* issues de différentes régions du Maroc contre la lignée cellulaire P815.

	IC ₅₀ (µg/ml) contre P815				
	AG	BE	BM	DE	MA
24h	19,27 \pm 3,70	20,75 \pm 4,50	40,50 \pm 3,90	37,06 \pm 2,30	29,67 \pm 1,60
48h	15,38 \pm 2,13	06,60 \pm 1,66	06,84 \pm 0,90	07,74 \pm 0,86	10,49 \pm 0,61

AG: Agadir. BE: Berkane. BM: Beni Mellal. DE: Demnat. MA: Marrakech.

II.2. Cytotoxicité *in vitro* de l'HE de *Lippia citriodora*

Les tests ont montré que l'HE de *Lippia citriodora* exerçait une activité cytotoxique dose-dépendante et différentielle, selon les régions, sur les cellules des lignées tumorales P815, MCF7 et VERO avec un pourcentage de viabilité de moins de 10%, moins de 20% et moins de 30%

pour les trois lignées respectivement, par application de la plus forte concentration des HE. Les IC_{50} oscillent entre 6,60 et 79,63 $\mu\text{g/ml}$ (Figures 47, 48, 49, 50, 51 et 52).

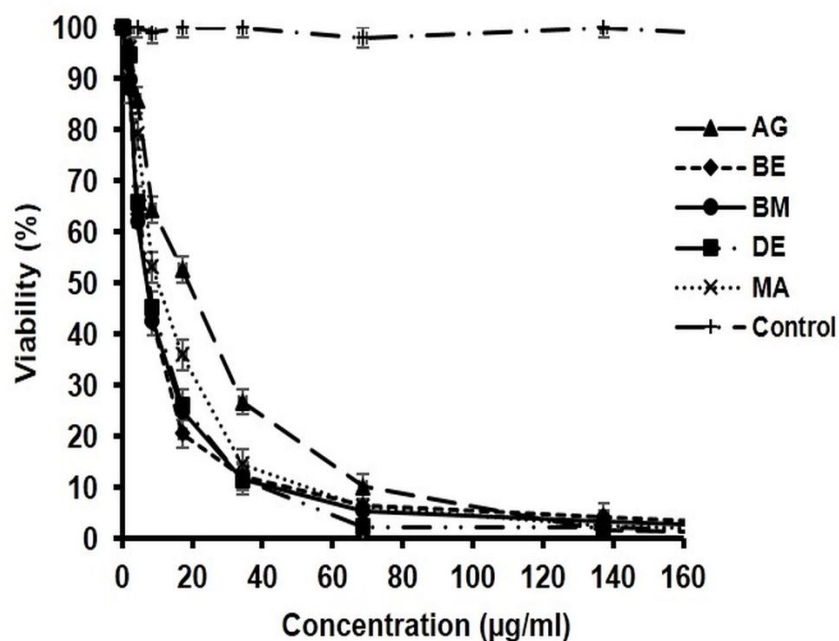


Figure 47 : Viabilité des cellules de la lignée tumorale P815 à l'égard de l'HE de *Lippia citriodora*. AG: Agadir. BE: Berkane. BM: Beni Mellal. DE: Demnat. MA: Marrakech. DMSO: contrôle négatif.

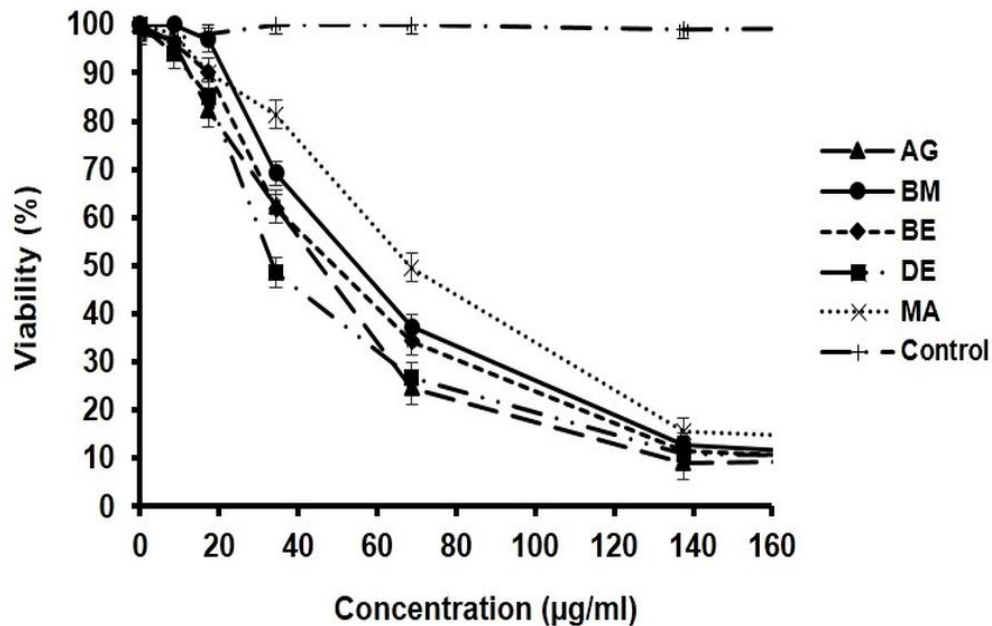


Figure 48 : Viabilité des cellules de la lignée tumorale MCF7 à l'égard de l'HE de *Lippia citriodora*. AG: Agadir. BE: Berkane. BM: Beni Mellal. DE: Demnat. MA: Marrakech. DMSO: contrôle négatif.

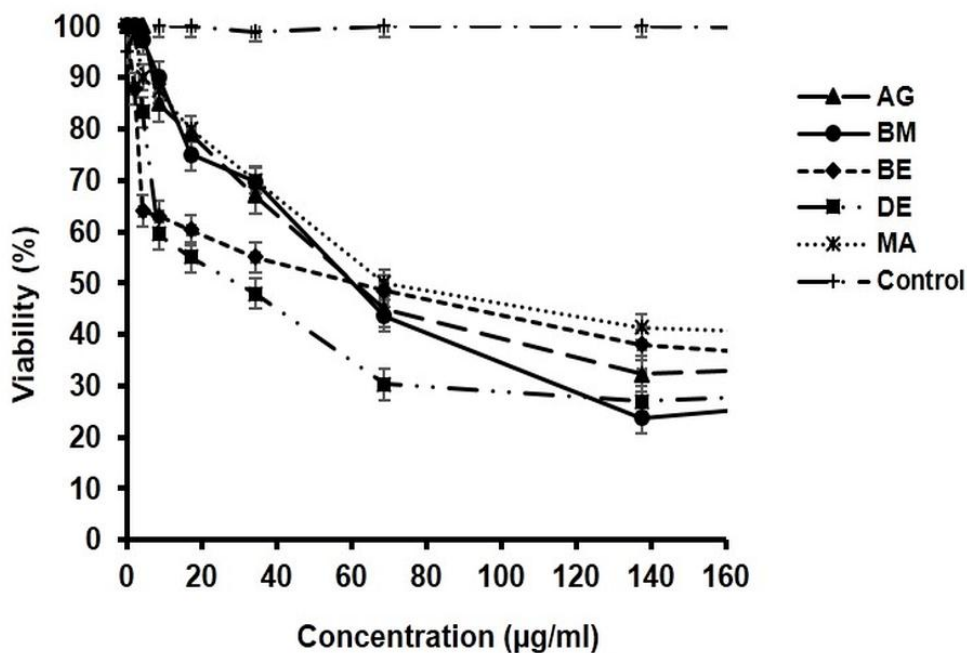


Figure 49 : Viabilité des cellules de la lignée tumorale VERO à l'égard de l'HE de *Lippia citriodora*. AG: Agadir. BE: Berkane. BM: Beni Mellal. DE: Demnat. MA: Marrakech. DMSO: contrôle négatif.

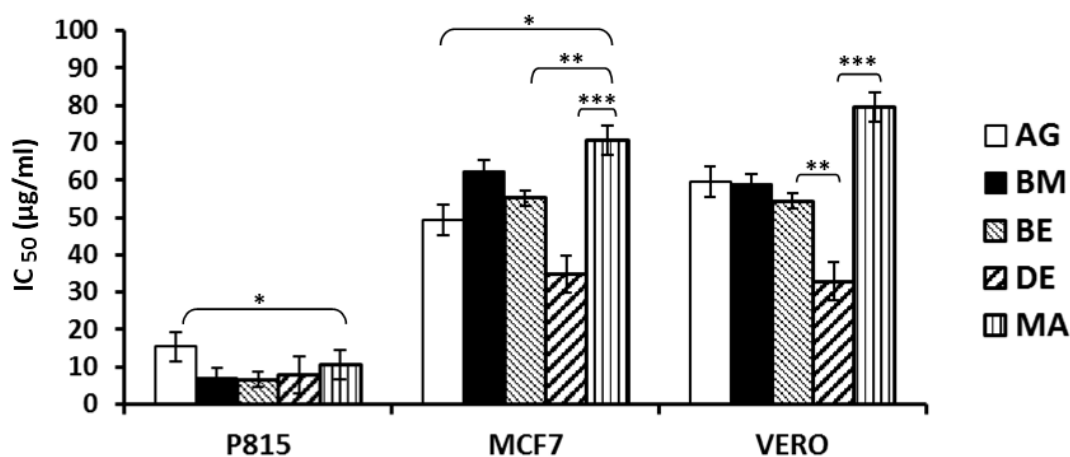


Figure 50 : IC₅₀ de l'HE de *Lippia citriodora* contre les lignées cellulaires P815, MCF7 et VERO. AG: Agadir. BM: Beni Mellal. BE: Berkane. DE: Demnat. MA: Marrakech.

Les données présentées ci-dessus sont les valeurs moyennes \pm SEM de trois expériences différentes ; chacune a été réalisée en double. La signification statistique a été déterminée avec l'analyse de variance à sens unique suivie d'un test de Scheffe post hoc.

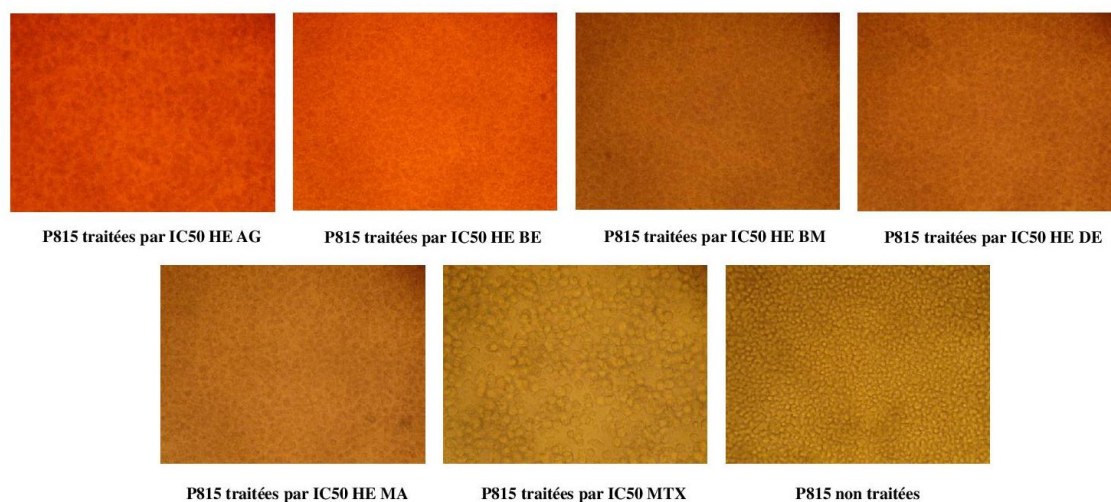


Figure 51 : Photographie des cellules de la lignée tumorale P815 traitées par les IC₅₀ de l'HE de *Lippia citriodora*. AG: Agadir. BE: Berkane. BM: Beni Mellal. DE: Demnat. MA: Marrakech. MTX: Méthotrexate (contrôle positif). NT: Non traité (contrôle négatif) (Gx400).

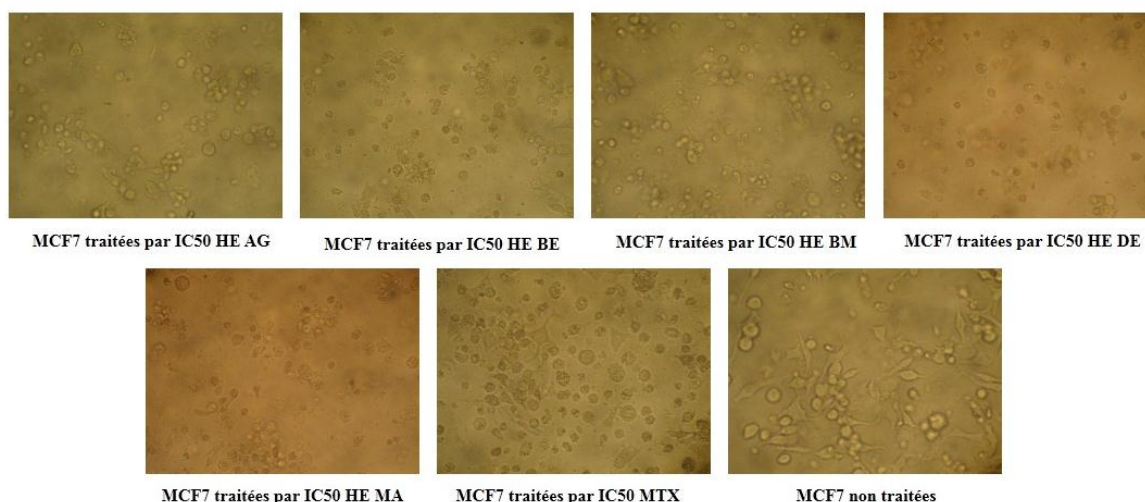


Figure 52 : Photographie des cellules de la lignée tumorale MCF7 traitées par les IC₅₀ de l'HE de *Lippia citriodora*. AG: Agadir. BE: Berkane. BM: Beni Mellal. DE: Demnat. MA: Marrakech. MTX: Méthotrexate (contrôle positif). NT: Non traité (contrôle négatif) (Gx400).

Discussion

Les cinq huiles essentielles étudiées ont montré un très fort effet cytotoxique contre la lignée P815 (l'HE de Berkane est la plus cytotoxique avec IC₅₀ = 6,60 µg/ml) et une activité élevée à modérée contre les lignées cellulaires MCF7 et VERO (l'HE de Demnat est la plus cytotoxique avec IC₅₀ = 34.72 µg/ml et 32.90 µg/ml, respectivement) (Döll Boscardin et al., 2012). Les données mentionnées à la figure 50 montrent que la cytotoxicité induite par les différentes huiles essentielles dépend de la composition chimique de chacune d'elles et de la lignée cellulaire tumorale cible. A notre connaissance et jusqu'à ce jour, il n'y a eu pas de travaux réalisés sur

l'activité cytotoxique de l'HE de *Lippia citriodora*. Cependant, l'effet cytotoxique de l'HE de *Lippia alba*, avec son principal constituant citral sur les lignées cellulaires HeLa et VERO, a été rapporté (Mesa Arango et al. 2009). La cytotoxicité observée, contre les différentes cellules de lignées tumorales, pourrait être due aux composés majoritaires des huiles essentielles. Dans notre étude, une différence quantitative des principaux composés majoritaires n'était pas significative, suggérant probablement que la cytotoxicité différentielle pourrait être attribuée à la différence dans la teneur de ces huiles essentielles en composés minoritaires, qui pourraient interagir entre eux ou avec les molécules majoritaires, déterminant ainsi l'intensité de l'activité cytotoxique globale (Franchomme, 1981; Gueldner et al., 1985). En effet, cette différence de composition pourrait être attribuée à des conditions environnementales variables d'une région à l'autre. La littérature rapporte l'induction de l'apoptose par les citrals (néral et gèranial) dans la leucémie lymphoïde chronique par l'activation de la caspase-3 (Dudai et al., 2005; De Martino et al., 2009). De plus, il a été démontré que le β -caryophyllène et l'oxyde de caryophyllène induisaient également l'apoptose dans les cellules tumorales et exerçaient des activités analgésique, anti-inflammatoire, antibactérienne, antifongique et sédatrice (Amiel et al., 2012; Jegajeevanram et al., 2014). En outre, le β -élémane et le spathuléol ont été rapportés comme ayant des activités anticancéreuses sur le glioblastome humain et sur les lignées tumorales MCF7 (Martins et al., 2010; Zhu et al., 2011; Chen et al., 2013).

II.3. Effet de l'HE de *Lippia citriodora* sur les cellules normales (PBMC)

Nous avons évalué l'effet cytotoxique sur les cellules mononucléées du sang périphérique humain (PBMC), afin d'étudier l'action des HE de *Lippia citriodora* sur les cellules non tumorales. La figure 53 illustre qu'au fur et à mesure que nous augmentons la concentration des HE, le pourcentage de viabilité des PBMC est pratiquement constant (à la concentration de 137 $\mu\text{g/ml}$ des HE, le pourcentage de viabilité des PBMC est supérieur à 80%, alors qu'il n'est que de 10% pour une concentration de 40 $\mu\text{g/ml}$ de cisplatine (Figure 54)). Cela montre qu'aucun effet cytotoxique de ces HE n'a été observé sur les PBMC par rapport à celui exercé sur les cellules tumorales, suggérant qu'elles peuvent agir de façons différente et sélective sur les cellules tumorales. Ce résultat est très important, comparé à celui de cisplatine, dans la mesure où l'un des problèmes majeurs de la chimiothérapie anticancéreuse est, effectivement, le manque de sélectivité envers les cellules cancéreuses. Elle attaque aussi les cellules saines de l'organisme humain, ce qui engendre beaucoup d'effets secondaires.

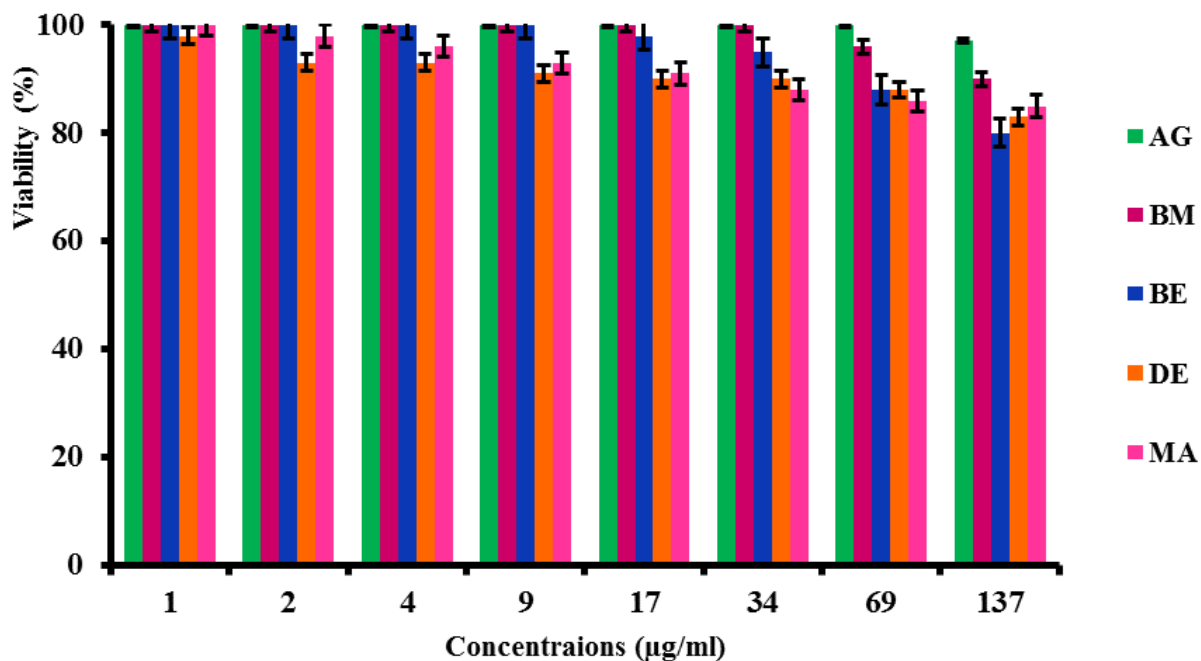


Figure 53 : Histogramme de cytotoxicité de l'HE de *Lippia citriodora* contre les PBMC. AG: Agadir. BM: Beni Mellal. BE: Berkane. DE: Demnat. MA: Marrakech.

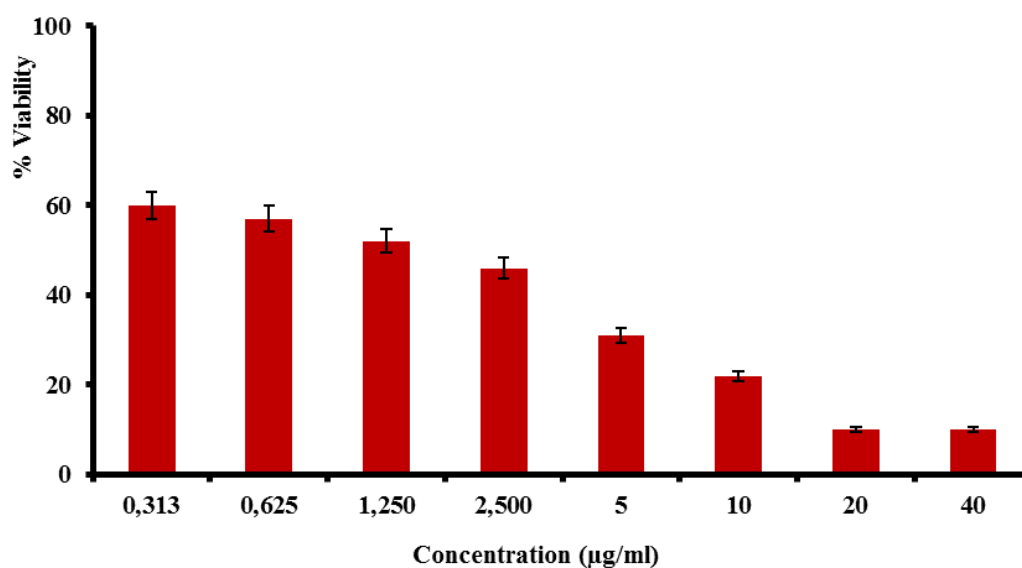


Figure 54 : Histogramme de cytotoxicité de cisplatine contre les PBMC.

II.4. Induction de l'apoptose par l'HE de *Lippia citriodora*

II.4.1. Fragmentation de l'ADN

Après 24h d'incubation, la fragmentation de l'ADN a été observée dans les cellules de la lignée tumorale P815 exposées aux concentrations égales à IC_{50} de chaque huile essentielle. Des fragments d'ADN de tailles multiples de 180-200 paires de bases, caractéristiques de l'apoptose, ont été visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 55).

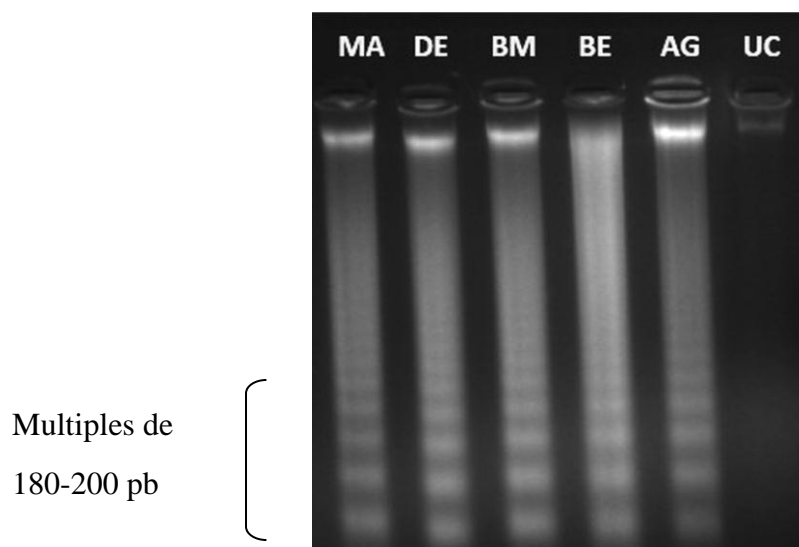


Figure 55 : Electrophorèse sur gel d'agarose montrant la fragmentation apoptotique dans la lignée P815. Détection des fragments de l'ADN (180-200 paires de bases, caractéristiques de l'apoptose) dans les cellules de la lignée tumorale P815 traitées avec les IC₅₀ de l'HE de *Lippia citriodora*. AG: Agadir. BE: Berkane. BM: Beni Mellal. DE: Demnat. MA: Marrakech. UC: cellules non traitées.

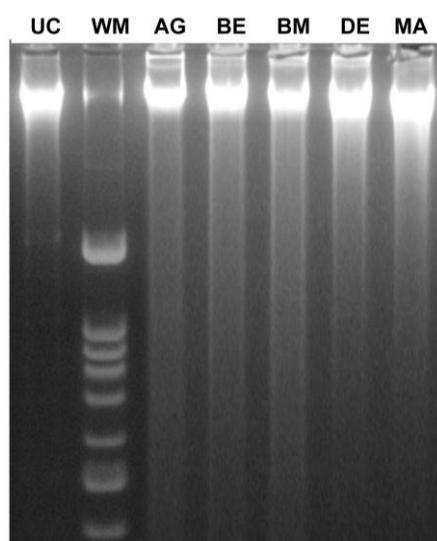


Figure 56 : Electrophorèse sur gel d'agarose montrant l'absence de fragmentation apoptotique de l'ADN dans la lignée MCF7. Les cellules de la lignée tumorale MCF7 ont été traitées avec les IC₅₀ de l'HE de *Lippia citriodora*. AG: Agadir. BE: Berkane. BM: Beni Mellal. DE: Demnat. MA: Marrakech. UC: cellules non traitées. WM: marqueur de poids moléculaire.

La figure 56 montre l'absence de la fragmentation de l'ADN dans les cellules de la lignée MCF7 exposées aux IC₅₀ de l'HE de *Lippia citriodora*. Cela laisse suggérer qu'un autre mécanisme de mort cellulaire pourrait être impliqué.

II.4.2. Annexine-biotine-streptavidine FITC

Pour confirmer l'induction de l'apoptose par la fragmentation de l'ADN, nous avons réalisé le test de l'annexine V biotine streptavidine (FITC) sur les cellules des lignées cellulaires P815 et MCF7. Après incubation de 24h, l'externalisation de la phosphatidylsérine a été évaluée au microscope à fluorescence. L'observation illustre une double coloration, verte avec l'annexine V-FITC et rouge avec l'iodure de propidium dans des cellules P815. L'emploi de l'iodure de propidium permet de différencier les cellules en apoptose précoce et les cellules en état de mort cellulaire tardive ou nécrose. L'apoptose précoce est caractérisée par une membrane plasmique intacte, excluant ainsi toute entrée de l'iodure de propidium, tandis qu'en état de mort cellulaire tardive par apoptose, la membrane est devenue perméable à l'iodure de propidium conduisant ainsi à un marquage positif de l'ADN des cellules à l'iodure de propidium. Ces résultats montrent que l'HE de *Lippia citriodora* induit la mort cellulaire par apoptose dans la lignée P815, par rapport aux cellules non traitées (témoin négatif). Le méthotrexate a été utilisé comme témoin positif (Figure 57). En outre, il a été observé une coloration fluorescente verte de l'annexine V-FITC aux alentours de la membrane et une coloration rouge de l'iodure de propidium dans le noyau des cellules MCF7, avec des changements morphologiques d'apoptose tardive et/ou nécrose, y compris la rupture de la membrane cytoplasmique et le débordement du cytoplasme avec fuite des organites cellulaires (Figure 58).

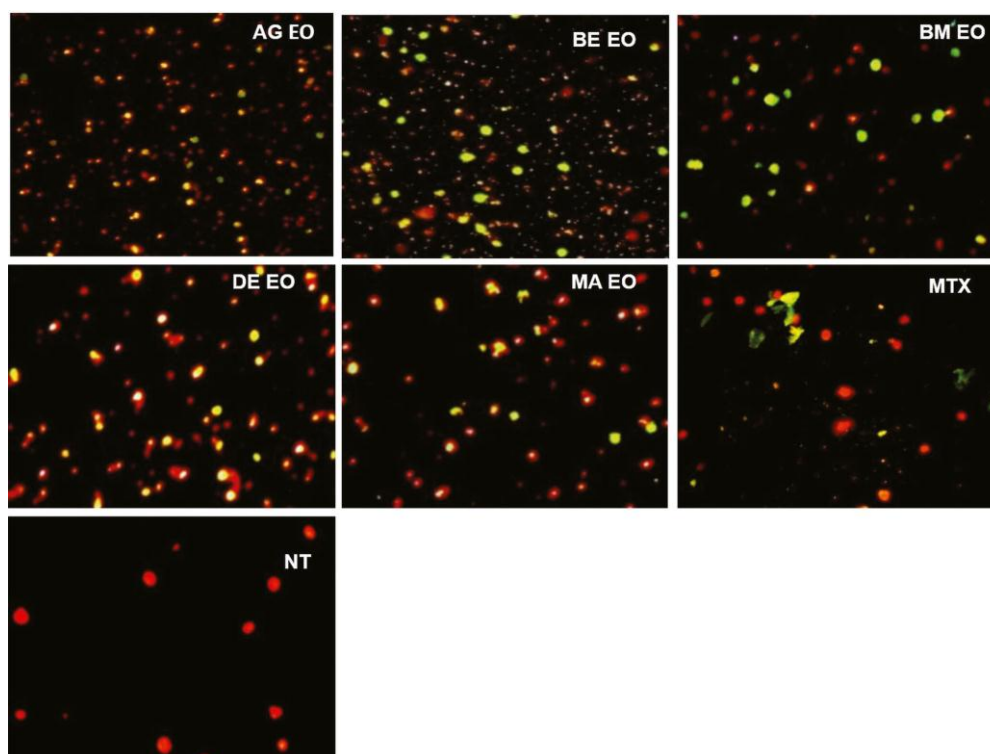


Figure 57 : Double coloration de l'annexine V-FITC et de l'iodure de propidium des cellules P815 après 24h de traitement par les IC₅₀ de l'HE de *Lippia citriodora*.

Les cellules P815 traitées par les HE de *Lippia citriodora* sont mises en présence de l'annexine V biotine et traitées par la streptavidine conjuguée à la FITC comme décrit dans matériel et méthodes. Les cellules ainsi marquées sont visualisées au microscope à fluorescence. AG: Agadir. BE: Berkane. BM: Beni Mellal. DE: Demnat. MA: Marrakech. MTX: Méthotrexate (contrôle positif). NT: Non traité (contrôle négatif).

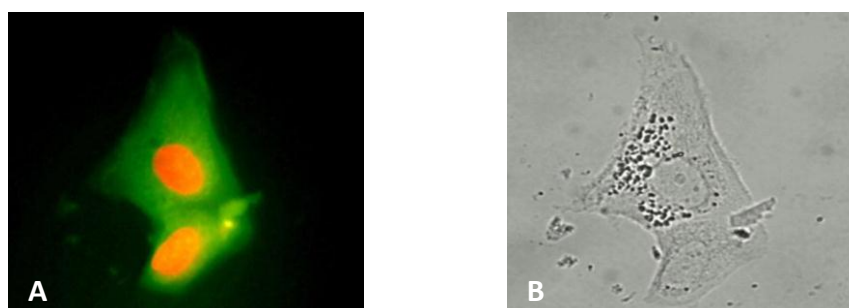


Figure 58 : Double marquage à l'annexine V-FITC et à l'iodure de propidium d'une cellule MCF7 après 24h de traitement par IC₅₀ de l'HE de *Lippia citriodora* de Demnat.

Les cellules MCF7 traitées par l'HE de *Lippia citriodora* de Demnat sont mises en présence de l'annexine V biotine et traitées par la streptavidine conjuguée à la FITC comme décrit dans matériel et méthodes. Les cellules ainsi marquées sont visualisées au microscope à fluorescence.

A: Image fluorescente d'une cellule MCF7 en division (grossissement x 1000)

B: Image en lumière blanche de la même cellule MCF7 en division (grossissement x 1000)

Discussion

La relation entre l'apoptose et le cancer a récemment fait l'objet d'une attention particulière au niveau de la recherche. En effet, l'apoptose fournit de nombreux indices précieux sur l'efficacité d'un traitement. Actuellement, plusieurs médicaments de la chimiothérapie anticancéreuse exercent leurs mécanismes d'action par apoptose et /ou par nécrose (Mahassni and Al-Reemi,

2013; Hassan et al., 2014). L'apoptose, différente de la nécrose par une série de changements morphologiques et biochimiques, joue un rôle essentiel dans divers états pathologiques, dont la genèse du cancer (Collins et al., 1991; Bakkali et al., 2008). Par conséquent, l'induction de l'apoptose est devenue le principal objectif lors du développement de nouvelles molécules anticancéreuses.

Afin de contribuer à la compréhension du mécanisme moléculaire impliqué dans l'activité cytotoxique observée, après exposition des cellules des lignées P815 et MCF7 aux HE de *Lippia citriodora* pendant 24h, le test de fragmentation de l'ADN a été étudié. En effet, dans les cellules P815 traitées, l'ADN clivé par une endonucléase, donne des fragments de tailles multiples de 180-200 paires de bases, caractéristiques de l'apoptose, qui apparaissent sous forme de barreaux d'échelle après électrophorèse sur le gel d'agarose (Figure 57). Cela démontre que ces HE exercent leurs effets cytotoxiques sur les cellules tumorales P815, par l'induction de l'apoptose (Arends et al., 1990). Cependant, ce phénomène n'a pas été observé dans le cas des cellules MCF7 (Figure 58). Ces résultats indiquent que l'HE de *Lippia citriodora* agit différemment selon la cible tumorale. Cela laisse suggérer qu'un autre mécanisme de mort cellulaire pourrait être impliqué.

Plusieurs études indiquent que les huiles essentielles, en général, induisent l'apoptose dans différentes lignées de cellules tumorales (Berliocchi et al., 2011). L'apoptose est activée par deux voies différentes : La voie extrinsèque dite aussi la voie des récepteurs de mort, initiée à la surface de la cellule par des récepteurs membranaires, tandis que la voie intrinsèque (voie mitochondriale) est déclenchée par la libération du cytochrome-c dans le cytosol. Il déclenche alors une cascade de réactions qui aboutissent à l'activation de caspases (principales molécules effectrices), ainsi qu'à la création de l'apoptosome (Vermeulen et al., 2005). Une fois libéré dans le cytosol, le cytochrome-c va se fixer à une protéine adaptatrice équivalente à FADD de la voie extrinsèque : la protéine Apaf-1, et va l'activer. Une fois activée, cette protéine Apaf-1 est capable de se lier à la procaspase-9. Il se forme alors un complexe trimoléculaire encore appelé « apoptosome » constitué par le cytochrome-c/Apaf-1/procaspase-9 qui va permettre, toujours, par un mécanisme de protéolyse, l'activation de la procaspase-9. La caspase-9 active, pourra à son tour activer d'autres caspases et notamment la caspase-3. (Henshall et al., 2001; Shi, 2002).

De Martino et al. ont rapporté que la caspase-3 est une protéase active de mort cellulaire impliquée dans la phase d'exécution de l'apoptose, où les cellules subissent des changements morphologiques tels que la fragmentation de l'ADN, la condensation de la chromatine et la

formation des corps apoptotiques (De Martino et al., 2011). Dans notre étude, nous pensons que la caspase-3 pourrait être impliquée dans l'effet apoptotique de l'HE de *Lippia citriodora*. Il reste à démontrer si d'autres caspases sont impliquées ou non dans les résultats observés ou si d'autres mécanismes non encore démontrés sont mis en jeu. De plus, en raison de la nature lipophile de l'HE, les composés volatils semblent s'accumuler dans la membrane cellulaire et augmenter sa perméabilité, entraînant la fuite d'enzymes et de métabolites qui induisent des effets cytotoxiques et apoptotiques dans les cellules cancéreuses (Bayala et al., 2014).

L'absence de la fragmentation de l'ADN, des changements morphologiques avec une rupture de la membrane cytoplasmique et fuite des organites cellulaires, au niveau des cellules MCF7, sont en faveur d'une apoptose tardive et/ou nécrose (Figure 58). Cette évolution est confirmée par le test à l'annexine-biotine-streptavidine FITC. L'induction de mort cellulaire apoptotique tardive et/ou nécrotique pourrait être attribuée à la différence de teneur en composés minoritaires (limonène et élémène), qui pourraient interagir entre eux ou avec les molécules majoritaires (oxyde de caryophyllène et citral) (Oukerrou et al., 2017). Il a été bien établi que les composants terpéniques volatils des huiles essentielles peuvent fonctionner comme des pro-oxydants en affectant le potentiel redox des cellules. Cela peut entraîner une apoptose tardive et/ou une nécrose, engendrant des dommages des protéines et de l'ADN avec des effets cytotoxiques globaux (Bakkali et al., 2008). Les activités pro-oxydantes peuvent altérer les membranes cellulaires, en particulier celles des mitochondries, et ainsi favoriser la libération de calcium ionique (Ca^{++}), du cytochrome-c et des espèces réactives de l'oxygène et donc conduire à la mort cellulaire (Bakkali et al., 2008; Averbeck et al., 1990).

III. Etude de la synergie entre l'HE de *Lippia citriodora* et le cisplatine

Ce test a été réalisé afin de déterminer un éventuel effet synergique lors de la combinaison de l'HE de *Lippia citriodora* et le cisplatine contre les cellules de la lignée tumorale P815. La méthode de détermination de l'indice de combinaison (CI) a été utilisée. Au tableau 15, la concentration de l'HE a été fixée à une valeur de $IC_{30} = 3,40 \mu\text{g/ml}$ et celle du cisplatine variait 0,78 à 100 μM . Un indice de combinaison CI inférieur à 1 indique le synergisme, un CI supérieur à 1 indique l'antagonisme et un CI égal à 1 indique l'additivité (Chou and Talalay, 1984). Aux concentrations comprises entre 0,78 et 100 μM de cisplatine, l'indice de combinaison CI est supérieur à 1, indiquant un antagonisme. Une étude très approfondie est nécessaire afin de comprendre le mécanisme moléculaire qui a entraîné cet antagonisme d'action.

Tableau 15 : Analyse de l'indice de combinaison du cisplatine (concentrations variables) et de l'HE de *Lippia citriodora* fixée à 3,40 µg/ml (IC₃₀) contre les cellules P815.

Fa = fraction affectée. HE = HE *Lippia citriodora*. C = Cisplatine. CI = combination index.

Cisplatine (µM)	HE (µg/ml)	FA (HE + C)	CI	Description*
100	3,40	0,904	1,87	Antagonisme
50	3,40	0,916	1,94	Antagonisme
25	3,40	0,920	2,01	Antagonisme
12,50	3,40	0,949	2,12	Antagonisme
6,25	3,40	0,954	2,25	Antagonisme
3,12	3,40	0,957	3,12	Antagonisme
1,56	3,40	0,960	4,25	Antagonisme
0,78	3,40	0,960	7,05	Antagonisme

*CI = 1, effet additif. CI < 1, effet synergique. CI > 1, effet antagoniste.

IV. Activité cytotoxique de certains composés purs naturellement présents dans l'HE de *Lippia citriodora* (citrал, élémène, limonène et oxyde de caryophyllène)

Afin d'évaluer le rôle joué par les composés majoritaires et minoritaires de l'HE de *Lippia citriodora*, nous avons étudié la cytotoxicité induite par certaines molécules pures telles que l'oxyde de caryophyllène, le citral, l'élémène et le limonène (Figure 59).

Les cellules tumorales P815 ont été stimulées par des concentrations spécifiques des composés testés (100 - 50 - 25 - 12,50 - 6,25 - 3,12 - 1,56 - 0,78 µM) ; pendant 48h à 37 ° C et 5% de CO₂. Le pourcentage de lyse cellulaire a été déterminé en utilisant le test MTT tel que décrit dans la section de matériel et méthodes. La mesure de l'activité cytotoxique a été réalisée en évaluant la concentration IC₅₀ de chacune de ces molécules (concentration capable d'inhiber 50% de la croissance cellulaire par rapport à un témoin négatif DMSO 0,5%). Ce test simple permet de réaliser une sélection rapide des composés présentant une activité susceptible de limiter ou de stopper la croissance des cellules cancéreuses. Les valeurs des IC₅₀ ont été déterminées graphiquement à l'aide de l'édition Microsoft Excel 2013. Les données sont la moyenne ± SEM de deux expériences différentes.

Les résultats ont montré une forte activité cytotoxique de tous les composés testés, contre les cellules de la lignée tumorale P815, d'une manière différentielle et dose-dépendante. De plus, l'oxyde de caryophyllène est plus cytotoxique que le citral, l'élémène et le limonène, avec IC₅₀ = 6,47 ; 10,95 ; 15,90 et 22,43 µM, respectivement. Le méthotrexate a été utilisé comme témoin

positif ($IC_{50} = 5,5 \mu M$, Tableau 16). Ces molécules pures ont montré un intérêt pharmacologique très intéressant et méritent une étude très approfondie puisqu'elles exercent leurs effets cytotoxiques à de très faibles concentrations avec des IC_{50} aux alentours de $10 \mu M$ (Geran et al., 1972).

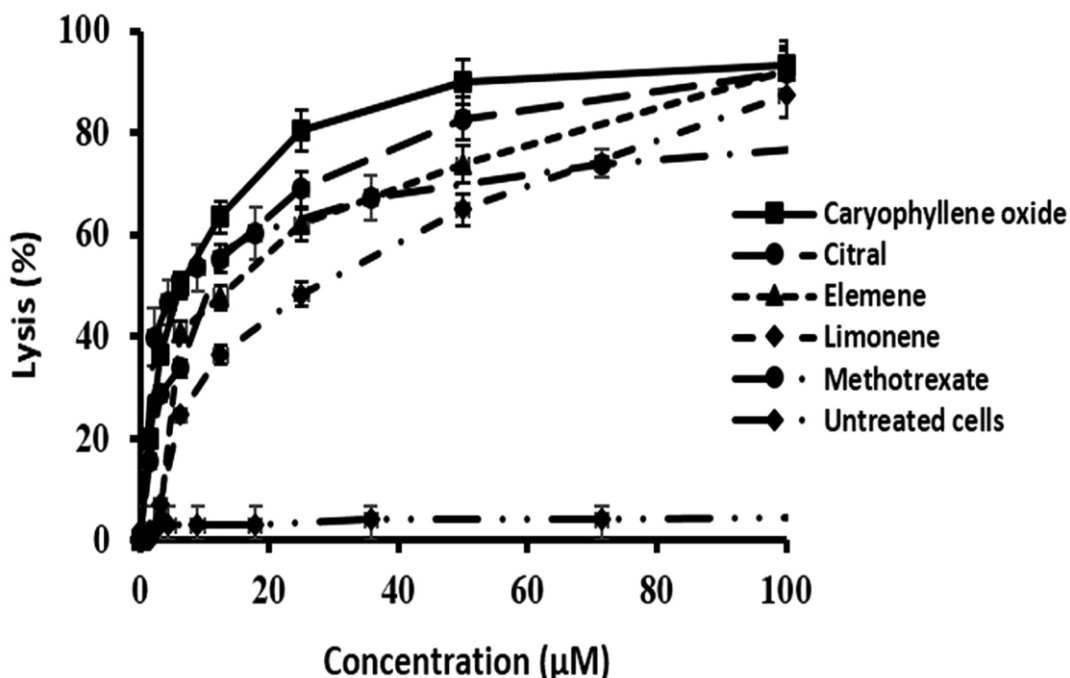


Figure 59 : Activité cytotoxique de certains composés purs de l'HE de *Lippia citriodora* contre P815.

Tableau 16 : Valeurs des IC_{50} de certains composés purs de l'HE de *Lippia citriodora* contre P815.

Composé	Oxyde de caryophyllène	Citral	Elémène	Limonène	Méthotrexate
IC_{50} (μM)	$6,47 \pm 2,92$	$10,95 \pm 2,56$	$15,90 \pm 0,64$	$22,43 \pm 1,11$	$5,50 \pm 3,30$

Les données sont la moyenne \pm SEM de deux expériences différentes.

Nos résultats sont concordants avec ceux de Dudai et al. (Dudai et al., 2005), qui rapportent une importante activité cytotoxique du citral sur les cellules tumorales. En outre, d'autres études ont mentionné que les citrals induisaient une apoptose dans la leucémie lymphoïde chronique par l'activation de la caspase-3 (De Martino et al., 2009). Dans le même ordre d'idée, l'oxyde de caryophyllène a été signalé pour être responsable d'une activité cytotoxique contre les cellules RL95-2 du cancer de l'endomètre (Chang et al., 2014). En plus, d'autres auteurs ont montré que le β -élémente inhibait la prolifération des cellules du glioblastome humain par l'activation du facteur de maturation β , inhibait également les cellules de la lignée tumorale MCF7 ($IC_{50}=14,70 \mu g/ml$) et induisait une sensibilisation au cisplatine (Zhu et al., 2011; Chen et al., 2013). Ces résultats corroborent également ceux rapportant que le limonène est un inhibiteur de la

progression tumorale en agissant sur la protéine P21ras (Dudai et al., 2005). D'autre part, il a été montré que les sesquiterpènes ont une activité cytotoxique et sont capables d'arrêter la prolifération des cellules cancéreuses de la prostate dans la phase G₀/G₁ (Chen et al., 2013). De plus, il a été rapporté que le cis-verbénol présentait une activité potentielle d'élimination des radicaux peroxy (Choi et al., 2010). D'autres études ont montré que l'eugénol induit l'apoptose dans les cellules AGS du cancer gastrique (Sarkar et al., 2015). Il induit, également, la mort cellulaire de glioblastome humain par implication de la voie apoptotique mitochondriale (Liang et al., 2015). En outre, l'eugénol favorise l'abrogation de G₂ / M de la phase du cycle cellulaire en augmentant la production des espèces réactives de l'oxygène. De plus, il induit une diminution du potentiel mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) (de Sá Júnior et al., 2016). En outre, le nérol (cis-géranol) soulage des lésions pulmonaires aiguës induites par un lipopolysaccharide chez la souris en inhibant l'inflammation et l'apoptose (Jiang et al., 2017).

Dans l'ensemble, nos résultats montrent que, même à de très faibles concentrations, les composés minoritaires contenus dans les HE de *Lippia citriodora* étaient capables de présenter des activités cytotoxiques significatives et différentielles contre les cellules de la lignée tumorale P815. Cependant, l'effet cytotoxique puissant de l'HE testée pourrait être attribué à l'interaction de l'ensemble de ses constituants majoritaires et minoritaires. Dans notre étude, les composants majoritaires (l'oxyde de caryophyllène et le citral) et les composants minoritaires (l'élémane et le limonène) ont montré des activités cytotoxiques très importantes contre la lignée tumorale P815.

V. Etude de la synergie entre l'oxyde de caryophyllène et le cisplatine

Ce test a été réalisé afin de déterminer un éventuel effet synergique lors de la combinaison de l'oxyde de caryophyllène (substance pure de l'HE de *Lippia citriodora*) et le cisplatine contre les cellules de la lignée tumorale P815. La méthode de détermination de l'indice de combinaison (CI) a été utilisée. Au tableau 17, la concentration de l'oxyde de caryophyllène a été fixée à une valeur de IC₃₀ = 3 μ M et celle du cisplatine variait 0,78 à 100 μ M. Un indice de combinaison CI inférieur à 1 indique le synergisme, un CI supérieur à 1 indique l'antagonisme et un CI égal à 1 indique l'additivité (Chou and Talalay, 1984). Aux concentrations comprises entre 0,78 et 100 μ M de cisplatine, l'indice de combinaison CI est supérieur à 1 indiquant un antagonisme. La substance pure (oxyde de caryophyllène) a suivi la même action (antagonisme) que l'HE de *Lippia citriodora* qui contient 72 molécules différentes. Cette combinaison fournit des données très intéressantes à approfondir pour étudier le mécanisme et le mode d'action entraînant cet antagonisme.

Tableau 17 : Analyse de l'indice de combinaison du cisplatine (concentrations variables), et de l'HE de *Lippia citriodora* fixée à 3 μM (IC_{50}) contre les cellules P815.

Fa = fraction affectée. OC = Oxyde de caryophyllène. C = Cisplatine. CI = combination index.

Cisplatine (μM)	OC (μM)	FA (OC + C)	CI	Description*
100	3	0,912	1,94	Antagonisme
50	3	0,913	1,98	Antagonisme
25	3	0,915	2,06	Antagonisme
12,50	3	0,940	2,30	Antagonisme
6,25	3	0,953	2,72	Antagonisme
3,12	3	0,954	3,21	Antagonisme
1,56	3	0,956	4,01	Antagonisme
0,78	3	0,958	7,10	Antagonisme

*CI = 1, effet additif. CI < 1, effet synergique. CI > 1, effet antagoniste.

VI. Expression des gènes (Bax, Bcl-2, p53 et c-jun) par l'action de l'HE de *Lippia citriodora*

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est un outil essentiel qui permet de quantifier le nombre de molécules ou de copies d'un gène dans un échantillon donné. La méthode repose sur le suivi cycle par cycle de la réaction d'amplification enzymatique au moyen d'une molécule fluorescente capable d'émettre dans des conditions bien définies un rayonnement fluorescent dont l'intensité sera directement mesurée à un moment donné au cours de chaque cycle PCR. Parmi les agents intercalants les plus utilisés, figure le SYBR Green. C'est un fluorophore capable de se lier à l'ADN double brin et devenir fluorescent. Pendant la réaction de polymérisation et à chaque cycle d'amplification, le SYBR Green se lie à l'ADN nouvellement synthétisé. La fluorescence est mesurée à la fin de l'étape d'élongation et augmente donc à chaque cycle d'amplification. La fluorescence émise et lue à la fin de la phase d'amplification, est proportionnelle à la quantité d'ADN double brin (Ivanga, 2006; Gaascht, 2013). (Figure 60).

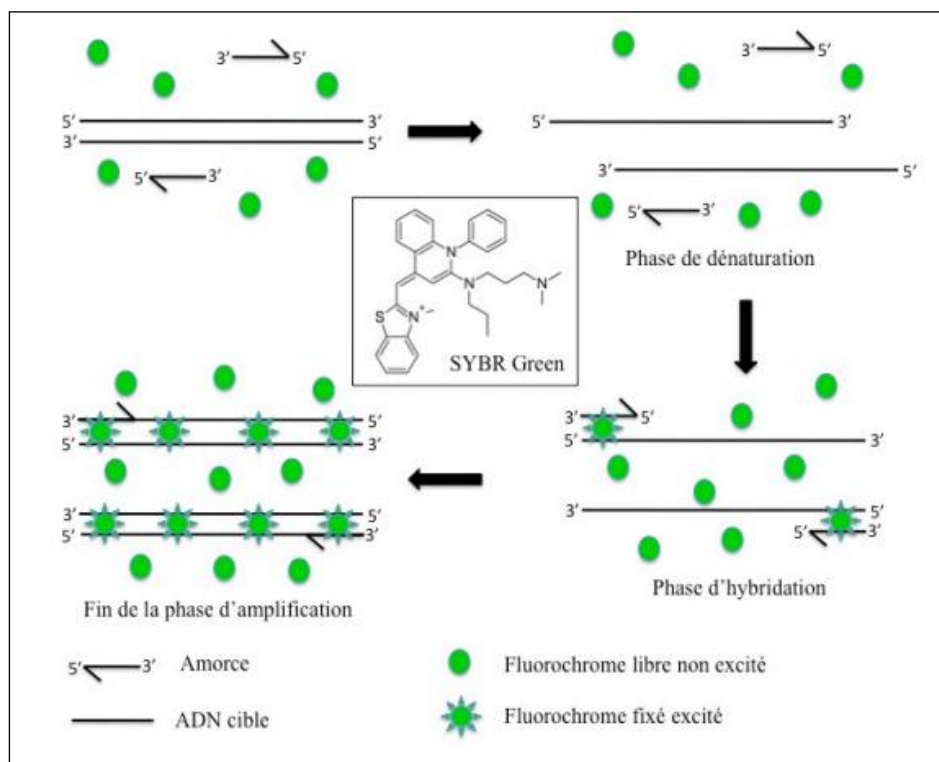


Figure 60 : Principe du fonctionnement du SYBR® Green. Durant la phase de dénaturation, le SYBR Green libre exhibe peu de fluorescence. Durant la phase d'hybridation, à la température d'appariement, quelques molécules se lient au double brin d'ADN naissant résultant en une émission de fluorescence lors de l'excitation. Durant la phase d'amplification, de plus en plus de molécules se lient au brin naissant et l'accroissement de la fluorescence peut-être suivi en temps réel. (Gaescht, 2013).

Il est possible d'évaluer l'intensité de la mort cellulaire par l'étude de l'expression de gènes connus pour être des signaux pro ou anti-apoptotiques. En effet, le niveau de l'expression des gènes permet d'étudier le mécanisme moléculaire et expliquer le mode d'action cytotoxique. Pour ce faire, une extraction de l'ARN total a été réalisée, sur les cellules MCF7 traitées ou non par les HE de *Lippia citriodora* (IC_{30} $\mu\text{g/ml}$) pendant 6h et 12h comme décrit dans matériel et méthodes. Le GAPDH a été utilisé comme contrôle endogène. Enfin, l'analyse des données de l'expression des gènes par la quantification relative (RQ) de Bax, Bcl-2, p53 et c-jun a été calculée en utilisant la PCR quantitative en temps réel et la méthode de calcul des $\Delta\Delta C_t$ (cycle threshold). $C_t : 2^{-\Delta\Delta C_t}$ avec : $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ (gène cible) - ΔC_t (calibrant), et : $\Delta C_t = C_t$ (gène cible) - C_t (contrôle endogène), basée sur la méthode de Livak et Schmittgen (Livak and Schmittgen, 2001). Les figures 62, 63, 64, 65 et le tableau 18 résument les résultats des niveaux de l'expression des gènes Bax, Bcl-2, p53 et c-jun.

L'analyse a été effectuée selon la méthode de l'Institut iric.ca (www.genomique.iric.ca).

Contrôle endogène : le contrôle endogène est le gène qui ne varie pas entre les échantillons testés (GAPDH).

Calibrateur : le calibrateur est l'échantillon auquel tous les autres sont comparés. C'est l'échantillon « non traité ». Le RQ du calibrateur donne 1 car il ne varie pas par rapport à lui-même.

Ct = Cycle Threshold (cycle seuil) : la Valeur à laquelle la courbe PCR croise le seuil. Un qPCR comporte environ 40 cycles. Plus le Ct est élevé (30-35), moins l'ARNm détecté est présent, car il faut plus de cycles PCR pour pouvoir détecter l'amplification fluorescente. Si le Ct a une petite valeur (10-15), le gène est fortement exprimé. Les contrôles endogènes ont souvent un Ct plus petit que les autres gènes.

Toute réaction de PCR se déroule en trois phases (Figure 61) :

- Phase d'amplification d'ADN de type exponentielle, mais au cours de laquelle la duplication n'est en général pas efficace à 100% ;
- Phase transitoire au cours de laquelle l'efficacité de l'amplification diminue fortement et rapidement du fait de l'épuisement du milieu réactionnel ;
- Phase stationnaire au cours de laquelle il n'y a plus d'amplification.

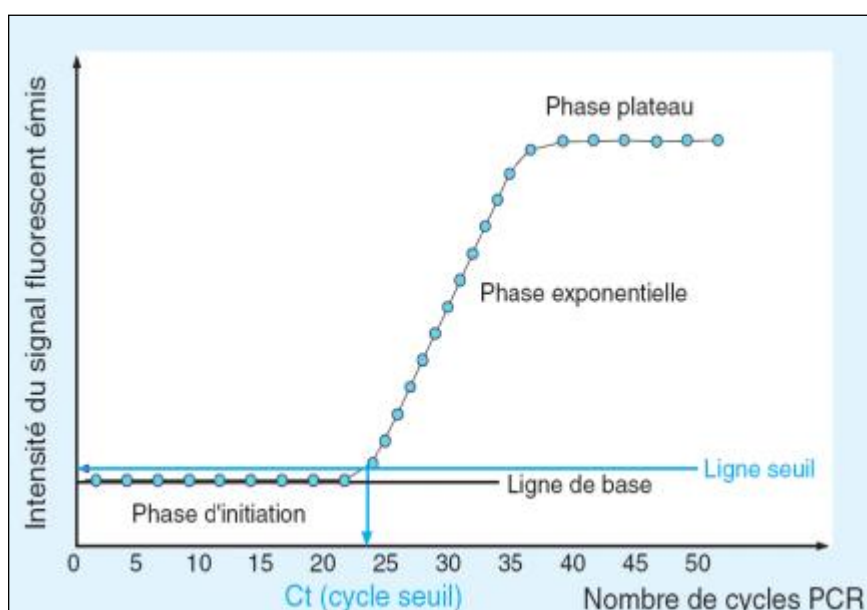


Figure 61 : Profil d'une courbe de PCR en temps réel (Gaascht, 2013).

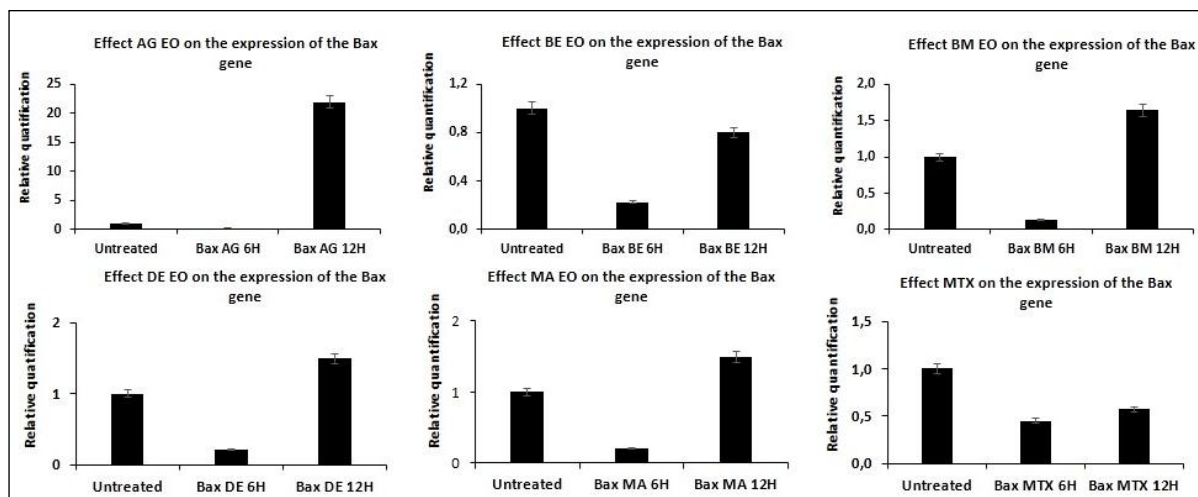


Figure 62 : Effet de l'HE de *Lippia citriodora* sur l'expression du gène Bax à 6h et à 12h après traitement des cellules de la lignée MCF7 par des IC₃₀ (µg/ml).

AG: Agadir. BE: Berkane. BM: Beni Mellal. DE: Demnat. MA: Marrakech. MTX: Méthotrexate.

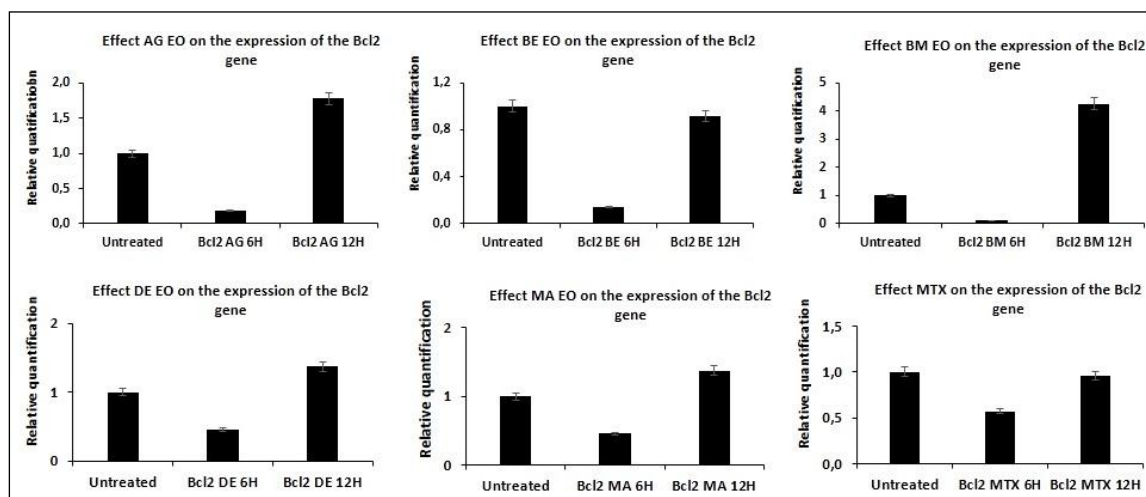


Figure 63 : Effet de l'HE de *Lippia citriodora* sur l'expression du gène Bcl-2 à 6h et à 12h après traitement des cellules de la lignée MCF7 par des IC₃₀ (µg/ml) des HE et du Methotrexate comme témoin positif.

AG: Agadir. BE: Berkane. BM: Beni Mellal. DE: Demnat. MA: Marrakech. MTX: Méthotrexate.

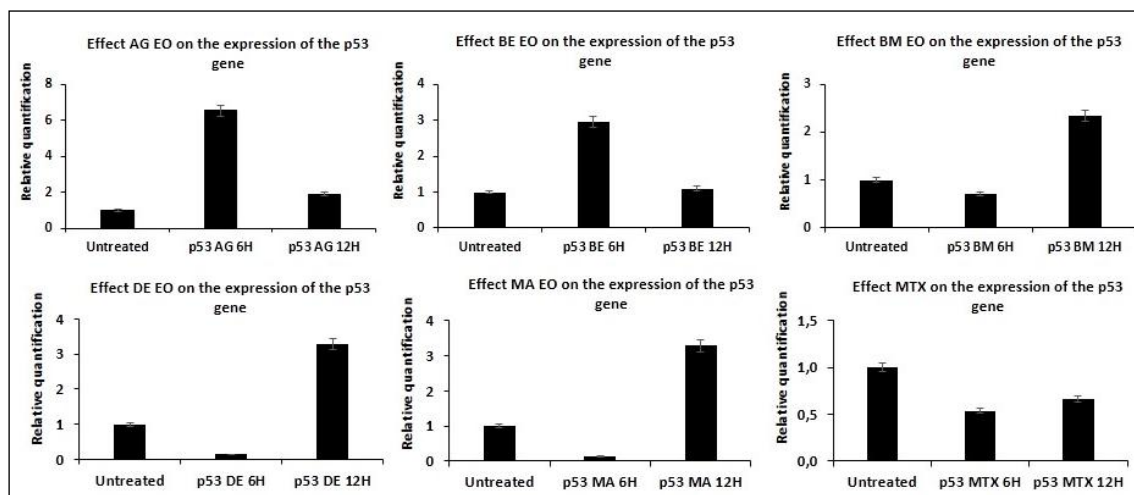


Figure 64 : Effet de l'HE de *Lippia citriodora* sur l'expression du gène p53 à 6h et à 12h après traitement des cellules de la lignée MCF7 par des IC₃₀ (µg/ml) des HE et du Methotrexate comme témoin positif. AG: Agadir. BE: Berkane. BM: Beni Mellal. DE: Demnat. MA: Marrakech. MTX: Méthotrexate.

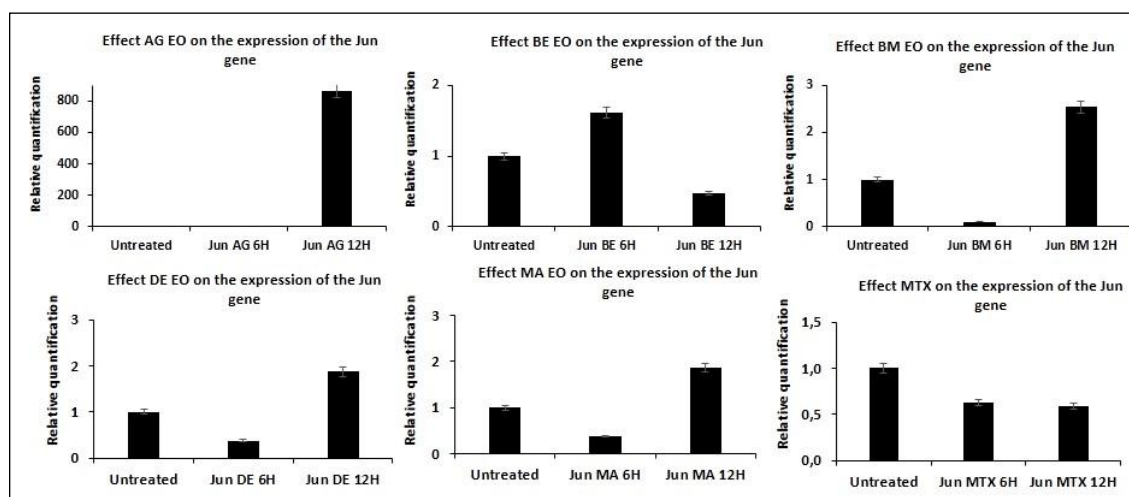


Figure 65 : Effet de l'HE de *Lippia citriodora* sur l'expression du gène c-jun à 6h et 12h après traitement des cellules de la lignée MCF7 par des IC₃₀ (µg/ml) des HE et du Methotrexate comme témoin positif. AG: Agadir. BE: Berkane. BM: Beni Mellal. DE: Demnat. MA: Marrakech. MTX: Méthotrexate.

Tableau 18 : Niveau de l'expression des gènes Bax, Bcl-2, p53 et c-jun à 6h et à 12h, après traitement des cellules MCF7 par l'HE de *Lippia citriodora* (IC₃₀ µg/ml)

	Niveau de l'expression des gènes							
	6h				12h			
	Bax	Bcl-2	p53	c-jun	Bax	Bcl-2	P53	c-jun
AG	↘	↘	↗	↘	↗↗	⊥	⊥	↗↗
BE	↘	↘	↗	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥
BM	↘	↘	⊥	↘	⊥	↗	↗	⊥
DE	↘	↘	↘	↘	⊥	⊥	↗	⊥
MA	↘	↘	↘	↘	⊥	⊥	↗	⊥
MTX	↘	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥

- Diminution de l'expression du gène : ↘
- Augmentation de l'expression du gène : ↗
- Pas d'expression du gène : ⊥
- AG: Agadir. BE: Berkane. BM: Beni Mellal. DE: Demnat. MA: Marrakech. MTX: Méthotrexate.

Afin de quantifier plus précisément le mécanisme de l'apoptose, nous avons mesuré l'expression de certains gènes impliqués dans ce phénomène. Le processus de l'apoptose est régulé par l'expression différentielle de divers gènes pro-apoptotiques et de leurs protéines. Dans cette optique, la présente étude a été entreprise pour évaluer l'effet de l'HE de *Lippia citriodora* sur l'expression des gènes Bax, Bcl-2, p53 et c-jun. En général, les niveaux de l'expression de ces gènes, tendent à varier avec le temps d'exposition et selon l'origine géographique de chaque HE pour une même concentration (IC₃₀ µg/ml). Par comparaison aux cellules non traitées, nous avons trouvé les résultats suivants :

A 6h d'exposition, il y a diminution ou non expression de tous les gènes en face de toutes les HE de *Lippia citriodora*, sauf les deux cas de l'interaction des HE AG et HE BE avec p53 (gène suppresseur de tumeur) qui ont produit une augmentation de de son expression (le niveau de p53 augmente à la suite de dommages sur l'ADN). A 12h d'exposition, on assiste à une forte expression de Bax (effet pro-apoptotique) et c-jun sous l'effet de l'HE AG, une augmentation de l'expression de Bcl-2 (effet anti-apoptotique) et p53 sous l'effet de l'HE BM et une augmentation de p53 sous l'effet des HE DE et HE MA. Pour le reste des interactions, il y a une absence de l'expression des gènes. Le méthotrexate a baissé le niveau d'expression du Bax à 6h, et sans conséquences sur les autres gènes à 6h et à 12h (Tableau 18). D'après ce tableau, on peut constater que lors des premières heures (6h) le contact des différentes HE de *Lippia citriodora*

avec les cellules, il y a induction de processus résultant dans la diminution ou l'annulation de l'expression des quatre gènes. Le gène p53 fait exception dans les cellules traitées avec les HE AG et BE. Lors de l'exposition prolongée (12h) on assiste à une forte augmentation de l'expression de Bax et de c-jun sous l'effet de l'HE AG. L'expression de Bcl-2 est aussi améliorée sous l'effet de l'HE BM. De même p53 est davantage exprimé sous l'action des HE BM, HE DE et HE MA. c-jun et Bax s'exprimaient mieux suite à une longue exposition à l'HE AG. Cette même HE AG ainsi que les HE des autres régions empêcheraient l'expression des quatre gènes à 12h d'exposition sauf pour p53 qui est assez exprimé en exposition prolongée aux HE BM, DE et MA et Bcl-2 exposé à BM.

En résumé, à 6h, toutes les HE ont réprimé l'expression des gènes Bax et Bcl-2, montrant un effet cytolytique très fort. L'expression du gène p53, a augmenté pour AG et BE ; ce qui laisse supposer le ciblage de l'ADN par les molécules de ces HE. A 12h, les expressions de Bax de c-jun ont augmenté pour AG et sans expression pour les autres HE. Bcl-2 et p53 ont augmenté pour BM et sans expression pour les autres HE. Le rapport Bcl-2/Bax est inférieur à 1 (AG, BE et BM), supérieur à 1 (DE et MA). A 12h, ce rapport est inférieur à 1 (AG, DE et MA), supérieur à 1 (BE, BM). Le rapport Bcl-2/Bax est déterminant de l'induction ainsi que de l'inhibition de l'apoptose. Lorsque ce rapport est supérieur à 1, le signal anti-apoptotique est dominant parmi les cellules, lorsque le rapport est inférieur à 1, le mécanisme apoptotique doit prévaloir (Sakuragi et al., 2002). Cette variation constatée de l'expression des gènes, en fonction de l'origine géographique, peut être expliquée par la composition chimique en principes actifs majoritaires et minoritaires de chaque HE. Bcl-2 est un gène anti-apoptotique qui protège la mort cellulaire en inhibant la voie de l'apoptose (Pearson et al., 2000). En général, l'expression du niveau de ce gène diminue par l'action des HE sur les cellules cancéreuses (Cha et al., 2009). En revanche, le gène Bax est un régulateur pro-apoptotique de l'apoptose (Sedlak et al., 1995), alors que le gène p53 régule la voie de l'apoptose en interagissant avec les gènes de la famille Bcl-2 (Marin et al., 1994). Le gène p53 est connu pour être le gardien du génome. Il est activé à l'état physiologique lors d'altérations génétiques (Laverdet, 2013). Il améliore l'apoptose des cellules cancéreuses et empêche la réplication cellulaire en arrêtant le cycle cellulaire en phase G₁ ou en interphase (Fridman and Lowe, 2003). En induisant la libération du cytochrome-c mitochondrial, p53 pourrait être capable d'activer les caspases effectrices, y compris la caspase-3. Il a été rapporté que p53 augmente le niveau de l'expression du gène Bax par l'activation transcriptionnelle directe du promoteur du gène Bax et diminue, de façon concomitante, le niveau de l'expression du gène Bcl-2 (Pearson et al., 2000).

Globalement et dans l'ensemble, ces résultats suggèrent une apoptose tardive et/ou un effet de nécrose (confirmés par le test à l'annexine V biotine streptavidine FITC déjà réalisé). Cette découverte est en accord avec de nombreuses études qui ont démontré le rôle de p53, Bcl-2 et Bax dans l'induction de l'apoptose tardive et/ou de l'effet de la nécrose. Il est connu que les protéines de la famille Bcl-2 jouent un rôle central dans la régulation de la mort cellulaire et sont capables de réguler divers mécanismes de mort cellulaire qui englobent l'apoptose, la nécrose et l'autophagie (Cory et al., 2003; Levine and Kroemer, 2008; Yip and Reed, 2008). La modification de l'expression de ces gènes pourrait s'expliquer par le déclenchement d'une machinerie d'espèces réactives de l'oxygène menant à la nécrose et/ou à l'apoptose tardive. De plus, la diminution du niveau de l'expression du Bax (cas de toutes les HE testées à 6h) ne permet pas la libération du cytochrome-c externe de la membrane mitochondriale, ainsi la voie intrinsèque de l'apoptose n'est pas activée (Li et al., 1998). Il a été établi que Bax est le principal élément dans l'alkylation de la nécrose et celle-ci est induite par la libération de *tAIF* à partir des mitochondries (Moubarak et al., 2007; Zong et al., 2004; Zong and Thompson, 2006). De plus, une diminution de p53 et Bcl-2 inchangée conduit à une apoptose tardive et/ou à une voie de nécrose. On ignore encore le rôle de Bcl-2 dans la régulation de la mort cellulaire par nécrose, par rapport au rôle bien connu de ce gène dans la mort cellulaire programmée par apoptose (Moubarak et al., 2007). En effet, Il a été démontré que les HE, en général, modifient les niveaux de l'expression des gènes Bax et Bcl-2, entraînant le stress mitochondrial, l'activation des caspases et la libération du cytochrome-c dans le cytosol des cellules cancéreuses (Cha et al., 2010). c-jun est un proto-oncogène, capable de réguler la prolifération, la progression du cycle cellulaire, la différenciation et l'apoptose de différents types cellulaires (Gaudio et al 2006). La régulation à la baisse de c-jun (à 6h et à 12h sauf augmenté pour AG à 12h) a induit la mort des cellules MCF7. Il a été démontré que la diminution du niveau de l'expression de c-jun conduit à la mort des cellules tumorales (Elahy and Dass, 2011; Zhang et al., 2004). La régulation à la baisse de c-jun pourrait être due à la réponse au stress osmotique (Xia et al., 2007).

L'activité cytotoxique rapportée des huiles essentielles ou de leurs constituants comprend l'induction de la mort cellulaire par apoptose et/ou nécrose, en activant les protéines pro-apoptotiques directement ou via les voies de signalisation, en arrêtant le cycle cellulaire directement ou via l'inhibition de l'activité des protéines-kinases, et elles peuvent modifier le potentiel membranaire des cellules cancéreuses (Bouyahya et al., 2016). Certains de ces effets sont attribuables à la nature lipophile et aux faibles poids moléculaires des constituants des huiles essentielles, surtout à citrals, qui leur permettent de traverser les membranes cellulaires, en

modifiant les couches de phospholipides, en augmentant la fluidité de la membrane qui devient anormalement perméable, ce qui entraîne une fuite de radicaux, le cytochrome-c, les ions de calcium et les protéines, comme dans le cas du stress oxydatif (Bakkali et al., 2008). La réduction de la production d'ATP, l'altération du gradient de pH et la perte de potentiel mitochondrial ne sont que les conséquences des membranes cellulaires perturbées. La perméabilisation des membranes mitochondriales de l'extérieur jusqu'à l'intérieur conduit à la mort cellulaire par l'apoptose et la nécrose (Armstrong, 2006). En outre, les huiles essentielles peuvent également agir comme pro ou antioxydantes, affectant l'état redox cellulaire (Wei and Shibamoto, 2010; Azmi et al., 2006; Tuttolomondo et al., 2013).

L'apoptose des cellules cancéreuses se produit par l'activation de certaines protéines de la famille des caspases. Au contact de l'HE de *Lippia citriodora* avec les cellules MCF7, les principes actifs majoritaires et/ou minoritaires interagissent par des mécanismes très complexes et déterminent l'activité globale observée. En présence de limonène, les caspases 3 et 9 sont activées dans les cellules leucémiques cultivées et dans les cellules de cancers en particulier de la prostate (Kim et al., 2012) ou dans le cancer du rein (caspases 3, 8 et 9) (Ahmad et al., 2011). De Martino et al. ont rapporté que l'activité pro-apoptotique de l'huile essentielle de verveine officinale (*Verbena officinalis*) et de son composé citral serait due à une activation directe de la procaspase-3 (De Martino et al., 2009). Le β -caryophyllène peut aussi activer les caspases (caspase 3) (Park et al., 2011), le β -élémane (caspases 3, 7, 9 et 10) dans différentes lignées cellulaires de cancers de la prostate, de gliome, du sein, du côlon et du poumon (Manikandan et al., 2010). Du point de vue biochimique, ceci passe par la phosphorylation et l'activation de protéines (p53, Bax, et p21/waf) impliquées dans la cascade d'événements qui conduit finalement à l'activation de ces caspases, qui vont donner le signal aux cellules cancéreuses de se détruire, enrayant ainsi la prolifération cellulaire propre au cancer. Ceci passe également par une baisse de l'expression des gènes Bcl-2 et des protéines associées (anti-apoptotiques donc protectrices de l'activité cellulaire) dans les cellules cancéreuses (Giraud, 2016b). Le β -élémane agit aussi sur la voie p53, Bcl-2 (Li et al., 2005). L'eugénol induit une apoptose dans les cellules cancéreuses par une augmentation du niveau de l'expression du gène Bax (de Sá Júnior et al., 2016). Il pouvait aussi, induire la caspase-8 et la caspase-3 même en l'absence de p53 (Sarkar et al., 2015). Une autre étude a montré que l'eugénol déclenche l'apoptose dans les cellules cancéreuses du sein en ciblant la voie E2F1 / survivine (Al-Sharif et al., 2013). La carvone induit l'apoptose médiée par le p53 et la caspase 3 et inhibe la migration des lignées cellulaires du cancer du sein (Patel et al., 2014). Une autre molécule intéressante de l'HE de *Lippia citriodora*,

en l'occurrence, le nérol (cis-géraniol) favorise l'expression de Bcl-2 et inhibe l'expression de Bax et de Caspase-3 (Jiang et al., 2017).

Plusieurs constituants terpéniques des huiles essentielles, tels que le β -caryophyllène, peuvent induire spécifiquement la production des espèces réactives d'oxygène dans les mitochondries des cellules cancéreuses sans augmenter le niveau du stress oxydatif dans les cellules normales (Park et al., 2011).

VII. Etude de l'activité antitumorale de l'HE de *Lippia citriodora* in vivo

Afin de confirmer les résultats obtenus *in vitro* et de montrer l'importance clinique de cette HE, des expériences *in vivo* ont été réalisées en utilisant le modèle animal (DBA2/H2d) histocompatible avec la lignée cellulaire tumorale P815 (H2d) (Ait M'Barek et al., 2007). Puisque l'HE de la région de Berkane est la plus cytotoxique *in vitro* contre les cellules P815, elle a été utilisée pour valider les résultats observés.

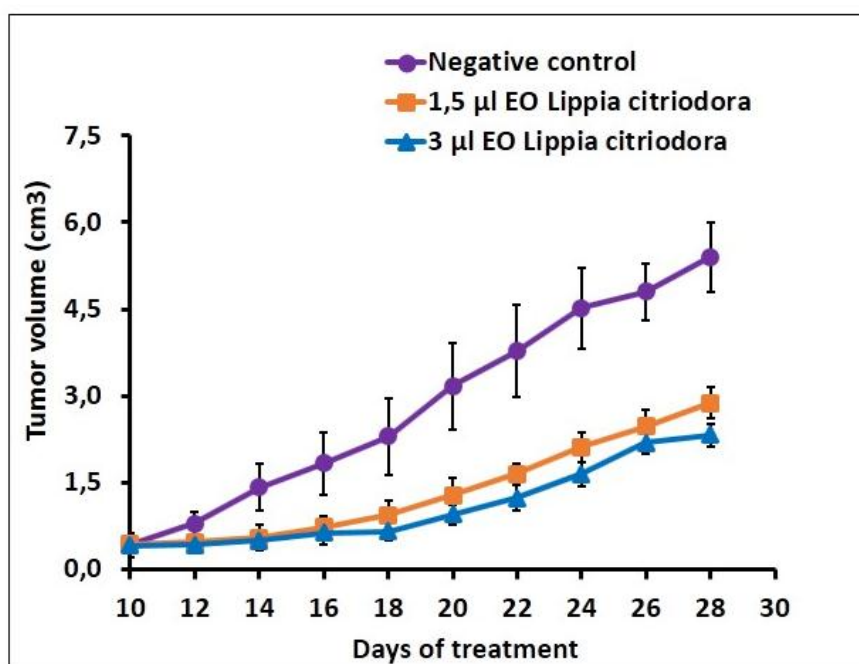


Figure 66 : Evolution du volume tumoral chez les souris DBA₂ (H²d) porteuses de tumeurs P815 et traitées par l'HE de *Lippia citriodora* de Berkane.

Les souris ont été greffées en sous-cutané par la lignée cellulaire de la tumeur P815. Le groupe A et le groupe B sont traités par l'HE de *Lippia citriodora* de Berkane, aux doses respectives de 50 mg/kg et 100 mg/kg de poids corporel tous les 2 jours pendant 30 jours comme décrit dans matériel et méthodes. Le groupe C est le groupe témoin non traité. Statistiquement, il n'y a pas de différence significative entre le groupe A et le groupe B ; par contre la différence est significative par rapport au groupe C témoin ANOVA P < 5%. Les lots contiennent six souris chacun en triple répétition.

Les résultats de la figure 66 montrent qu'au 10^{ème} jour (premier jour du traitement), le volume tumoral était pratiquement identique pour tous les groupes testés. Il a atteint ($0,431 \pm 0,105 \text{ cm}^3$), ($0,412 \pm 0,199 \text{ cm}^3$) et ($0,421 \pm 0,100 \text{ cm}^3$) chez les souris des groupes A, B et C respectivement. A partir du 12^{ème} jour, le volume tumoral augmente de façon rapide chez les souris du groupe C témoin. Au 20^{ème} jour, Il a atteint ($3,174 \pm 0,750 \text{ cm}^3$) pour le groupe C, contre ($1,277 \pm 0,301 \text{ cm}^3$) pour le groupe A et ($0,947 \pm 0,169 \text{ cm}^3$) pour le groupe B. L'administration par voie orale l'HE de *Lippia citriodora* chez les souris (50 mg/kg et de 100 mg/kg tous les deux jours respectivement) a réduit de manière significative le développement de la tumeur solide dans les groupes traités comparées aux souris non traitées ($p < 5\%$). Cela laisse suggérer et d'une façon intéressante une inhibition de la prolifération cellulaire tumorale par l'HE de *Lippia citriodora*. Au 28^{ème} jour, le volume moyen des tumeurs des animaux témoins était de $5,4 \pm 0,6 \text{ cm}^3$ (groupe C), tandis que pour les animaux traités, il était de $2,879 \pm 0,263 \text{ cm}^3$ et $2,326 \pm 0,199 \text{ cm}^3$ respectivement pour les groupes A et B. Cette différence entre le témoin et les groupes traités a été significative ($p < 5\%$). Globalement, il est aussi intéressant de constater, qu'il n'y a pas de différence, statistiquement, significative entre les groupes traités (groupes A et B) avec un effet légèrement marqué pour la dose de 100 mg/kg.

En parallèle, l'évolution du poids corporel de ces souris (Figure 67) a été suivie dans le but d'étudier l'influence éventuelle de la tumeur elle-même et de l'HE sur l'état général des souris. En effet, nous avons constaté, l'existence d'une perte de poids assez marquée chez les souris traitées à forte dose de 100 mg/kg (groupe B). Il s'agit tout naturellement de trouver un juste milieu entre la dose idéale cytotoxique pour éliminer la tumeur sans entraîner d'effets secondaires délétères et préjudiciables à la santé des animaux traités.

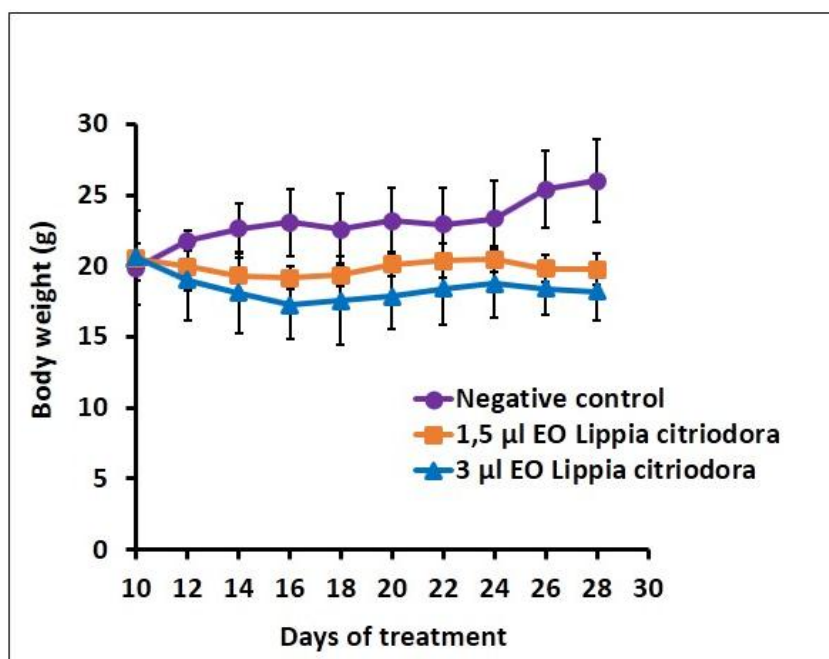


Figure 67 : Evolution du poids corporel des souris porteuses de tumeurs traitées avec l'HE de *Lippia citriodora* de Berkane et de celui des souris témoins.

Statistiquement, il y a une différence significative dans la variation du poids entre les souris du groupe C témoin et les souris du groupe A, entre les souris du groupe C témoin et les souris du groupe B et entre les souris du groupe A et les souris du groupe B. ANOVA $p < 5\%$.

VIII. Activité antibactérienne de l'HE de *Lippia citriodora*

VIII.1. Méthode de diffusion sur disques

La méthode de diffusion sur disques traduit l'action antibactérienne des HE testées par l'apparition ou l'absence d'un halo d'inhibition autour des disques (figure 68). Les diamètres des zones d'inhibition ont été reportés dans le tableau 19. Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'HE, plus il est petit, plus la bactérie est résistante (Fauchère and Avril, 2002). Les résultats indiquent que *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 étaient sensibles aux HE de *Lippia citriodora* testées, tandis que *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27583 était résistant.

Tableau 19 : Diamètre de la zone d'inhibition (mm) de l'HE de *Lippia citriodora* sur les souches bactériennes.

Souche bactérienne	Diamètre d'inhibition (mm)						
	AG	BE	BM	DE	MA	Ceftriaxone	Ofloxacine
<i>E. coli</i> ATCC 25922	8	8	10	8	10	28	32
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	8	11	11	11	11	25	28
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	6	6	6	6	6	14	18

AG: Agadir. BM: Beni Mellal. BE: Berkane. DE: Demnat. MA: Marrakech.

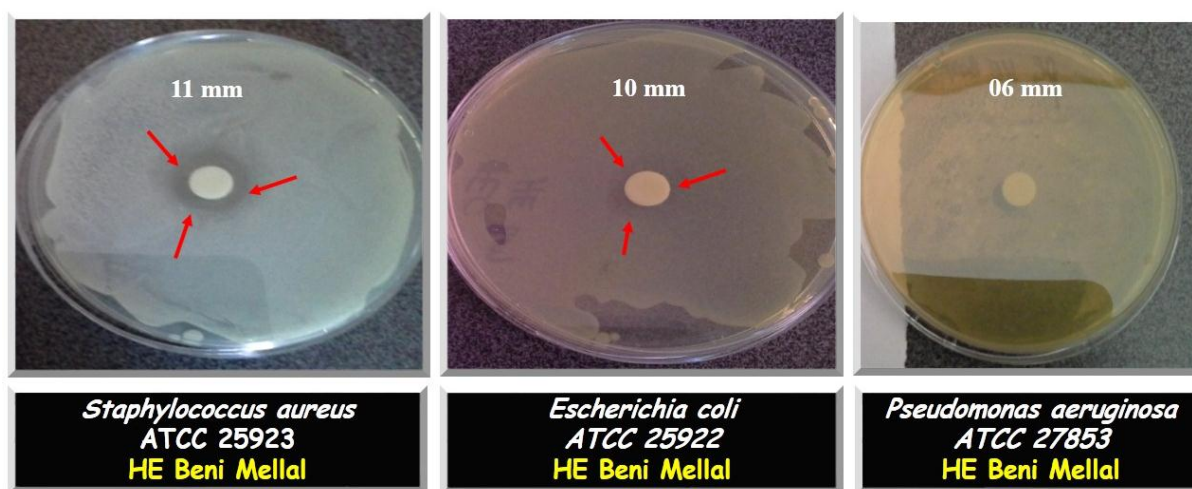


Figure 68 : Diamètres d'inhibition de l'HE de *Lippia citriodora* de Beni Mellal sur différentes bactéries testées.

VIII.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB)

Les valeurs obtenues des CMI et des CMB par la méthode standard de microdilution en bouillon de Mueller-Hinton sont présentées dans le tableau 20. Les CMI sur *Escherichia coli* variaient de 2,84 à 3,73 mg/ml pour les HE de MA et de BM, respectivement. Les CMI sur *Staphylococcus aureus* étaient de 3,51 mg/ml à 3,87 mg/ml pour les HE de BM et de DE.

Tableau 20 : concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB) de l'HE de *Lippia citriodora* sur les souches sensibles.

Huile essentielle	CMI et CMB (mg/ml)			
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	
	CMI	CMB	CMI	CMB
AG	8,37 ± 1,27	12,48 ± 2,27	5,84 ± 0,44	9,73 ± 1,81
BE	5,24 ± 0,17	8,49 ± 0,33	6,42 ± 0,46	12,12 ± 1,28
BM	3,73 ± 1,00	7,42 ± 0,30	3,51 ± 0,37	9,51 ± 2,80
DE	5,68 ± 1,25	9,15 ± 1,53	3,87 ± 0,36	10,31 ± 2,79
MA	2,84 ± 0,83	10,06 ± 3,93	4,69 ± 1,15	7,43 ± 1,32

AG: Agadir. BM: Beni Mellal. BE: Berkane. DE: Demnat. MA: Marrakech.

VIII.3. Discussion

L'HE de *Lippia citriodora* a montré une activité antimicrobienne significative contre les bactéries à Gram négatif et à Gram positif. En effet, le calcul du rapport CMB/CMI (2,14 pour *Escherichia coli* et 2,02 pour *Staphylococcus aureus*) a permis de qualifier les cinq HE étudiées, de bactéricides (Pankey and Sabath, 2004). Les CMI se situaient entre 2,84 et 8,37 mg/ml. Leurs valeurs (Tableau 20) ont montré que les HE de MA et de BM étaient les plus actives contre *Escherichia coli* et celles de BM et de DE étaient les plus actives contre *Staphylococcus aureus*. En revanche, AG et BE étaient les moins efficaces sur *Escherichia coli* et sur *Staphylococcus aureus*, respectivement. Les cinq HE testées n'ont montré aucune activité contre *Pseudomonas aeruginosa*. D'autres études ont rapporté que cette souche bactérienne est naturellement résistante aux autres HE. En outre, il est intéressant d'observer que les activités cytotoxique et antibactérienne des HE étaient différentes ; par exemple, MA a présenté une cytotoxicité modérée mais une activité antibactérienne très forte. Ceci peut s'expliquer d'une part, par les variabilités qualitative et quantitative des composés chimiques identifiés et d'autre part, par leurs mécanismes moléculaires différents.

Généralement, le premier site d'action des HE sur les cellules bactériennes se situe au niveau des membranes cytoplasmiques. Ceci est directement lié à la nature hydrophobe des composants constituant les HE. Cette propriété assure et facilite la perméabilité des phospholipides membranaires bicouches à ces molécules. Le résultat qui en découle est une déstabilisation de la structure de la membrane plasmique et une modification de sa perméabilité aux ions, aux protons et aux autres composants cellulaires avec une acidification du milieu intracellulaire, un

épuisement de la réserve d'ATP intracellulaire, une perte du contenu cellulaire, une coagulation du contenu cytoplasmique et une lyse cellulaire (Sikkema et al., 1995; Cox et al., 2000; Ultee et al., 2002; Guinoiseau et al., 2010). En plus des altérations membranaires induites, de telles molécules peuvent traverser la bicouche lipidique et interagir avec des cibles intracytoplasmiques (Cristani et al., 2007). Compte tenu de la diversité moléculaire des HE, il semble, plus que probable, que leur activité antibactérienne résulte de la combinaison de plusieurs mécanismes, agissant en synergie sur différentes cibles cellulaires (Burt, 2004). De plus, le caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné ainsi que le caractère hydrophile de leurs groupes fonctionnels sont déterminants vis-à-vis de leur activité antimicrobienne. Ainsi, l'ordre d'activité antimicrobienne de ces composés est le suivant : phénols > aldéhydes > cétones > alcools > éthers > hydrocarbures (Dorman and Deans 2000, Burt 2004, Bakkali et al 2008). En effet, parmi les molécules dominantes des cinq HE étudiées, le β -caryophyllène et l'oxyde de caryophyllène ont des activités antibactériennes et antifongiques (Dorman and Deans, 2000). Les composés oxygénés (oxyde de caryophyllène, 1,8-cinéole, etc.) ont une activité antibactérienne *in vitro* (Onawunmi, 1989) ; les citrals (néral et géraniol) ont un fort effet antibactérien (Sivropoulou et al., 1996). L'interaction entre le p-cymène, le γ -terpinène et les composés phénoliques présenterait une activité antibactérienne (Lambert et al., 2001). De plus, les HE à forte activité antibactérienne sont des huiles essentielles riches en phénols (thymol, carvacrol et eugénol) comme les HE de *Thymus vulgaris*, d'*Origanum compactum*, de *Satureja montana*, d'*Eugenia caryophyllata* et en aldéhyde cinnamique comme l'HE de *Cinnamomum zeylanicum* (Franchomme, 1981). Cependant, Il a été démontré que l'efficacité antimicrobienne d'une HE est due à la nature et au contenu de ses diverses molécules qui peuvent agir en synergie ; l'effet des composés minoritaires n'est pas toujours négligeable. La synergie entre les constituants peut provoquer un effet beaucoup plus prononcé que l'activité attendue des principaux composés majoritaires agissant individuellement ou séparément (Gueldner et al., 1985).

IX. Effet antioxydant de l'HE et de l'extrait hydro-alcoolique des feuilles de *Lippia citriodora*

Les résultats, exprimés en pourcentage de piégeage des radicaux libres (Tableau 21), révèlent que l'extrait hydro-alcoolique a montré une activité antiradicalaire très importante ($IC_{50}=63,79 \mu\text{g/ml}$), alors que l'HE est faiblement antioxydante ($IC_{50}=228,40 \mu\text{g/ml}$), comparés à la vitamine C ($IC_{50}=9,55 \mu\text{g/ml}$). Comme cette dernière, les échantillons testés ont exercé un effet antioxydant de manière dose-dépendante. A $200 \mu\text{g/ml}$, l'extrait hydro-alcoolique a présenté une

activité antiradicalaire élevée (84,34%), contre une activité modeste (47,10%) pour l'HE, comparées à celle de la vitamine C (92,48%) (Figure 69).

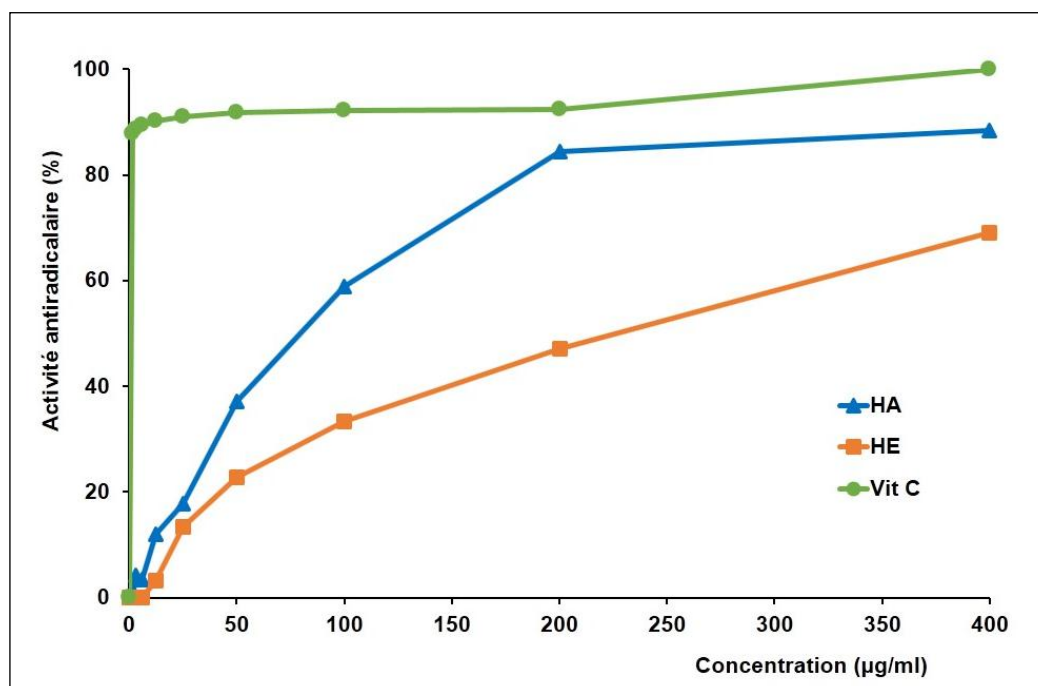


Figure 69 : Activité antiradicalaire de l'HE et de l'extrait alcoolique des feuilles de *Lippia citriodora* évaluée par la méthode de DPPH. HE: huile essentielle. HA: extrait hydro-alcoolique. Vit C: vitamine C.

Tableau 21 : Concentration inhibitrice (IC₅₀) de l'HE et de l'extrait hydro-alcoolique de *Lippia citriodora*.

Produit testé	IC ₅₀ (µg/ml)
Vit C	9,55 ± 0,23
HA	63,79 ± 4,65
HE	228,40 ± 6,41

HE: huile essentielle. HA: extrait hydro-alcoolique. Vit C: vitamine C.

El-Hawary et al. ont montré que les extraits aqueux et alcooliques des parties aériennes fraîches de *Lippia citriodora* présentaient des propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques, analgésiques et antioxydantes. L'extrait alcoolique a montré des activités anti-inflammatoires, analgésiques et antioxydantes plus élevées, tandis que l'extrait aqueux possédait une activité antipyrétique plus élevée (El-Hawary et al., 2012). Les composés phénoliques, les acides phénols (l'acide dihydrocaféique, l'acide 4-hydroxycinnamique) et les flavonoïdes (la lutéoline-7-O-glucoside) pourraient être responsables de ces activités observées (Valentão et al., 2002; Mothana et al., 2010; El-Hawary et al., 2012). Cela démontre l'importance des extraits hydro-alcooliques des

feuilles de *Lippia citriodora*, riches en polyphénols et flavonoïdes, dans la protection des cellules et la prévention contre le cancer.

X. Discussion et conclusion

Ce travail a été réalisé afin d'étudier, pour la première fois, l'activité cytotoxique *in vitro* de l'HE de *Lippia citriodora* provenant de différentes régions du Maroc contre trois lignées de cellules tumorales : le mastocytome murin (P815), l'adénocarcinome de sein humain (MCF7) et le carcinome de rein du singe vert Africain (VERO). A ce propos, nous avons démontré que cette HE exerçait sur ces trois lignées, une activité cytotoxique dose-dépendante et différentielle. Les niveaux de cytotoxicité de l'HE variaient selon les régions de provenance. Ainsi, les IC₅₀ variaient de 6,60 à 79,63 µg/ml (Figure 50). L'effet cytotoxique était très fort à l'égard de P815 (l'HE de Berkane est la plus cytotoxique avec IC₅₀=6,60 µg/ml). L'activité était élevée à modérée contre les lignées cellulaires MCF7 et VERO (l'HE de Demnat est la plus cytotoxique avec IC₅₀=34,72 µg/ml et 32,90 µg/ml, respectivement) (Döll Boscardin et al., 2012). L'analyse chimique de cette HE a été effectuée par une chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (Tableau 12). Les principales molécules dominant la composition chimique, appartiennent à cinq familles biochimiques, à savoir les sesquiterpènes (Ar-curcumène 12,32%), les oxydes terpéniques (oxyde de caryophyllène 13,68%), les sesquiterpénols (spathuléol 12,38%), les aldéhydes monoterpéniques (néral 8,07%) et les monoterpénols (cis-verbéol 6,28%) (Tableau 13). D'autres molécules telles que le β-caryophyllène, l'isolédène, l'élémente, le 1,8 cinéole, le copaène et le nérol sont également présentes avec des taux variables. La majorité des composés, trouvés dans les HE de *Lippia citriodora* étudiées, étaient quantitativement et qualitativement différents de ceux rapportés dans la littérature. Par exemple, les taux moyens du limonène et du gèranial étaient respectivement de 17% et 9% dans l'HE du Maroc (feuilles récoltées au mois de Mai). Le limonène n'est que de 0,52% et le gèranial n'est pas détecté dans les HE actuellement étudiées (feuilles récoltées entre mi-juillet et mi-août). Cependant, les taux des sesquiterpènes (β-caryophyllène, Ar-curcumène, β-élémente), des oxydes terpéniques (oxyde de caryophyllène), des alcools monoterpéniques (cis-verbéol) et des alcools sesquiterpéniques (spathuléol) étaient plus élevés (Bellakhdar et al., 1994). L'interaction de ces molécules entre elles et leurs mécanismes d'action moléculaires restent à établir. En effet, la cytotoxicité induite par les différentes HE dépend de la composition chimique de chacune d'elles et de la lignée cellulaire tumorale cible. A notre connaissance et jusqu'à ce jour, il n'y a pas eu de travaux réalisés sur l'activité cytotoxique de l'HE de *Lippia citriodora*. Cependant, l'effet cytotoxique de l'HE de *Lippia alba*, avec son principal constituant citral sur les lignées

cellulaires HeLa et VERO, a été rapporté (Mesa Arango et al. 2009). La cytotoxicité observée, contre les cellules des différentes lignées tumorales, pourrait être due aux composés majoritaires des HE. Dans notre étude, une différence quantitative de ces principaux composés n'était pas significative, suggérant que la cytotoxicité différentielle pourrait être probablement attribuée à la différence des teneurs en composés minoritaires, qui pourraient interagir entre eux ou avec les molécules majoritaires, déterminant ainsi l'intensité de l'activité cytotoxique globale (Franchomme, 1981; Gueldner et al., 1985). En général, la variation de la composition chimique peut être attribuée aux conditions environnementales, variables d'une région à l'autre, selon le climat, la nature du sol, l'altitude. Elle dépend, aussi, de la période de cueillette au cours du cycle végétatif, des conditions de récolte, de l'opération de séchage et de stockage et des méthodes d'extraction utilisées (Catalan et al., 2002; Santos Gomes et al., 2005).

Afin d'évaluer le rôle joué par les composés majoritaires et minoritaires de l'HE de *Lippia citriodora*, nous avons étudié la cytotoxicité induite par certaines molécules pures telles que l'oxyde de caryophyllène, le citral, l'élémane et le limonène (Figure 59). Les résultats ont montré une forte activité cytotoxique de tous ces composés, contre les cellules de la lignée tumorale P815, d'une manière différentielle et dose-dépendante. De plus, l'oxyde de caryophyllène est plus cytotoxique que les trois autres composés le citral, l'élémane et le limonène, avec $IC_{50} = 6,47 ; 10,95 ; 15,90$ et $22,43 \mu M$, respectivement (Tableau 16). Ces molécules pures ont montré un intérêt pharmacologique très intéressant et méritent une étude très approfondie puisqu'elles exercent leurs effets cytotoxiques à de très faibles concentrations avec des IC_{50} aux alentours de $10 \mu M$ (Geran et al., 1972). Nos résultats sont concordants avec ceux de Dudai et al. (Dudai et al., 2005), rapportant une importante activité cytotoxique du citral sur les cellules tumorales. En outre, d'autres études ont mentionné que les citrals induisaient une apoptose dans la leucémie lymphoïde chronique par l'activation de la caspase-3 (De Martino et al., 2009). De plus, il a été démontré que le β -caryophyllène et l'oxyde de caryophyllène induisaient également l'apoptose dans les cellules tumorales (Amiel et al., 2012; Jegajeevanram et al., 2014). D'autres auteurs ont rapporté que le β -élémane inhibait la prolifération des cellules du glioblastome humain par l'activation du facteur de maturation β , et qu'il inhibait également les cellules de la lignée tumorale MCF7 ($IC_{50}=14,70 \mu g/ml$) et qu'il induisait une sensibilisation au cisplatine (Martins et al., 2010; Zhu et al., 2011; Chen et al., 2013). Ces résultats corroborent également ceux rapportant que le limonène est un inhibiteur de la progression tumorale en agissant sur la protéine P21ras (Dudai et al., 2005). Par ailleurs, il a été démontré que les sesquiterpènes ont une activité cytotoxique et sont capables d'arrêter la prolifération des cellules cancéreuses de la

prostate dans la phase G₀/G₁ (Chen et al., 2013). Il a été rapporté, également, que le cis-verbénol présentait une activité potentielle d'élimination des radicaux peroxydes (Choi et al., 2010). Dans l'ensemble, nos résultats montrent que, même à de très faibles concentrations, les composés minoritaires contenus dans les HE de *Lippia citriodora* étaient capables de présenter des activités cytotoxiques significatives et différentielles contre les cellules P815. Cependant, l'effet cytotoxique puissant de l'HE testée pourrait être attribué à l'interaction de l'ensemble de ses constituants majoritaires et minoritaires. Par la même occasion, aucun effet cytotoxique sur les cellules mononucléées du sang périphérique humain (PBMC) n'a été observé par rapport à celui exercée sur les cellules tumorales. Cela suggère que l'HE de *Lippia citriodora* peut agir de façons différentielle et sélective sur les cellules tumorales avec une absence de toxicité et d'éventuels effets secondaires. Effectivement, le manque de sélectivité envers les cellules cancéreuses est l'un des grands problèmes de la chimiothérapie anticancéreuse.

Etant donné que les mécanismes moléculaires de la cytotoxicité de l'HE de *Lippia citriodora*, induite *in vitro*, ne sont pas encore bien élucidés et dans le but de comprendre ces mécanismes, nous avons mené une étude de l'induction de l'apoptose sur les lignées cellulaires tumorales P815 et MCF7. Les résultats de cet essai ont montré que cette HE induisait la mort programmée sur les cellules P815 (Figure 55), alors qu'elle ne l'induisait pas sur les cellules MCF7 (Figure 56). Ces données ont révélé que la cytotoxicité différentielle est fonction de la concentration, du temps d'exposition et des cellules cibles. Cela laisse suggérer qu'un autre mécanisme de mort cellulaire et peut être un autre site d'action, pourraient être impliqués. En effet, l'étude de l'apoptose par électrophorèse de l'ADN apoptotique fragmenté et par la détection de la phosphatidylsérine exposée à la surface des membranes des cellules par le marquage à l'annexine-Biotine-streptavidine FITC, a mis en évidence une apoptose dans les cellules P815 (Figure 57). En revanche, ces tests n'ont pas montré de fragments d'ADN mais des changements morphologiques d'apoptose tardive et/ou nécrose dans les cellules MCF7 ont été observé avec la rupture de la membrane cytoplasmique, le débordement du cytoplasme et la fuite des organites cellulaires. (Figure 58).

Afin de quantifier plus précisément le mécanisme de l'apoptose pour tenter d'évaluer le mécanisme moléculaire pouvant expliquer le mode d'action cytotoxique de l'HE de *Lippia citriodora*, nous avons mesuré l'expression de certains gènes impliqués dans ce phénomène. En effet, il est possible d'évaluer l'intensité de la mort cellulaire par l'étude de l'expression de ces gènes connus pour être des signaux pro ou anti-apoptotiques. Dans cette optique, la présente étude a été entreprise pour évaluer l'effet de l'HE de *Lippia citriodora* sur l'expression des gènes

Bax, Bcl-2, p53 et c-jun dans les cellules MCF7 par la technique de la PCR en temps réel (Figures 62, 63, 64 et 65).

Les niveaux de l'expression de ces gènes, tendent à varier avec le temps (à 6h et à 12h) et selon l'origine géographique de chaque HE. A 6h, le rapport Bcl-2/Bax est inférieur à 1 pour les HE (AG, BE et BM), supérieur à 1 pour les HE (DE et MA). A 12h, ce rapport est inférieur à 1 (AG, DE et MA), supérieur à 1 (BE, BM). Ce rapport Bcl-2/Bax est déterminant pour l'induction ainsi que pour l'inhibition de l'apoptose. Lorsque ce rapport est supérieur à 1, le signal anti-apoptotique est dominant parmi les cellules, par contre si ce rapport est inférieur à 1, le mécanisme apoptotique doit prévaloir (Sakuragi et al., 2002). Cette variation constatée de l'expression des gènes, en fonction de l'origine géographique, peut être expliquée par la variation de la composition chimique en principes actifs majoritaires et minoritaires de chaque HE. En général, le niveau de l'expression de Bcl-2 diminue par l'action des HE sur les cellules cancéreuses (Cha et al., 2009). En revanche, le gène Bax est un régulateur pro-apoptotique (Sedlak et al., 1995), alors que le gène p53 régule la voie de l'apoptose en interagissant avec les gènes de la famille Bcl-2 (Marin et al., 1994). Le gène p53 est connu pour être le gardien du génome. Il est activé à l'état physiologique lors d'altérations génétiques (Laverdet, 2013). Il améliore l'apoptose des cellules cancéreuses et empêche la réplication cellulaire en arrêtant le cycle cellulaire en phase G₁ ou en interphase (Fridman and Lowe, 2003). En induisant la libération du cytochrome-c mitochondrial, p53 pourrait être capable d'activer les caspases effectrices, y compris la caspase-3. Il a été rapporté que p53 augmente le niveau de l'expression du gène Bax par l'activation transcriptionnelle directe du promoteur du gène Bax et diminue, de façon concomitante, le niveau de l'expression du gène Bcl-2 (Pearson et al., 2000).

Nos résultats suggèrent une apoptose tardive et/ou une nécrose. Ils sont en accord avec de nombreuses études qui ont démontré le rôle de Bax, Bcl-2 et p53 dans l'induction de l'apoptose tardive et/ou de la nécrose qui pourrait s'expliquer par le déclenchement d'une machinerie d'espèces réactives de l'oxygène. Il est connu que les protéines de la famille Bcl-2 jouent un rôle central dans la régulation de la mort cellulaire et sont capables de réguler divers mécanismes qui englobent l'apoptose, la nécrose et l'autophagie (Cory et al., 2003; Levine and Kroemer, 2008; Yip and Reed, 2008). Il a été établi que Bax est le principal élément dans le déclenchement de la nécrose et celle-ci est induite par la libération de *tAIF* à partir des mitochondries (Moubarak et al., 2007; Zong et al., 2004; Zong and Thompson, 2006). En outre, une diminution de p53 avec Bcl-2 inchangé conduit à une apoptose tardive et/ou à une voie de nécrose. Cependant, on ignore encore le rôle de Bcl-2 dans la régulation de la mort cellulaire par nécrose, par rapport au rôle

bien connu de ce gène dans la mort cellulaire programmée par apoptose (Moubarak et al., 2007). Le gène c-jun est un proto-oncogène, capable de réguler la prolifération, la progression du cycle cellulaire, la différenciation et l'apoptose de différents types cellulaires (Gaudio et al 2006). La régulation à la baisse de c-jun (à 6h et à 12h) a induit la mort des cellules MCF7. Il a été démontré que la diminution du niveau de l'expression de c-jun conduit à la mort des cellules tumorales (Elahy and Dass, 2011; Zhang et al., 2004). La régulation à la baisse de c-jun pourrait être due à la réponse au stress osmotique (Xia et al., 2007).

L'activité cytotoxique rapportée des HE, en général, ou de leurs constituants comprend l'induction de la mort cellulaire par apoptose et/ou nécrose, en activant les protéines pro-apoptotiques directement ou via les voies de signalisation, en arrêtant le cycle cellulaire directement ou via l'inhibition de l'activité des protéines-kinases. Elles peuvent aussi modifier le potentiel membranaire des cellules cancéreuses (Bouyahya et al., 2016). Certains de ces effets sont attribuables à la nature lipophile et aux faibles poids moléculaires des constituants des HE, surtout aux citrals, qui leur permettent de traverser les membranes cellulaires, en modifiant les couches de phospholipides et en augmentant la fluidité de la membrane qui devient anormalement perméable. Cela entraîne une fuite de radicaux, du cytochrome-c, des ions de calcium et des protéines, comme dans le cas du stress oxydatif (Bakkali et al., 2008). La réduction de la production d'ATP, l'altération du gradient de pH et la perte de potentiel mitochondrial ne sont que les conséquences des membranes cellulaires perturbées. La perméabilisation des membranes mitochondriales de l'extérieur jusqu'à l'intérieur conduit à la mort cellulaire par l'apoptose et par nécrose (Armstrong, 2006). En outre, les HE peuvent également agir comme pro ou antioxydantes, affectant l'état redox cellulaire (Wei and Shibamoto, 2010; Azmi et al., 2006; Tuttolomondo et al., 2013). L'apoptose des cellules cancéreuses se produit par l'activation de certaines protéines de la famille des caspases. Au contact de l'HE de *Lippia citriodora* avec les cellules MCF7, les principes actifs majoritaires et/ou minoritaires interagissent par des mécanismes très complexes et déterminent l'activité globale observée. En présence de limonène, les caspases 3 et 9 sont activées dans les cellules leucémiques cultivées et dans les cellules de cancers en particulier de la prostate (Kim et al., 2012) ou dans le cancer du rein (caspases 3, 8 et 9) (Ahmad et al., 2011). De Martino et al. ont rapporté que l'activité pro-apoptotique de l'HE de verveine officinale (*Verbena officinalis*) et de son composé citral serait due à une activation directe de la procaspase-3 (De Martino et al., 2009). Le β -caryophyllène peut aussi activer les caspases (caspase 3) (Park et al., 2011), le β -élémane active les (caspases 3, 7, 9 et 10) dans différentes lignées cellulaires de cancers de la prostate, de gliome, du sein, du côlon et du poumon. Il agit aussi sur la voie p53, Bcl-2 (Li et al.,

2005; Manikandan et al., 2010). Plusieurs constituants terpéniques des HE, tels que le β -caryophyllène, peuvent induire spécifiquement la production des espèces réactives d'oxygène dans les mitochondries des cellules cancéreuses sans augmenter le niveau du stress oxydatif dans les cellules normales (Park et al., 2011).

L'interaction entre l'HE de *Lippia citriodora* avec un médicament de la chimiothérapie anticancéreuse n'a pas été bien décrite dans la littérature. En effet, l'association de cette HE ou l'association d'un composé pur (l'oxyde de caryophyllène) avec le cisplatine, ont montré un antagonisme (Chou and Talalay, 1984). Cela veut dire, qu'il y a opposition des effets pharmacologiques de ces substances entre elles ou compétition au niveau des récepteurs cellulaires de la cible. Ce résultat confirme, sans aucun doute, qu'il faut éviter d'administrer simultanément les médicaments de la chimiothérapie anticancéreuse, en l'occurrence le cisplatine, avec l'HE de *Lippia citriodora* ou avec un de ses composés purs.

Afin de confirmer ces résultats obtenus *in vitro* et de montrer l'importance clinique de l'HE de *Lippia citriodora*, des expériences *in vivo* ont été réalisées en utilisant le modèle animal DBA₂/H²d de souris porteuses de tumeur. L'administration par voie orale de cette HE chez des souris a réduit de manière significative (temps et dose dépendants) le développement de la tumeur solide dans les groupes traités comparés aux souris non traitées (Figure 66).

Un autre test a montré que l'HE de *Lippia citriodora* exerçait une activité antibactérienne significative contre les bactéries à Gram négatif et à Gram positif. En effet, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 étaient sensibles, tandis que *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27583 était résistant. Les valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) fluctuaient entre 2,84 et 8,37 mg/ml (Tableau 20). En effet, le calcul du rapport CMB/CMI (2,14 pour *Escherichia coli* et 2,02 pour *Staphylococcus aureus*) a permis de qualifier l'HE étudiée, de bactéricide (Pankey and Sabath, 2004). Comme il est démontré dans cette rubrique, l'activité antibactérienne de l'HE de *Lippia citriodora* sur les bactéries étudiées est très importante. Des recherches complémentaires seront nécessaires pour identifier, isoler et purifier le principe actif ou les composés responsables de cette activité ainsi que la synergie d'action probable entre eux. Par la suite, le ou les mécanismes d'action les plus probables, seront recherchés et les éventuels effets secondaires seront évalués.

En fin, le test au DPPH, a révélé que l'extrait hydro-alcoolique des feuilles de *Lippia citriodora* a présenté une activité antiradicalaire très importante (IC₅₀=63,79 μ g/ml), alors que l'HE est faiblement antioxydante (IC₅₀=228,40 μ g/ml), comparés à la vitamine C (IC₅₀=9,55 μ g/ml)

(Figure 69, Tableau 21). Cela démontre l'importance des extraits hydro-alcooliques des feuilles de *Lippia citriodora*, riches en polyphénols et flavonoïdes, dans la protection et la prévention contre le cancer.

Troisième partie : Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

A l'heure actuelle, les plantes demeurent indéniablement une source importante de nouvelles matières premières de médicaments. L'importance du règne végétal n'a d'ailleurs jamais cessé d'être démentie. Il n'existe aucun domaine thérapeutique pour lequel les plantes feraient défaut. En cancérologie, de nombreuses molécules cytotoxiques sont originaires de plantes, même si bien souvent, elles sont produites ensuite par synthèse ou hémisynthèse. Dans le même ordre d'idée, un intérêt considérable a été accordé à l'identification de substances chimiopréventives naturelles inhibant, retardant ou inversant le processus de cancérogenèse. Parmi les médicaments anticancéreux provenant des végétaux, la vinblastine, la vincristine, la vinorelbine, le paclitaxel, le docétaxel, l'étoposide, l'ellipticine, la camptothécine, le topotécan pour ne citer que ceux-là. Ces médicaments anticancéreux, d'origine naturelle, ont montré leur efficacité dans le traitement de différents types de cancers. Cependant l'apparition de phénomènes de chimio-résistance vis-à-vis des traitements actuels ainsi que les effets secondaires de certaines drogues anticancéreuses et la diversité génétique des cancers appellent à l'amélioration constante des protocoles thérapeutiques actuels mais aussi à la découverte de nouvelles substances efficaces et tolérables par l'organisme humain.

Dans le cadre de valorisation des plantes médicinales utilisées dans la médecine traditionnelle marocaine, les travaux de recherche entrepris au cours de ce projet de thèse auront permis de mettre en lumière certains aspects du potentiel pharmacologique de l'HE de *Lippia citriodora*. En effet, cette HE exerçait une activité cytotoxique dose-dépendante et différentielle selon les lignées tumorales et selon les régions géographiques. L'analyse chimique a été réalisée par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Les principales molécules dominant la composition chimique, sont l'oxyde de caryophyllène, le spathulénol, l'Ar-curcumène, le néral et le cis-verbénol. L'intensité de l'activité cytotoxique globale observée, pourrait être aussi, attribuée à la différence de teneur en composés minoritaires, qui pourraient interagir entre eux ou avec les molécules majoritaires. Afin d'évaluer le rôle joué par ces composés majoritaires et minoritaires de l'HE de *Lippia citriodora*, nous avons étudié la cytotoxicité induite par l'oxyde de caryophyllène, le citral, l'élémane et le limonène. Les résultats ont montré une forte activité cytotoxique de tous ces composés d'une manière différentielle et dose-dépendante. L'oxyde de caryophyllène est plus cytotoxique que le citral, l'élémane et le limonène. Dans l'ensemble, nos résultats montrent que, même à de très faibles

proportions, les composés minoritaires contenus dans les HE de *Lippia citriodora* étaient capables de présenter des activités cytotoxiques importantes et différentielles contre les cellules P815. Par la même occasion, aucun effet cytotoxique sur les cellules mononucléées du sang périphérique humain (PBMC) n'a été observé par rapport à celui exercé sur les cellules tumorales, suggérant que l'HE de *Lippia citriodora* peut agir de façons différente et sélective sur les cellules tumorales avec une absence de toxicité et d'éventuels effets secondaires.

Afin de pouvoir trouver des explications au mode d'action cytotoxique, pour tenter d'évaluer le mécanisme moléculaire qui n'est pas encore élucidé, les résultats du test de l'induction de l'apoptose ont montré que l'HE de *Lippia citriodora* induisait la mort programmée sur les cellules P815, alors qu'elle ne l'induisait pas sur les cellules MCF7. Ces données ont révélé que la cytotoxicité différentielle est fonction de la concentration, du temps d'exposition et des cellules cibles, laissant suggérer qu'un autre mécanisme de mort cellulaire et peut être un autre site d'action pourraient être impliqués. En effet, l'étude de l'apoptose par électrophorèse de l'ADN apoptotique fragmenté et par la détection de la phosphatidylsérine exposée à la surface des membranes des cellules par le marquage à l'annexine-Biotine-streptavidine FITC, a mis en évidence une apoptose sur les cellules P815. En revanche, ces tests n'ont pas montré de fragments d'ADN, mais, des changements morphologiques d'apoptose tardive et/ou de nécrose sur les cellules MCF7 ont été observés avec la rupture de la membrane cytoplasmique, le débordement du cytoplasme et la fuite des organites cellulaires. La mesure de l'expression de certains gènes impliqués dans ce phénomène, a permis d'approfondir ces investigations. En effet, les gènes Bax, Bcl-2, p53 et c-jun ont présenté des changements des niveaux de leurs expressions sous l'effet de l'HE de *Lippia citriodora* selon le temps d'exposition et selon l'origine géographique. Ces résultats observés, suggèrent une apoptose tardive et/ou un effet de nécrose. En effet, l'interaction entre les principes actifs majoritaires et/ou minoritaires, par des mécanismes très complexes, pourrait expliquer cette activité globale observée.

Dans un autre volet, l'association de l'HE de *Lippia citriodora* ou de l'oxyde de caryophyllène, à une concentration fixe (IC₃₀), avec le cisplatine à des concentrations décroissantes, ont montré un antagonisme. Cela veut dire, qu'il y a opposition des effets pharmacologiques de ces substances entre elles au niveau des récepteurs cellulaires spécifiques. Dans ce type d'expériences, il y a des difficultés à interpréter les résultats des effets obtenus, car les HE sont des mélanges de molécules complexes de structures chimiques très diverses et, par conséquent, leur action sur la cellule cancéreuse est l'effet de chaque composé individuel modulé par l'action de l'effet synergique potentiel. Ce résultat confirme qu'il faut éviter d'administrer, simultanément, les

médicaments de la chimiothérapie anticancéreuse, tel que le cisplatine, avec l'HE de *Lippia citriodora* ou avec un de ses composés purs (oxyde de caryophyllène).

Des expériences *in vivo* ont été réalisées en utilisant le modèle animal DBA₂/H²d. L'administration par voie orale, de l'HE de *Lippia citriodora* chez des souris porteuses de tumeur, a permis de réduire de manière significative (temps et dose dépendants) le volume de la tumeur solide. Par ailleurs, un autre test a montré que cette HE exerçait une activité antibactérienne intéressante contre *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Cependant, la souche ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa* était résistante.

En d'autre part, l'extrait hydro-alcoolique des feuilles de *Lippia citriodora* a présenté une activité antiradicalaire très importante, alors que l'HE est faiblement antioxydante. Cela démontre l'importance des extraits hydro-alcooliques des feuilles de *Lippia citriodora*, riches en polyphénols et flavonoïdes, dans la protection et la prévention contre le cancer.

Finalement, nous avons pu mettre en valeur *Lippia citriodora* qui est une plante très utilisée en médecine traditionnelle marocaine. L'objectif premier de notre projet a été atteint puisque tous les résultats obtenus mettent bien en évidence le potentiel cytotoxique de l'HE de cette plante. Elle agit par des mécanismes d'actions très variés et complémentaires que l'on peut expliquer soit par sa composition chimique variée, la nature des molécules et la cible cellulaire ou encore par son action vibratoire et énergétique.

A première vue des résultats obtenus, relatifs aux tests préliminaires effectués, cette présente étude démontre qu'il reste encore beaucoup d'investigations à réaliser pour pouvoir élucider les mécanismes moléculaires par lesquels l'HE de *Lippia citriodora* exerce ses effets cytotoxique et antibactérien. En perspectives, nous souhaitons étendre ce travail de recherche, à d'autres expérimentations pour pouvoir apporter des réponses à beaucoup de questions en suspens. Nous comptons, ainsi, jeter des lumières sur différentes problématiques suivantes :

- Tester l'HE de *Lippia citriodora* sur d'autres lignées de cellules tumorales ;
- Poursuivre l'élucidation du mécanisme d'action de l'HE de *Lippia citriodora* par la mesure des marqueurs d'apoptose (exemple la caspase-3 clivée) et la détermination du niveau touché du cycle cellulaire (G₀/G₁, G₂/M, S) par cytométrie en flux ;
- Elargir l'étude de l'activité antibactérienne de l'HE de *Lippia citriodora* à plusieurs autres souches bactériennes ; ensuite procéder à des recherches complémentaires pour identifier, isoler et purifier le principe actif ou les composés responsables de cette activité ainsi que la synergie d'action probable entre eux. Par la suite, évaluer le ou les mécanismes d'action les plus probables ;

- Visualiser les effets produits par l'HE de *Lippia citriodora* sur les cellules cancéreuses au niveau de leurs ultrastructures par le microscope électronique à transmission ;
- Réaliser des études de génotoxicité, pour recueillir plus d'informations sur le mécanisme d'action de l'HE de *Lippia citriodora* ;
- Tester *in vivo* l'HE de *Lippia citriodora* et certains composés purs sur d'autres modèles animaux et procéder aux analyses histologiques, moléculaires et biochimiques ;
- Effectuer des tests toxicologiques avec l'HE de *Lippia citriodora*.
- Procéder à une étude approfondie des molécules (oxyde de caryophyllène, citral, élémène et limonène) :
 - par la réalisation des tests de cytotoxicité sur d'autres lignées cellulaires de cancers et sur différentes cellules normales des tissus sains
 - par l'étude de l'activité antibactérienne
 - par l'analyse de l'expression des gènes de l'apoptose en établissant la relation entre le niveau de cette expression et les différentes transformations cellulaires enregistrés
 - par l'étude *in vivo* ;

En général, l'exploration des propriétés antitumorales des HE est un axe de recherche d'actualité qui doit être poussé et mis en avant afin de bien élucider l'interférence simultanée de leurs nombreux constituants actifs avec la voie de signalisation multiple qui pourrait être la clé pour surmonter la limite actuelle des agents chimiothérapeutiques et en particulier le développement de la multi-résistance aux médicaments. De plus, il semble qu'il est temps d'augmenter le nombre d'études expérimentales et de commencer à mener des études toxicologiques et des essais cliniques sur les composés bioactifs potentiels sélectionnés par des études *in vitro* et *in vivo*. En outre, les mécanismes d'action par lesquels les HE et leurs constituants actifs exercent un effet anticancéreux devraient être entrepris. La flore marocaine regorge de plantes dont le potentiel pharmacologique mérite d'être étudié. De belles années à venir dans la recherche en matière de phyto-aromathérapie permettront d'ouvrir de nouveaux horizons dans différents domaines thérapeutiques en particulier, la cancérologie.

Références bibliographiques et webographiques

Références bibliographiques

Abarzua, S., Szewczyk, M., Gailus, S., Richter, D. U., Ruth, W., Briese, V., Piechulla, B., 2007. Effects of phytoestrogen extracts from *Linum usitatissimum* on the Jeg3 human trophoblast tumour cell line. *Anticancer research*, 27(4A):2053-2058.

Abraham, M.C., Shaham, S., 2004. Death without caspases, caspases without death. *Trends Cell Biology*, 14(4):184-193.

Actualités pharmaceutiques. Mai 2010. Editions Elsevier. N° 496.

Ahmad, S.T., Arjumand, W., Seth, A., Nafees, S., Rashid, S., Ali, N., Sultana, S., 2011. Preclinical renal cancer chemopreventive efficacy of geraniol by modulation of multiple molecular pathways. *Toxicology*, 290(1):69-81.

Aissi, S., Ben Mrad, M., Zarraa, S., Bounedjar, A., Laabidi, S., Boussen, H., 2012. Thérapies anticancéreuses ciblées : vers une nouvelle toxicologie ?, *Pathologie Biologie*, 60(4):234-238.

Ait M'Barek, L., Ait Mouse, H., Jaâfari, A., Aboufatima, R., Benharref, A., Kamal, M., Bénard, J., El Abbadi, N., Bensalah, M., Gamouh, A., Chait, A., Zyad, A., 2007. Cytotoxic effect of essential oil of thyme (*Thymus broussonettii*) on the IGR-OV1 tumor cells resistant to chemotherapy. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40(11):1537-1544.

Ait Mouse, H., Tilaoui, M., Jaafari, A., M'barek, L.A., Aboufatima, R., Chait, R., Zyad, A., 2012. Evaluation of the in vitro and in vivo anticancer properties of Moroccan propolis extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(3):558-567.

Akanmu, A.S., 2006. AIDS-associated malignancies. *African Journal of Medicine and Medical Sciences*, 35:57-70.

Alam, J. J., 2003. Apoptosis: target for novel drugs. *Trends in Biotechnology*, 21(11):479-483.

Albanes, D., 1998. Height, early energy intake, and cancer. *British Medical Journal*, 317:1331-1332.

Allali, H., Djabou, N., 2011. *Sambucus nigra* L. : le sureau noir, une plante de la pharmacopée traditionnelle Nord-africaine. Editions Omniscryptum.

Al-Sharif, I., Remmal, A., Aboussekhra, A., 2013. Eugenol triggers apoptosis in breast cancer cells through E2F1/survivin down-regulation. *BMC cancer*, 13(1):600.

Altonsy, M.O., Andrews, S.C., 2011. Diallyl disulphide, a beneficial component of garlic oil, causes a redistribution of cell-cycle growth phases, induces apoptosis, and enhances butyrate-induced apoptosis in colorectal adenocarcinoma cells (HT-29). *Nutrition and Cancer*, 63(7):1104-1113.

Amiel, E., Ofir, R., Dudai, N., Soloway, E., Rabinsky, T., Rachmilevitch, S., 2012. β -caryophyllene, a Compound Isolated from the biblical balm of gilead (*Commiphora gileadensis*), is a selective apoptosis inducer for tumor cell lines. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012(2012):1-8.

Amy, C. B., 2012. Anticancer Activity of *Morinda citrifolia* (Noni) fruit: a review. *Phytotherapy research*, 26(10): 1427-1440.

Aoki, K., 2003. Chronic bacterial infections and cancer-from the viewpoint of the epidemiology and biological evidences. *Nippon saikingaku zasshi. Japanese journal of bacteriology*, 58(4):603-618.

Ardailou, R., 2002. La thérapie génique : sa place actuelle et son avenir. *La Revue de Médecine Interne*, 23:679-682.

- Arends, M. J., Morris, R. G., Wyllie, A. H., 1990. Apoptosis: The role of the endonuclease. *American Journal of Pathology*, 136(3):593-608.
- Armstrong, J. S., 2006. Mitochondrial membrane perméabilisation: the sine qua non for cell death. *BioEssays* 28(3):253-260.
- Auckland, A., 2008. Surgery adjuvant therapy beneficial for cervical cancer. *Inpharma weekly*, 1623:3.
- Averbeck, D., Averbeck, S., Dubertret, L., Young, A. R., Morliere, P., 1990. Genotoxicity of bergapten and bergamot oil in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 7(2):209-229.
- Axon, A. T., 2007. Relationship between *Helicobacter pylori* gastritis, gastric cancer and gastric acid secretion. *Advances in Medical Sciences*, 52:55-60.
- Azad, M.B., Chen, Y., Gibson, S.B., 2009. Regulation of autophagy by reactive oxygen species (ROS): implications for cancer progression and treatment. *Antioxidants & redox signaling*, 11(4):777-790.
- Azmi, A. S., Bhat, S. H., Hanif, S., Hadi, S. M., 2006. Plant polyphenols mobilize endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: a putative mechanism for anticancer properties. *FEBS Letters*, 580(2):533-538.
- Babu, L.H., Perumal, S., Balasubramanian, M.P., 2012a. Myrtenal, a natural monoterpene, down-regulates TNF- α expression and suppresses carcinogen-induced hepatocellular carcinoma in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 369(1-2):183-193.
- Babu, L.H., Perumal, S., Balasubramanian, M.P., 2012b. Myrtenal attenuates diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats by stabilizing intrinsic antioxidants and modulating apoptotic and anti-apoptotic cascades. *Cellular Oncology*, 35(4):269-283.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils-a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2):446-475.
- Bakshi, H. A., Sam, S., Feroz, A., Ravesh, Z., Shah, G. A., Sharma, M., 2009. Crocin from Kashmiri saffron (*Crocus sativus*) induces *in vitro* and *in vivo* xenograft growth inhibition of Dalton's lymphoma (DLA) in mice. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 10(5):887-890.
- Balan, K. V., Prince, J., Han, Z., Dimas, K., Cladaras, M., Wyche, J. H., Sitaras, N.M., Pantazis, P., 2007. Antiproliferative activity and induction of apoptosis in human colon cancer cells treated *in vitro* with constituents of a product derived from *Pistacia lentiscus* L. var. chia. *Phytomedicine*, 14(4):263-272.
- Balsat, M., Cornillon, J., 2011. Inhibiteurs de mTOR : de l'explication biologique à l'application thérapeutique en hématologie. *Bulletin du Cancer*, 98(8):935-943.
- Banerjee, S., Kaseb, A.O., Wang, Z., Kong, D., Mohammad, M., Padhye, S., Mohammad, R.M., 2009. Antitumor activity of gemcitabine and oxaliplatin is augmented by thymoquinone in pancreatic cancer. *Cancer Research*, 69(13):5575-5583.
- Bao, F., Qiu, J., Zhang, H., 2012. Potential role of β -elemene on histone H1 in the H22 ascites hepatoma cell line. *Molecular Medicine Reports*, 6(1):185-190.
- Baudoux, D., 2010. Cahiers pratiques d'aromathérapie selon l'école Française, Grossesse. Editions Inspir, 5:250.
- Bawarski, W. E., Chidlow, E., Bharali, D. J., Mousa, S. A., 2008. Emerging nanopharmaceuticals. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 4(4), 273-282.
-

- Bayala, B., Bassole, I. H., Scifo, R., Gnoula, C., Morel, L., Lobaccaro, J. M.A., Simpore, J., 2014. Anticancer activity of essential oils and their chemical components. A Review. *American Journal of Cancer Research*, 4(6):591-607.
- Bazargani, Y.T., Almasirad, A., Amin, G., Shafiee, A., 2006. Chemical composition of the essential oils of *Astrodaucus persicus* (Boiss.) Drude root, stem/leaves and flowers/fruits. *Flavour and fragrance journal*, 21(2):294-296.
- Béliveau, R., Gingras, D., 2007. Role of nutrition in preventing cancer. *Canadian Family Physician*, 53(11):1905-1911.
- Bellakhdar, J., 1997. *La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires*. Edition le Fennec et Ibis Press.
- Bellakhdar, J., 2006. *Plantes médicinales au Maghreb et soins de base. Précis de phytothérapie moderne*. Editions Le Fennec, pp. 320.
- Bellakhdar, J., Claisse, R., Fleurentin, J., Younos, C., 1991. Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoeia. *Journal of Ethnopharmacology*, 35 (2):123-143.
- Bellakhdar, J., Idrissi, A.L., Canigüeral, S., Iglesias, J., Vila, R., 1994. Composition of lemon verbena (*Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton) oil of Moroccan origin. *Journal of Essential Oil Research*, 6(5):523-526.
- Berliocchi, L., Ciociaro, A., Russo, R., Cassiano, M. G.V., Blandini, F., Rotiroti, D., Morrone, L. A., Corasaniti, M. T., 2011. Toxic profile of bergamot essential oil on survival and proliferation of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Food and Chemical Toxicology*, 49(11):2780-2792.
- Berthoud, C. L., 2013. *Tisanes : guide pratique pour toute la famille. Les clefs de la naturopathie*. Editions Jouvence.
- Bettaieb, A., 2009. *Mécanismes d'induction de l'apoptose par le choc thermique et effet protecteur de la thermotolérance induite à 40° C*. Thèse de doctorat d'université du Québec à Montréal.
- Bhandari, M. S., Mazumder, A., Vesole, D. H., 2007. Liver involvement in multiple myeloma. *Clinical Lymphoma and Myeloma*, 7(8):538-540.
- Biglari, F., AlKarkhi, A. F., Easa, A. M., 2008. Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran. *Food chemistry*, 107(4):1636-1641.
- Bishayee, A., Politis, T., Darvesh, A.S., 2010. Resveratrol in the chemoprevention and treatment of hepatocellular carcinoma. *Cancer Treatment Reviews*, 36(1):43-53.
- Blasco, H., 2008. *Facteurs pharmacocinétiques et variabilité de réponse aux médicaments utilisés dans le traitement des lymphomes*. Thèse de doctorat d'université de Toulouse.
- Bonnafous, C., 2013. *Traité scientifique. Aromathérapie. Aromatologie et aromacologie*. Editions Dangles.
- Botrel, A., 2001. *Encyclopédie des plantes médicinales*. Edition Larousse. France, pp 228.
- Bourbeau, V., 2016. *Traitement du cancer : la force de la médecine intégrative : médecine moderne et naturopathie*. <https://maisonjacynthec.ca/fr/blog/cancer-et-naturopathie/>
- Bouyahya, A., Abrini, J., Bakri, Y., Dakka, N., 2016. Les huiles essentielles comme agents anticancéreux : actualité sur le mode d'action. *Phytothérapie*, 1-14.
-

- Bozzuto, G., Colone, M., Toccaceli, L., Stringaro, A., Molinari, A., 2011. Tea tree oil might combat melanoma. *Planta Medica*, 77(1):54-56.
- Brahmi, S.A., El M'rabet, F.Z., Benbrahim, Z., Akesbi, Y., Amine, B., Nejjari, C., El Mesbahi, O., 2011. Complementary medicine use among Moroccan patients with cancer: a descriptive study. *Pan African Medical Journal*, 10:36.
- Brand-Williams W., Cuvelier, M. E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1):25-30.
- Bray, F., Ren, J.S., Masuyer, E., Ferlay, J., 2013. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *International Journal of Cancer*, 132(5):1133-1145.
- Brown, M., Cohen, J., Arun, P., Chen, Z., Waes, C.V., 2008. NF- κ B in carcinoma therapy and prevention. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 12(9):1109-1122.
- Bruni, R., Medici, A., Andreotti, E., Fantin, C., Muzzoli, M., Dehesa, M., Sacchetti, G., 2004. Chemical composition and biological activities of Isphingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food Chemistry*, 85(3):415-421.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3):223-253.
- Cao, S., Yu, Y., Wen, H., Singletary, K. W., 2001. Studies on anti-mammary cancer activity of rosemary extract and its antioxidative constituents. [Ying yang xue bao] *Acta nutrimenta Sinica*, 23(3):225-229.
- Cardozo, M.T., de Conti, A., Ong, T.P., Scolastici, C., Purgatto, E., Horst, M.A., Moreno, F.S., 2011. Chemopreventive effects of β -ionone and geraniol during rat hepatocarcinogenesis promotion: distinct actions on cell proliferation, apoptosis, HMGCoA reductase, and RhoA. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 22(2):130-135.
- Carnesecchi, S., Langley, K., Exinger, F., Gosse, F., Raul, F., 2002. Geraniol, a component of plant essential oils, sensitizes human colonic cancer cells to 5-Fluorouracil treatment. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 301(2):625-630.
- Caron, J., 2011. Conception de nouveaux bioconjugués « squalénisés » anticancéreux dotés de propriétés d'auto-assemblage : synthèse, caractérisation des nanoparticules et évaluation biologique. Thèse de doctorat d'université. Paris Sud-Paris XI.
- Castedo, M., Perfettini, J.L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R., Kroemer, G., 2004. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*, 23(16):2825-2837.
- Catalan, C.A.N., De Lampasona, M.E.P., 2002. The Chemistry of the genus *Lippia* (Verbenaceae). In S.E. Kintzios. Ed. *Oregano, The genera origanum and Lippia*. Taylor and Francis, London, 1:127-149.
- Cavaliere, E., Bergamini, C., Mariotto, S., Leoni, S., Perbellini, L., Darra, E., Lenaz, G., 2009. Involvement of mitochondrial permeability transition pore opening in α -bisabolol induced apoptosis. *The FEBS Journal*, 276(15):3990-4000.
- Cavaliere, E., Rigo, A., Bonifacio, M., de Prati, A.C., Guardalben, E., Bergamini, C., Fato, R., Pizzolo, G., Suzuki, H., Vinante, F., 2011. Pro-apoptotic activity of α -bisabolol in preclinical models of primary human acute leukemia cells. *Journal of Translational Medicine*, 9(1):45.

- Cha, J. D., Moon, S. E., Kim, H. Y., Cha, I. H., Lee, K. Y., 2009. Essential oil of *Artemisia capillaris* induces apoptosis in KB Cells via mitochondrial stress and caspase activation mediated by MAPK-stimulated signaling pathway. *Journal of Food Science*, 74(9):T75-T81.
- Chabner, B.A., Roberts, T.G.J., 2005. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews Cancer*, 5(1):65-72.
- Chang, C.C., Hsu, H.F., Huang, K.H., Wu, J.M., Kuo, S.M., Ling, X.H., Houng, J.Y., 2014. Anti-proliferative effects of *Siegesbeckia orientalis* ethanol extract on human endometrial RL-95 cancer cells. *Molecules*, 19(12):19980-19994.
- Chang, H.T., Hsu, S.S., Chou, C.T., Cheng, J.S., Wang, J.L., Lin, K.L., Pan, C.C., 2011. Effect of thymol on Ca²⁺ homeostasis and viability in MG63 human osteosarcoma cells. *Pharmacology*, 88(3-4):201-212.
- Chaudhary, S.C., Siddiqui, M.S., Athar, M., Alam, M.S., 2012. D-Limonene modulates inflammation, oxidative stress and Ras-ERK pathway to inhibit murine skin tumorigenesis. *Human and Experimental Toxicology*, 31(8):798-811.
- Chauvergne, J., Hoerni, B., 1992. Chimiothérapie anticancéreuse. 2ème édition. Masson, Paris, France. p.97.
- Chauvergne, J., Hoerni, B., 2001. Chimiothérapie anticancéreuse. Elsevier Masson. 4ème édition. p.116.
- Chemat, F., Abert-Vian, M., Fernandez, X., 2012. Microwave-assisted extraction of essential oils and aromas. In *Microwave-assisted extraction for bioactive compounds: theory and practice*. Springer, New York, p.53-66.
- Chen, W., Lu, Y., Wu, J., Gao, M., Wang, A., Xu, B., 2011. Beta-elemene inhibits melanoma growth and metastasis via suppressing vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 67(4):799-808.
- Chen, Y., Zhou, C., Ge, Z., Liu, Y., Feng, W., Li, S., Chen, G., Wei, T., 2013. Composition and potential anticancer activities of essential oils obtained from myrrh and frankincense. *Oncology Letters*, 6(4):1140-1146.
- Cheng, E.H., Wei, M.C., Weiler, S., Flavell, R.A., Mak, T.W., Lindsten, T., Korsmeyer, S.J., 2001. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Molecular cell*, 8(3):705-711.
- Chidambara Murthy, K.N., Jayaprakasha, G.K., Patil, B.S., 2012. D-limonene rich volatile oil from blood oranges inhibits angiogenesis, metastasis and cell death in human colon cancer cells. *Life Sciences*, 91(11-12):429-439.
- Choi, I. Y., Lim, J. H., Hwang, S., Lee, J. C., Cho, G. S., Kim, W. K., 2010. Anti-ischemic and anti-inflammatory activity of (S)-cis-verbenol. *Free Radical Research*, 44(5):541-551.
- Chou, T.C., Talalay, P., 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in enzyme regulation*, 22:27-55.
- Collins, R. J., Harmon, B. V., Souvlis, T., Pope, J. H., Kerr, J. F. R., 1991. Effects of cycloheximide on B-chronic lymphocytic leukaemic and normal lymphocytes *in vitro*: induction of apoptosis. *British Journal of Cancer*, 64(3):518-522.
- Cory, S., Huang, D. C., Adams, J. M., 2003. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*, 22(53):8590-8607.
-

- Courtois, G., and Gilmore, T.D., 2006. Mutations in the NF- κ B signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene*, 25(51):6831-6843.
- Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warmington, J. R., Wyllie, S. G., 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of applied microbiology*, 88(1):170-175.
- Cristani, M., D'Arrigo, M., Mandalari, G., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Micieli, D., Trombetta, D. 2007. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(15):6300-6308.
- Da Rocha, M.S., Dodmane, P.R., Arnold, L.L., Pennington, K.L., Anwar, M.M., Adams, B.R., Taylor, S.V., Wermes, C., Adams, T.B., Cohen, S.M., 2012. Mode of action of pulegone on the urinary bladder of F344 rats. *Toxicological Sciences*, 128(1):1-8.
- Danino, O., Gottlieb, H. E., Grossman, S., Bergman, M., 2009. Antioxidant activity of 1, 3-dicaffeoylquinic acid isolated from *Inula viscosa*. *Food research international*, 42(9):1273-1280.
- Darra, E., Abdel-Azeim, S., Manara, A., Shoji, K., Maréchal, J.D., Mariotto, S., Crimi, M., 2008. Insight into the apoptosis-inducing action of α -bisabolol towards malignant tumor cells: involvement of lipid rafts and Bid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476(2):113-123.
- De Cremoux, P., 2011. Hormonothérapie des cancers du sein. *Bulletin du cancer*, 98(11):1311-1319.
- De Martino, L., D'Arena, G., Minervini, M. M., Deaglio, S., Sinisi, N. P., Cascavilla, N., De Feo, V., 2011. Active Caspase-3 detection to evaluate apoptosis induced by *Verbena officinalis* essential oil and citral in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(5):869-873.
- De Martino, L., D'Arena, G., Minervini, M.M., Deaglio, S., Fusco, B.M., Cascavilla, N., De Feo, V., 2009. *Verbena officinalis* essential oil and its component citral as apoptotic-inducing agent in chronic lymphocytic leukemia. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 22(4):1097-1104.
- Deb, D.D., Parimala, G., Devi, S.S., Chakraborty, T., 2011. Effect of thymol on peripheral blood mononuclear cell PBMC and acute promyelotic cancer cell line HL-60. *Chemico-Biological Interactions*, 193(1):97-106.
- Depoërs, P., Ledoux, F., Meurin, P., 2002. La phytothérapie entre science et tradition. Editions Amyris & Inspir. Bruxelles, Belgique, p.7.
- Desai, N., Trieu, V., Yao, Z., Louie, L., Ci, S., Yang, A., Noker, P., 2006. Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with cremophor-based paclitaxel. *Clinical Cancer Research*, 12(4):1317-1324.
- De Sá Júnior, P. L., Câmara, D. A., Costa, A. S., Ruiz, J. L., Levy, D., Azevedo, R. A., Pasqualoto, K.F., de Oliveira, C.F., de Melo, T.C., Pessoa, N.D., Fonseca, P.M., Pereira, A., Araldi, R.P., Ferreira, A.K., 2016. Apoptotic effect of eugenol involves G2/M phase abrogation accompanied by mitochondrial damage and clastogenic effect on cancer cell *in vitro*. *Phytomedicine*, 23(7):725-735.
- Descôteaux, C., 2013. Développement de nouveaux composés anticancéreux pour le traitement des cancers féminins. Thèse de doctorat de l'université du Québec à Trois-Rivières.
- Doherty, B., Lawlor, D., Gillet, J.P., Gottesman, M., O'Leary, J.J., Stordal, B., 2014. Collateral sensitivity to cisplatin in KB-8-5-11 drug-resistant cancer cells. *Anticancer Research*, 34(1):503-507.
-

- Döll-Boscardin, P.M., Sartoratto, A., Lameiro de Noronha Sales Maia, B. H., Padilha de Paula, J., Nakashima, T., Vitor Farago, P., Cristine Kanunfre, C., 2012. In vitro cytotoxic potential of essential oils of *Eucalyptus benthamii* and its related terpenes on tumor cell lines. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2012 (2012):342652, 8 pages.
- Dorman, H. J. D., Deans, S. G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology, 88(2):308-316.
- Dudai, N., Weinstein, Y., Krup, M., Rabinski, T., Ofir, R., 2005. Citral is a new inducer of caspase-3 in tumor cell lines. Planta Medica, 71(5):484-488.
- Edinger, A.L., Thompson, C.B., 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy, Current Opinion Cell Biology, 16(6):663-669.
- Eisenberg-Lerner, A., Bialik, S., Simon, H.U., Kimchi, A., 2009. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. Cell Death and Differentiation, 16(7):966-975.
- El Babili, F., Bouajila, J., Fouraste, I., Valentin, A., Mauret, S., Moulis, C., 2010. Chemical study, antimalarial and antioxidant activities, and cytotoxicity to human breast cancer cells (MCF7) of *Argania spinosa*. Phytomedicine, 17(2):157-160.
- El Babili, F., Bouajila, J., Souchard, J.P., Bertrand, C., Bellvert, F., Fouraste, I., Moulis, C., Valentin, A., 2011. Oregano: chemical analysis and evaluation of its antimalarial, antioxidant, and cytotoxic activities. Journal of Food Science, 76(3):C512-C518.
- El Beghdadi, M., 1991. Pharmacopée traditionnelle du Maroc. Les plantes médicinales et les affections du système cardio-vasculaire. Thèse de doctorat en pharmacie. Faculté de médecine et de pharmacie de Rabat.
- Elahy, M., Dass, C. R., 2011. Dz13: c-Jun Downregulation and Tumour Cell Death. Chemical biology & drug design, 78(6):909-912.
- El Hawary, S. S., Yousif, M. F., Motaal, A. A. A., Abd-Hameed, L. M., 2012. Bioactivities, phenolic compounds and *in-vitro* propagation of *Lippia citriodora* Kunth cultivated in Egypt. Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University, 50(1):1-6.
- Epifano, F., Genovese, S., Menghini, L., Curini, M., 2007. Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. Phytochemistry, 68(7):939-953.
- Evan, G., Littlewood, T., 1998. A matter of life and cell death. Science, 281(5381):1317-1322.
- Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., Henson, P. M., 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. Journal of Immunology, 148(7):2207-2216.
- Farnsworth, N.R., Kaas, C.J., 1981. An approach utilizing information from traditional medicine to identify tumor-inhibiting plants. Journal of Ethnopharmacology, 3(1):85-99.
- Fauchère, J.L., Avril, J.L., 2002. Bactériologie générale et médicale. Ellipses Editions Paris, p.365.
- Faure, S., 2015. Thérapies ciblées anticancéreuses (1/2). Actualités Pharmaceutiques, 54(546):57-61.
- Fedi, P., Tronick, S.R., Aaronson, S.A., 1997. In: Holland, J.F., Bast, R.C., Morton, D.L., Frei, E., Kufe, D., Weichselbaum, R.R., editions. Growth factors in cancer medicine. Baltimore: NIH Edition.
-

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F., 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5):E359-386.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F., 2013. Cancer incidence and mortality worldwide: GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase N°11. International Agency for Research on Cancer: Lyon, France.

Fimia, G.M., Piacentini, M., 2010. Regulation of autophagy in mammals and its interplay with apoptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(10):1581-1588.

Fleurentin, J., Weniger, B., Bourdy, G., 2011. Traditions thérapeutiques et médecine de demain: Les enjeux de l'ethnopharmacologie. Editions Ouest-France.

Fleurentin, J., 2016. Du bon usage des plantes qui soignent. Editions Ouest-France, p.16.

Fleurentin, J., 2016. Du bon usage des plantes qui soignent. Editions Ouest-France, pp.192-193.

Formand, D., 1999. Meat and cancer: a relation in search of a mechanism. *The Lancet*, 353(9154):686-687.

Forsen, E.A, Ross, M. E., 1994. Daunoxome® Treatment of Solid Tumors: preclinical and clinical investigations. *Journal of Liposome Research*, 4(1):481-512.

Franchomme, P., 1981. L'aromatologie à visée anti-infectieuse. *Phytomédecine*, 1(2):25-47.

Franchomme, P., Jollois, R., Péroël, D., 2004. L'aromathérapie exactement. Editions Roger Jollois, pp.394.

Fridman, J.S., Lowe, S.W., 2003. Control of apoptosis by p53. *Oncogene*, 22(56):9030-9040.

Friedrich, H., 1975. Phenylpropanoid constituents of essential oils. *Lloydia*, 39(1):1-7.

Gaascht, F., Teiten, M.H., Schumacher, M., Dicato, M., Diederich, M., 2010. Approche végétale dans le traitement des leucémies. *Correspondances en Onco-hématologie*, 102:8.

Gaascht, F.J.A., 2013. Découverte, identification et caractérisation de molécules d'origine naturelle capables de cibler les voies de transduction, de prolifération, d'inflammation et de mort cellulaire dans des cellules cancéreuses. Thèse de doctorat de l'université de Lorraine.

Garanger, E., 2005. Conception, synthèse et caractérisation de nouveaux systèmes de guidage et de vectorisation pour la cancérologie. Thèse de doctorat d'université. Grenoble I.

Gärtner, C., Stahl, W., Sies, H., 1997. Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 66(1):116-122.

Gately, S., Twardowski, P., Stack, M.S., Cundiff, D. L., Grella, D., Castellino, F. J., Volpert, O., 1997. The mechanism of cancer-mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin. *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA*, 94(20):10868-10872.

Gaudio, E., Palamarchuk, A., Palumbo, T., Trapasso, F., Pekarsky, Y., Croce, C.M., Aqeilan, R.I., 2006. Physical association with WWOX suppresses c-Jun transcriptional activity. *Cancer research* 66(24):11585-11589.

- GBD, 2016. Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet*, 388 (10053):1659-1724.
- Geran, R. I., Greenberg, N. H., MacDonald, M. M., Schumacher, A. M., Abbott, B. J., 1972. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. *Cancer Chemotherapy Reports*, 3(2):59-61.
- Gerber, D.E., 2008. Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. *American family physician*, 77(3):311-319.
- Ghani, R. M. A., & Ibrahim, A. T. A., 2013. The effect of aromatherapy inhalation on nausea and vomiting in early pregnancy: a pilot randomized controlled trial. *Journal of Natural Sciences Research*, 3(6):10-22.
- Gill, P. S., Espina, B. M., Muggia, F., Cabriales, S., Tulpule, A., Esplin, J.A., Levine, A.M., 1995. Phase I/II clinical and pharmacokinetic evaluation of liposomal daunorubicin. *Journal of Clinical Oncology*, 13(4):996-1003.
- Giraud, A.M., 2016a. *Cancer. Chemin de guérison pour la vie*. Editions Quintessence. p.22.
- Giraud, A.M., 2016b. *Huiles essentielles et cancer. Approche thérapeutique innovante et naturelle*. Editions Quintessence. p.43.
- Giraud, A.M., 2016b. *Huiles essentielles et cancer. Approche thérapeutique innovante et naturelle*. Editions Quintessence. p.50-51.
- Giraud, A.M., 2016b. *Huiles essentielles et cancer. Approche thérapeutique innovante et naturelle*. Editions Quintessence. p.77-87.
- Gligorov, J., 2012. *Polymorphismes et traitements néoadjuvants des cancers du sein : Efficacité du docétaxel et polymorphisme d'ABCB1/MDR1*. Thèse de doctorat d'université Pierre et Marie curie-Paris VI.
- Golstein, P., Kroemer, G., 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1):37-43.
- Gueldner, R. C., Wilson, D. M., Heidt, A. R., 1985. Volatile compounds inhibiting *Aspergillus flavus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33(3):411-413.
- Guinoiseau, E., Luciani, A., Rossi, P. G., Quilichini, Y., Ternengo, S., Bradesi, P., Berti, L., 2010. Cellular effects induced by *Inula graveolens* and *Santolina corsica* essential oils on *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 29(7):873-879.
- Häcker, G., Kirschnek, S., Fischer, S. F., 2006. Apoptosis in infectious disease: how bacteria interfere with the apoptotic apparatus. *Medical Microbiology and Immunology*, 195(1):11-19.
- Hajdu, S.I., 2005. 2000 years of chemotherapy of tumors. *Cancer*, 103(6):1097-1102.
- Hanahan, D., Folkman, J., 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86 (3):353-364.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1):57-70.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5):646-674.
- Hantraye, B., 2012. *Les thérapies ciblées par voie orale dans la prise en charge du cancer du rein métastatique : importance du lien ville / hôpital pour le patient dans la gestion de son traitement et des effets secondaires. Exemple de l'Institut de Cancérologie de l'Ouest Paul Papin*. Thèse de doctorat en pharmacie. Angers.
-

- Harris, C.C., 1996. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *Journal of the National Cancer Institute*, 88(20):1442-1455.
- Hartmann, T., 2007. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 68(22):2831-2846.
- Hassan, M., Watari, H., AbuAlmaaty, A., Ohba, Y., Sakuragi, N., 2014. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *BioMed Research International*, 2014(2014):1-23.
- Hawary, S. E., Yousif, M., Motaal, A. A., Hameed, L. A. E., 2011. Composition and bioactivities of the essential oil from leaves of *Lippia citriodora* Kunth cultivated in Egypt. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 1(2), 112-119.
- He, Q., Venant, N., 2004. Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. *Journal of Zhejiang University-Science A*, 5(6):676-683.
- Henshall, D.C., Bonislowski, D.P., Skradski, S.L., Araki, T., Lan, J.Q., Schindler, C.K., Meller, R., Simon, R.P., 2001. Formation of the Apaf-1/cytochrome c complex precedes activation of caspase-9 during seizure-induced neuronal death. *Cell Death and Differentiation*, 8(12):1169-1181.
- Hmamouchi, M., 2001. Les plantes médicinales et aromatiques marocaines. 2ème édition.
- Hochstrasser, M., 2009. Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature*, 458(7237):422-429.
- Holy, J.M., 2002. Curcumin disrupts mitotic spindle structure and induces micronucleation in MCF-7 breast cancer cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 518(1):71-84.
- Hontaas, A., 2014. Prise en charge des patients cancéreux à l'officine. Thèse de doctorat en pharmacie. Toulouse.
- Hornero-Méndez, D., Mínguez-Mosquera, M.I., 2007. Bioaccessibility of carotenes from carrots: Effect of cooking and addition of oil. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(3):407-412.
- Horváthová, E., Kozics, K., Srančíková, A., Hunáková, L., Gálová, E., Ševčovičová, A., Slameňová, D., 2012. Borneol administration protects primary rat hepatocytes against exogenous oxidative DNA damage. *Mutagenesis*, 27(5):581-588.
- Hsu, S.S., Lin, K.L., Chou, C.T., Chiang, A.J., Liang, W.Z., Chang, H.T., Chen, I.S., 2011. Effect of thymol on Ca²⁺ homeostasis and viability in human glioblastoma cells. *European Journal of Pharmacology*, 670(1):85-91.
- Huet, M., 2012. De l'usage raisonné des plantes médicinales chez les malades atteints de cancers : synthèse bibliographique et réflexions. Thèse de doctorat en pharmacie, Université de Rennes.
- Huet, M., Fleurentin, J., 2013. Curcuma, thé vert et chardon-marie : quelle stratégie adopter en prévention du cancer ou en complément des traitements ?. *Hegel*, 3(4).
- Hussain, A., Brahmabhatt, K., Priyani, A., Ahmed, M., Rizvi, T.A., Sharma, C., 2011. Eugenol enhances the chemotherapeutic potential of gemcitabine and induces anticarcinogenic and anti-inflammatory activity in human cervical cancer cells. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 26(5):519-527.
- Institut national du cancer, Société française de pathologie. Compte rendu-fiche standardisé en pathologie cancérologique : Micro et macrobiopsies mammaires. 2007.
- Ireland, D.J., Greay, S.J., Hooper, C.M., Kissick, H.T., Fillion, P., Riley, T.V, Beilharz, M.W., 2012. Topically applied *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil causes direct anti-cancer cytotoxicity in subcutaneous tumour bearing mice. *Journal of Dermatological Science*, 67(2):120-129.
- Iserin, P., 2001. Encyclopédie des plantes médicinales, identification, préparation, soins. Edition Larousse 68:15-16.

- Ivanga, M. 2006. Analyse du profil de l'expression génique, par l'estradiol et la dihydrotestostérone, dans l'utérus de souris (Doctoral dissertation, Université Laval).
- Jaafari, A., Tilaoui, M., Mouse, H.A, M'barek, L.A, Aboufatima, R., Chait, A., Ziad, A., 2012. Comparative study of the antitumor effect of natural monoterpenes: relationship to cell cycle analysis. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 22(3):534-540.
- Jaganathan, S.K., Supriyanto, E., 2012. Antiproliferative and molecular mechanism of eugenol-induced apoptosis in cancer cells. *Molecules*, 17(6):6290-6304.
- Jaouad, L., 1992. Enquête ethnobotanique : la part de la médecine traditionnelle dans les différentes couches socio-économiques de la population de Casablanca. Thèse de doctorat en pharmacie. Faculté de médecine et de pharmacie de Rabat.
- Jegajeevanram, P., Alhaji, N.M.I., Velavan, S., 2014. Identification of insecticidal components of Mango Ginger rhizome and *Tagetes erecta* flower extracts by GC-MS analysis. *International Journal of Chemical and Pharmaceutical Analysis*, 1(4):203-207.
- Jiang, K., Zhang, T., Yin, N., Ma, X., Zhao, G., Wu, H., Qiu, C., Deng, G., 2017. Geraniol alleviates LPS-induced acute lung injury in mice via inhibiting inflammation and apoptosis. *Oncotarget*, 8(41):71038-71053.
- Jirovetz, L., Eller, G., Buchbauer, G., Pandali, S.G., 2006. Chemical composition, antimicrobial activities and odor descriptions of some essential oils with characteristic floral-rosy scent and of their principal aroma compounds. Pandalai, S. G. (Ed.). *Recent Research Developments in Agronomy & Horticulture*, 2:1-12.
- Junghanns, J.U.A., Müller, R. H., 2008. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *International Journal of Nanomedicine*, 3(3):295-310.
- Kabbaj, F., Meddah, B., Cherrah, Y. Faouzi, E., 2012. Ethnopharmacological profile of traditional plants used in Morocco by cancer patients as herbal therapeutics. *Phytopharmacology*, 2(2) 243-256.
- Kar, A., 2007. *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology (Revised-expanded second edition)*. New age international limited publishers New Delhi, p. 332-600.
- Karin, M., 2006. Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. *Nature*, 441(7092):431-436.
- Kathirvel, P., Ravi, S., 2012. Chemical composition of the essential oil from basil (*Ocimum basilicum* Linn.) and its in vitro cytotoxicity against HeLa and HEP-2 human cancer cell lines and NIH 3T3 mouse embryonic fibroblasts. *Natural Product Research*, 26(12):1112-1118.
- Kaur, G., Athar, M., Alam, M.S., 2010. Eugenol precludes cutaneous chemical carcinogenesis in mouse by preventing oxidative stress and inflammation and by inducing apoptosis. *Molecular Carcinogenesis*, 49(3):290-301.
- Keats, J.J., Fonseca, R., Chesi, M., Schop, R., Baker, A., Chng, W.J., Van Wier, S., Tiedemann, R., Shi, C.X., Sebag, M., Braggio, E., et al., 2007. Promiscuous mutations activate the noncanonical NF- κ B pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell*, 12(2):131-144.
- Kedare, S. B., Singh, R. P., 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4):412-422.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4):239-257.
- Khurana, S., Dubey, M. L., Malla, N., 2005. Association of parasitic infections and cancers. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 23(2):74-79.
- Kiessling, R., Wasserman, K., Horiguchi, S., Kono, K., Sjöberg, J., Pisa, P., Petersson, M., 1999. Tumor-induced immune dysfunction. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 48(7):353-362.
-

- Kim, E. C., Min, J. K., Kim, T. Y., Lee, S. J., Yang, H. O., Han, S., Kim, Y.M., Kwon, Y. G., 2005. [6]-Gingerol, a pungent ingredient of ginger, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 335(2):300-308.
- Kim, S.H., Bae, H.C., Park, E.J., Lee, C.R., Kim, B.J., Lee, S., Park, H.H., Kim, S.J., So, I., Kim, T.W., Jeon, J.H., 2011. Geraniol inhibits prostate cancer growth by targeting cell cycle and apoptosis pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 407(1):129-134.
- Kim, S.H., Park, E.J., Lee, C.R., Chun, J.N., Cho, N.H., Kim, I.G., Jeon, J.H., 2012. Geraniol induces cooperative interaction of apoptosis and autophagy to elicit cell death in PC-3 prostate cancer cells. *International Journal of Oncology*, 40(5):1683-1690.
- Kimbaris, A.C., Siatas, N.G., Daferera, D.J., Tarantilis, P. A., Pappas, C. S., Polissiou, M. G., 2006. Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). *Ultrasonics Sonochemistry*, 13(1):54-60.
- King, C. H., 2006. Long-term outcomes of school-based treatment for control of urinary schistosomiasis: a review of experience in Coast Province, Kenya. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(11):299-306.
- Kirsh, V.A., Peters, U., Mayne, S.T., Subar, A.F., Chatterjee, N., Johnson, C.C., Hayes, R.B., 2007. Prospective study of fruit and vegetable intake and risk of prostate cancer. *Journal of Natural Cancer Institute*, 99(15):1200-1209.
- Kloover, J. S., den Bakker, M. A., Gelderblom, H., Van Meerbeeck, J. P., 2004. Fatal outcome of a hypersensitivity reaction to paclitaxel: a critical review of premedication regimens. *British Journal of Cancer*, 90(2):304-305.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., Hengartner, M., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M.E., Tschoopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G., 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death and Differentiation*, 16(1):3-11.
- Lacave, R., Larsen, C.J., Robert, J., 2005. *Cancérologie fondamentale*. John Libbey Eurotext. p.438.
- Lahiaoui, S., 2016. *Médecine complémentaire en oncologie*. Thèse de doctorat en médecine. Faculté de médecine et de pharmacie de Marrakech.
- Lam, S. K., Ng, T. B., 2009. A protein with antiproliferative, antifungal and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from caper (*Capparis spinosa*) seeds. *Phytomedicine*, 16(5):444-450.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., Nychas, G. J., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3):453-462.
- Langenheim, J.H., 1994. Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology*, 20(6):1223-1280.
- Laverdet, B., 2013. *Physiopathologie du pancréas : Rôle de l'inflammation dans la cancérogenèse du pancréas exocrine*. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Limoges.
- Lavie, D., Glotter, E., Shvo, Y., 1963. Terpenoids-I: Oxidation of ring a in euphol. *Tetrahedron*, 19(9):1377-1385.
- Lechat, P., Lagier, G., Rouveix, B., Vincens, M., Weber, S., 1982. *Pharmacologie médicale*. Edition Masson (Paris), p.764.
- Leenman, E. E., 2007. Current views of the histogenesis and pathogenesis of Hodgkin lymphoma. *Arkhiv Patologii*, 69(5):7-11.
-

- Legault, J., Pichette, A., 2007. Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59(12):1643-1647.
- Lehmann, H., 2013. Le médicament à base de plantes en Europe. Statut, enregistrement, contrôles. Thèse de doctorat d'université Strasbourg.
- Lenoir, L., 2011. Effet protecteur des polyphénols de la verveine odorante dans un modèle d'inflammation colique chez le rat. Thèse de doctorat d'université d'Auvergne-Clermont-Ferrand I.
- Lesser, M., 1990. La thérapie des vitamines et de l'alimentation : pour retrouver son équilibre. Collection Une approche holistique de la santé. Edition Terre vivante. p.222.
- Levine, B., Kroemer, G., 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132(1):27-42.
- Liang, W. Z., Chou, C. T., Hsu, S. S., Liao, W. C., Shieh, P., Kuo, D. H., Tseng, H.W., Kuo, C.C., Jan, C.R., 2015. The involvement of mitochondrial apoptotic pathway in eugenol-induced cell death in human glioblastoma cells. *Toxicology letters*, 232(1):122-132.
- Li, B., Cui, Y., Diehn, M., Li, R., 2017. Development and validation of an individualized immune prognostic signature in early-stage nonsquamous non-small cell lung cancer. *JAMA Oncology*, 3(11):1529-1537.
- Li, F., Rajendran, P., Sethi, G., 2010. Thymoquinone inhibits proliferation, induces apoptosis and chemosensitizes human multiple myeloma cells through suppression of signal transducer and activator of transcription 3 activation pathway. *British Journal of Pharmacology*, 161(3):541-554.
- Li, Q.Q., Wang, G., Zhang, M., Cuff, C.F., Huang, L., Reed, E., 2009. β -Elemene, a novel plant-derived antineoplastic agent, increases cisplatin chemosensitivity of lung tumor cells by triggering apoptosis. *Oncology Reports*, 22(1):161-170.
- Li, X., Wang, G., Zhao, J., Ding, H., Cunningham, C., Chen, F., Flynn, D.C., Reed, E., Li, Q.Q., 2005. Antiproliferative effect of beta-elemene in chemoresistant ovarian carcinoma cells is mediated through arrest of the cell cycle at the G2-M phase. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(7-8):894-904.
- Liang, W.Z., Lu, C.H., 2012. Carvacrol-induced $[Ca^{2+}]_i$ rise and apoptosis in human glioblastoma cells. *Life Sciences*, 90(17-18):703-711.
- Liotta, L.A., 1992. Cancer cell invasion and metastasis. *Scientific American*, 266(2):54-59.
- Liu, Y., Whelan, R.J., Pattnaik, B.R., Ludwig, K., Subudhi, E., Rowland H, Claussen, N., Zucker, N., Uppal, S., Kushner, D.M., Felder, M., Patankar, M.S., Kapur, A., 2012. Terpenoids from *Zingiber officinale* (Ginger) induce apoptosis in endometrial cancer cells through the activation of p53. *PLoS One*, 7(12):e53178.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4):402-408.
- Lowe, S.W., Lin, A.W., 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 21(3):485-495.
- Lu, J.J., Dang, Y.Y., Huang, M., Xu, W.S., Chen, X.P., Wang, Y.T., 2012. Anti-cancer properties of terpenoids isolated from *Rhizoma Curcumae*-a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 143(2):406-411.
- Lu, X.G., Zhan, L.B., Feng, B.A., Qu, M.Y., Yu, L.H., Xie, J.H., 2004. Inhibition of growth and metastasis of human gastric cancer implanted in nude mice by d-limonene. *World Journal of Gastroenterology*, 10(14):2140.
- Lv, M., Xu, H., 2011. Recent advances in semisynthesis, biosynthesis, biological activities, mode of action, and structure-activity relationship of podophyllotoxins: An update (2008-2010) Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 11(10):901-909.

- Mahassni, S. H., Al-Reemi, R. M., 2013. Apoptosis and necrosis of human breast cancer cells by an aqueous extract of garden cress (*Lepidium sativum*) seeds. Saudi Journal of Biological Sciences, 20(2): 131-139.
- Malvezzi, M., Bertuccio, P., Levi, F., La Vecchia, C., Negri, E., 2013. European cancer mortality predictions for the year 2013. Annals of Oncology, 24(3):792-800.
- Manikandan, P., Murugan, R.S., Priyadarsini, R.V., Vinothini, G., Nagini, S., 2010. Eugenol induces apoptosis and inhibits invasion and angiogenesis in a rat model of gastric carcinogenesis induced by MNNG. Life Sciences, 86(25):936-941.
- Manikandan, P., Vinothini, G., Priyadarsini, R.V., Prathiba, D., Nagini, S., 2011. Eugenol inhibits cell proliferation via NF- κ B suppression in a rat model of gastric carcinogenesis induced by MNNG. Investigational New Drugs. 29(1):110-117.
- Manjili, M.H., Wang, X.Y., Park, J., Macdonald, J.J., Li, Y., Van-Schie, C.A.A., Subjeck, J.R., 2002. Cancer immunotherapy: stress proteins and hyperthermia. International Journal of Hyperthermia, 18(6):506-520.
- Marin, M. C., Hsu, B., Meyn, R. E., Donehower, L. A., El-Naggar, A. K., McDonnell, T. J., 1994. Evidence that p53 and bcl-2 are regulators of a common cell death pathway important for *in vivo* lymphomagenesis. Oncogene, 9(11):3107-3112.
- Martin, S. J., Green, D. R., 1995. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts?. Cell, 82(3):349-352.
- Martins, A., Hajdú, Z., Vasas, A., Csupor-Löffler, B., Molnár, J., Hohmann, J., 2010. Spathulenol inhibit the human ABCB1 efflux pump. Planta medica, 76(12):608.
- Marwat, S. K., Khan, M. A., Khan, M. A., Akbari, A. H., Ahmad, M., Zafar, M., Ahmad, F., 2011. Medicinal and pharmacological potentiality of the plant at-tin-common Fig (*Ficus carica* L.). Asian Journal of Chemistry, 23(1):1-10.
- Maskarinec, G., 2009. Cancer protective properties of cocoa: a review of the epidemiologic evidence. Nutrition and Cancer, 61(5), 573-579.
- Masuda, T., Oyama, Y., Arata, T., Inaba, Y., Takeda, Y., 2002. Cytotoxic activity of quinone derivatives of phenolic diterpenes from sage (*Salvia officinalis*). ITE Letters on Batteries New Technologies and Medicine, 3(1):39-42.
- Menabde, G.T., Natroshvili, N.D., Natroshvili, T.D., 2006. Ozonotherapy for the treatment of parodontitis. Georgian Medical News, 134:43-46.
- Merghoub, N., 2011. Recherche de substances naturelles issues de plantes médicinales Marocaines capables d'inhiber la prolifération des cellules cancéreuses du col de l'utérus et étude de leurs mécanismes action. Thèse de doctorat d'université Rabat.
- Mesa Arango, A.C., Montiel Ramos, J., Zapata, B., Durán, C., Betancur-Galvis, L., Stashenko, E., 2009. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 104(6):878-884.
- Meyer, J.L., Verhey, J., Xia, P., Wong, J., 2007. New technologies in the radiotherapy clinic. Frontiers of Radiation Therapy and Oncology, 40:1-17.
- Miele, E., Spinelli, G. P., Miele, E., Tomao, F., Tomao, S., 2009. Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane® ABI-007) in the treatment of breast cancer. International Journal of Nanomedicine, 4:99-105.
- Mijatovic, S. A., Timotijevic, G. S., Miljkovic, D. M., Radovic, J. M., Maksimovic-Ivanic, D. D., Dekanski, D. P., Stosic-Grujicic, S. D., 2011. Multiple antimelanoma potential of dry olive leaf extract. International Journal of Cancer, 128(8):1955-1965.
-

- Mishra, B.B.T.S., Patel, B. B., Tiwari, S., 2010. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(1): 9-24.
- Mitoshi, M., Kuriyama, I., Nakayama, H., Miyazato, H., Sugimoto, K., Kobayashi, Y., Jippo, T., Kanazawa, K., Yoshida, H., Mizushima, Y., 2012. Effects of essential oils from herbal plants and citrus fruits on DNA polymerase inhibitory, cancer cell growth inhibitory, antiallergic, and antioxidant activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(45):11343-11350.
- Molassiotis, A., Fernandez-Ortega, P., Pud, D., Ozden, G., Scott, J.A., Panteli, V., Madsen, E., 2005. Use of complementary and alternative medicine in cancer patients: a European survey. *Annals of Oncology*, 16(4):655-663.
- Monassier, L., 2012. Les anticancéreux. *Pharmacologie DCEM3*. Strasbourg.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2):55-63.
- Mothana, R. A., Abdo, S. A., Hasson, S., Althawab, F., Alaghbari, S. A., Lindequist, U., 2010. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical screening of some Yemeni medicinal plants. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 7(3):323-330.
- Mottram, D., Wedzicha, B.L., Dodson, A.T., 2002. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*, 419(6906):448-449.
- Moubarak, R. S., Yuste, V. J., Artus, C., Bouharrou, A., Greer, P. A., Menissier-de Murcia, J., Susin, S. A., 2007. Sequential activation of poly (ADP-ribose) polymerase 1, calpains, and Bax is essential in apoptosis-inducing factor-mediated programmed necrosis. *Molecular and Cellular Biology*, 27(13):4844-4862.
- NCCLS/CLSI, 2002. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Clinical and Laboratory Standards Institute, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard. Eighth Edition, Document M27-A2, PA: Wayne, USA.
- Nelson, S., 2008. Comparative methylation hybridization. [cited 2014 Sep 7]; Available from: nature.com
- Newman, D.J., Cragg, G.M., 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 75(3):311-335.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M., 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, 66: 1022-1037.
- Ngo, C.V., Gee, M., Akhtar, N., Yu, D., Volpert, O., Auerbach, R., Thomas-Tikhonenko, A., 2000. An *in vivo* function for the transforming Myc protein: elicitation of the angiogenic phenotype. *Cell Growth and Differentiation*, 11(14):201-210.
- Nibret, E., Wink, M., 2010. Volatile components of four Ethiopian *Artemisia species* extracts and their *in vitro* antitrypanosomal and cytotoxic activities. *Phytomedicine*, 17(5):369-374.
- Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K., Tavernarakis, N., 2013. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1833(12):3448-3459.
- Nyman, D. W., Campbell, K. J., Hersh, E., Long, K., Richardson, K., Trieu, V., Von Hoff, D.D., 2005. Phase I and pharmacokinetics trial of ABI-007, a novel nanoparticle formulation of paclitaxel in patients with advanced nonhematologic malignancies. *Journal of Clinical Oncology*, 23(31):7785-7793.
- Ohno, T., Kita, M., Yamaoka, Y., Imamura, S., Yamamoto, T., Mitsufuji, S., Kodama, T., Kashima, K., Imanishi, J., 2003. Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 8(3):207-215.
-

- Oliveira, L. P., Pinheiro, R. C., Vieira, M. S., Paula, J. R., Bara, M. T. F., Valadares, M. C., 2010. Cytotoxic and antiangiogenic activities of *Punica granatum* L., Punicaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(2):201-207.
- Onawunmi, G. O., 1989. Evaluation of the antimicrobial activity of citral. *Letters in Applied Microbiology*, 9(3): 105-108.
- Oukerrou, M. A., Tilaoui, M., Mouse, A.H., Bouchmaa, N., Ziad, A., 2017. Differential cytotoxic activity of essential oil of *Lippia citriodora* from different regions in Morocco. *Chemistry & Biodiversity*, 14(7).
- Özek, T., Kirimer, N., Baser, K.H.C., Tümen, G., 1996. Composition of the essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton grown in Turkey. *Journal of Essential Oil Research*, 8(5):581-583.
- Page, C.P., Curtis, M., Walker, M., Hoffman, B., 2002. *Integrated Pharmacology*, Mosby, second Edition. p 688.
- Pal, D., Banerjee, S., Mukherjee, S., Roy, A., Panda, C.K., Das, S., 2010. Eugenol restricts DMBA croton oil induced skin carcinogenesis in mice: downregulation of c-Myc and H-ras, and activation of p53 dependent apoptotic pathway. *Journal of Dermatological Science*, 59(1):31-39.
- Pankey, G. A., Sabath, L. D., 2004. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clinical infectious diseases*, 38(6):864-870.
- Park, K.R., Nam, D., Yun, H.M., Lee, S.G., Jang, H.J., Sethi, G., Cho, S.K., Ahn, K.S., 2011. β -Caryophyllene oxide inhibits growth and induces apoptosis through the suppression of PI3K/AKT/mTOR/S6K1 pathways and ROS-mediated MAPKs activation. *Cancer Letters*, 312(2):178-188.
- Pascual, M. E., Slowing, K., Carretero, E., Mata, D. S., Villar, A., 2001. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of ethnopharmacology*, 76(3), 201-214.
- Pasquier, F., Moreau, A.S., Tricot, S., Wemeau, M., Facon, T., Leleu, X., 2006. Place actuelle des inhibiteurs du protéasome dans le traitement du myélome multiple. *Hématologie*. 12(1):67-76.
- Patel, P. B., Thakkar, V. R., 2014. L-carvone induces p53, caspase 3 mediated apoptosis and inhibits the migration of breast cancer cell lines. *Nutrition and Cancer*, 66(3):453-462.
- Paul, S., Étienne R., 2002. Immunothérapie génique du cancer. *Transfusion Clinique et Biologique*, 9(5-6):301-321.
- Pearson, A. S., Spitz, F. R., Swisher, S. G., Kataoka, M., Sarkiss, M. G., Meyn, R. E., McDonnell, T.J., Cristiano, R.J., Roth, J.A., 2000. Up-regulation of the proapoptotic mediators Bax and Bak after adenovirus-mediated p53 gene transfer in lung cancer cells. *Clinical Cancer Research*, 6(3):887-890.
- Pengelly, A., 2004. *The constituents of medicinal plants*. 2nd edition, Allen & Unwin, Sydney, Australia.
- Pepper, M.S., 1997. Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside. *Arteriosclerosis Thrombosis, and Vascular Biology*, 17(4):605-619.
- Perez-Tomas, R., 2006. Multidrug resistance: retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment. *Current Medicinal Chemistry*, 13(16):1859-1876.

- Piras, A., Rosa, A., Marongiu, B., Atzeri, A., Dessì, M.A., Falconieri, D., Porcedda, S., 2012. Extraction and separation of volatile and fixed oils from seeds of *Myristica fragrans* by supercritical CO₂: chemical composition and cytotoxic activity on Caco-2 cancer cells. *Journal of Food Science*, 77(4):C448-C453.
- Plummer, M., de Martel, C., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F., Franceschi, S., 2016. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *The Lancet Global Health*, 4(9):e609-e616.
- Popovici, C., Saykova, I., Tylkowski, B., 2010. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel*, 4:25-39.
- Proskuryakov, S.Y., Konoplyannikov, A.G., Gabai, V.L., 2003. Necrosis: a specific form of programmed cell death?. *Experimental Cell Research*, 283(1):1-16.
- Rai, N. K., Tripathi, K., Sharma, D., Shukla, V. K., 2005. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 4(3):138-144.
- Rajput, S., Kumar, B.N., Dey, K.K., Pal, I., Parekh, A., Mandal, M., 2013. Molecular targeting of Akt by thymoquinone promotes G1 arrest through translation inhibition of cyclin D1 and induces apoptosis in breast cancer cells. *Life Sciences*, 93(21):783-790.
- Raju, J., Patlolla, J. M., Swamy, M. V., Rao, C. V., 2004. Diosgenin, a steroid saponin of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek), inhibits azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in F344 rats and induces apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 13(8):1392-1398.
- Ray, R.B., Raychoudhuri, A., Steele, R., Nerurkar, P., 2010. Bitter melon (*Momordica charantia*) extract inhibits breast cancer cell proliferation by modulating cell cycle regulatory genes and promotes apoptosis. *Cancer Research*, 70(5):1925-1931.
- Rovere-Querini, P., Bruneui, S., Clementi, E., Manfredi, A. A., 2008. Cell death: tipping the balance of autoimmunity and tissue repair. *Current Pharmaceutical Design*, 14(3):269-277.
- Ruffa, M. J., Ferraro, G., Wagner, M. L., Calcagno, M. L., Campos, R. H., Cavallaro, L., 2002. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. *Journal of ethnopharmacology*, 79(3):335-339.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., Bruni, R., 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in food. *Food Chemistry*, 91(4):621-632.
- Sakuragi, N., Salah-eldin, A. E., Watari, H., Itoh, T., Inoue, S., Moriuchi, T., Fujimoto, S., 2002. Bax, Bcl-2, and p53 expression in endometrial cancer. *Gynecologic Oncology*, 86(3):288-296.
- Santos Gomes, P.C., Fernandes Ferreira, M., Vicente, A.M.S., 2005. Composition of the essential oils from flowers and leaves of vervain [*Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton] grown in Portugal. *Journal of Essential Oil Research*, 17(1):73-78.
- Santoyo, S., Caverro, S., Jaime, L., Ibanez, E., Senorans, F.J., Reglero, G., 2005. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of Food Protection*, 68(4):790-795.
- Sarkar, A., Bhattacharjee, S., Mandal, D. P., 2015. Induction of apoptosis by eugenol and capsaicin in human gastric cancer AGS cells: elucidating the role of p53. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(16):6753-6759.
-

Sarrazin, S.L.F., Oliveira, R.B., Barata, L.E.S., Mourão, R.H.V., 2012. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia grandis* Schauer (Verbenaceae) from the western Amazon. *Food Chemistry*, 34(3):1474-1478.

Sasco, A.J., 2008. Cancer and globalization. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 62(2):110-121.

Satooka, H., Kubo, I., 2012. Effects of thymol on B16-F10 melanoma cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(10):2746-2752.

Sawadogo, W.R., Schumacher, M., Teiten, M.H., Dicato, M., Diederich, M., 2012. Traditional West African pharmacopeia, plants and derived compounds for cancer therapy. *Biochemical Pharmacology*, 84(10):1225-1240.

Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L., Elazar, Z., 2007. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *The EMBO Journal*, 26(7):1749-1760.

Schorderet, M., Dayer, J.M., 1992. *Pharmacologie : Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques*. Editeur Frison-Roche, Slatkine, 932 pages.

Seal, S., Chatterjee, P., Bhattacharya, S., Pal, D., Dasgupta, S., Kundu, R., Mukherjee, S., Bhattacharya, S., Bhuyan, M., Bhattacharyya, P. R., Baishya, G., Barua, N. C., Baruah, P. K., Rao, P.G., Bhattacharya, S., 2012. Vapor of volatile oils from *Litsea cubeba* seed induces apoptosis and causes cell cycle arrest in lung cancer cells. *PLoS One*, 7(10):e47014.

Sedlak, T. W., Oltvai, Z. N., Yang, E., Wang, K., Boise, L. H., Thompson, C. B., Korsmeyer, S. J., 1995. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(17):7834-7838.

Ségala, G., 2012. *Cancer : les mécanismes biologiques*. Futura-Sciences.

Seki, T., Kokuryo, T., Yokoyama, Y., Suzuki, H., Itatsu, K., Nakagawa, A., Mizutani, T., Miyake, T., Uno, M., Yamauchi, K., Nagino, M., 2011. Antitumor effects of α -bisabolol against pancreatic cancer. *Cancer Science*, 102(12):2199-2205.

Sertel, S., Eichhorn, T., Plinkert, P.K., Efferth, T., 2011a. [Anticancer activity of *Salvia officinalis* essential oil against HNSCC cell line (UMSCC1)]. *HNO*, 59(12):1203-1208.

Sertel, S., Eichhorn, T., Plinkert, P.K., Efferth, T., 2011b. Cytotoxicity of *Thymus vulgaris* essential oil towards human oral cavity squamous cell carcinoma. *Anticancer Research*, 31(1):81-87.

Sethi, G., Ahn, K.S., Aggarwal, B.B., 2008. Targeting nuclear factor- κ B activation pathway by thymoquinone: role in suppression of antiapoptotic gene products and enhancement of apoptosis. *Molecular Cancer Research*, 6(6):1059-1070.

Sherbet, G.V., Lakshmi, M.S., 1997. *The genetics of cancer: genes associated with cancer invasion, metastasis, and cell proliferation*. San Diego: Academic Press.

Shi, Y., 2002. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular Cell*, 9(3):459-470.

Signalet, J., 2015. *L'alimentation ou la troisième médecine*. Nouvelle édition. Editions du Rocher Equilibre, pp.513

- Sikkema, J., De Bont, J. A., Poolman, B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, 59(2):201-222.
- Singh, R.P., and Agarwal, R., 2006. Mechanisms of action of novel agents for prostate cancer chemoprevention. *Endocrine-Related Cancer*, 13(3):751-778.
- Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T., Arsenakis, M., 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(5):1202-1205.
- Sœur, J., Marrot, L., Perez, P., Iraqui, I., Kienda, G., Dardalhon, M., Meunier, J.R., Averbek, D., Huang, M.E., 2011. Selective cytotoxicity of *Aniba rosaeodora* essential oil towards epidermoid cancer cells through induction of apoptosis. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 718(1-2):24-32.
- Sporn, M.B., 1996. The war on cancer. *Lancet*, 347(9012):1377-1381.
- Steinmetz, K.A., and Potter, J.D., 1996. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *Journal of the American Dietetic Association*, 96(10):1027-1039.
- Stewart, B.W., Wild, C.P., 2014. World cancer report Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- Stratton, M.R., Campbell, P.J., Futreal, P.A. 2009. The cancer genome. *Nature*, 458(7239):719-724.
- Surh, Y.J., 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer*, 3(10):768-780.
- Tamburini, P., 2015. Prescriptions et précautions en odontologie chez les patients sous traitement anti-cancéreux. Thèse de doctorat en chirurgie dentaire. Université de lorraine faculté d'odontologie de Nancy.
- Terblanché, C.F., Kornelius, G., 1996. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae)-a literature review. *Journal of Essential Oil Research*, 8(5):471-485.
- Thomison, J., Thomas, L. K., Shroyer, K. R., 2008. Human papillomavims: molecular and cytologie/histologie aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Human Pathology*, 39(2):154-166.
- Thornberry, N.A., Lazebnik, Y., 1998. Caspases: enemies within. *Science*, 281(5381):1312-1316.
- Touafek, O., 2010. Etude phytochimique de plantes médicinales du nord et du sud algériens. Thèse de doctorat d'université Mentouri-Constantine.
- Tulkens, P.M., 2006. Anti-cancéreux. Université catholique de Louvain. Bruxelles, Belgique.
- Tuttolomondo, T., La Bella, S., Licata, M., Virga, G., Leto, C., Saija, A., Siracusa, L., 2013. Biomolecular characterization of wild sicilian oregano: phytochemical screening of essential oils and extracts, and evaluation of their antioxidant activities. *Chemistry and Biodiversity*, 10(3):411-433.
- Ultee, A., Bennik, M. H. J., Moezelaar, R., 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4):1561-1568.
-

- Unlu, M., Ergene, E., Unlu, G.V., Zeytinoglu, H.S., Vural, N., 2010. Composition, antimicrobial activity and *in vitro* cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). *Food and Chemical Toxicology*, 48(11):3274-3280.
- Vakifahmetoglu, H., Olsson, M., Zhivotovsky, B., 2008. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death and Differentiation*, 15(7):1153-1162.
- Valastyan, S., Weinberg, R. A., 2011. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147(2):275-292.
- Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P.B., Seabra, R.M., de Lourdes Basto, M., 2002. Studies on the antioxidant activity of *Lippia citriodora* infusion: scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25(10):1324-1327.
- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., Thomson, C.B., 2009. Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930):1029-1033.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., Berneman, Z. N., 2005. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Annals of Hematology*, 84(10):627-639.
- Wang, W., Li, N., Luo, M., Zu, Y., Efferth, T., 2012. Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. *Molecules*, 17(3):2704-2713.
- Wei, A., Shibamoto, T., 2010. Antioxidant/lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(12):7218-7225.
- Weigelt, B., Peterse, J.L., van't Veer, L.J., 2005. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nature Reviews Cancer*, 5(8):591-602.
- Willem, J.P., 2004. Prévenir et vaincre le cancer. 2ème édition. Guy Trédaniel Editeur, pp. 317.
- Worthen, D. R., Ghosheh, O. A., Crooks, P. A., 1998. The *in vitro* anti-tumor activity of some crude and purified components of blackseed, *Nigella sativa* L. *Anticancer research*, 18(3A):1527-1532.
- Xia, Y., Wang, J., Xu, S., Johnson, G. L., Hunter, T., Lu, Z., 2007. MEKK1 mediates the ubiquitination and degradation of c-Jun in response to osmotic stress. *Molecular and Cellular Biology*, 27(2):510-517.
- Yang, H., Ping Dou, Q., 2010. Targeting apoptosis pathway with natural terpenoids: implications for treatment of breast and prostate cancer. *Current Drug Targets*, 11(6):733-744.
- Yang, J., Meyers, K. J., van der Heide, J., Liu, R. H., 2004. Varietal differences in phenolic content and antioxidant and antiproliferative activities of onions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(22), 6787-6793.
- Yavari Kia, P., Safajou, F., Shahnazi, M., Nazemiyeh, H., 2014. The effect of lemon inhalation aromatherapy on nausea and vomiting of pregnancy: a double-blinded, randomized, controlled clinical trial. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 16(3):e14360.
- Yazan, L.S., Ng, K.W., Al-Naqeeb, G., Ismail, M., 2009. Cytotoxicity of thymoquinone (TQ) from *Nigella sativa* towards human cervical carcinoma cells (HeLa). *Journal of Pharmacy Research*, 2(4):585-589.
-

- Yin, Q.H., Yan, F.X., Zu, X.Y., Wu, Y.H., Wu, X.P., Liao, M.C., Zhuang, Y.Z., 2012. Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. *Cytotechnology*, 64(1):43-51.
- Yip, K. W., Reed, J. C., 2008. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene*, 27(50):6398-6406.
- Yoo, C.B., Han, K.T, Cho, K.S., Ha, J., Park, H.J., Nam, J.H., 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 Letters*, 225(1):41-52.
- Yoshikawa T., Kokura, S., Tainaka, K., Naito, Y., Kondo, M., 1995. A novel cancer therapy based on oxygen radicals. *Cancer Research*, 55(8):1617-1620.
- Zelnak, A.B., 2007. Clinical pharmacology and use of microtubule-targeting agents in cancer therapy. *Methods in Molecular Medicine*, 137:209-234.
- Zhang, G., Dass, C. R., Sumithran, E., Di Girolamo, N., Sun, L. Q., Khachigian, L. M., 2004. Effect of deoxyribozymes targeting c-Jun on solid tumor growth and angiogenesis in rodents. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(9):683-696.
- Zhang, H., Chen, F., Wang, X., Yao, H. Y., 2006. Evaluation of antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil and identification of its antioxidant constituents. *Food Research International*, 39(8):833-839.
- Zhong, Z., Chen, X., Tan, W., Xu, Z., Zhou, K., Wu, T., Wang, Y., 2011. Germacrone inhibits the proliferation of breast cancer cell lines by inducing cell cycle arrest and promoting apoptosis. *European Journal of Pharmacology*, 667(1):50-55.
- Zhu, T., Xu, Y., Dong, B., Zhang, J., Wei, Z., Yao, Y., 2011. β -elemene inhibits proliferation of human glioblastoma cells through the activation of glia maturation factor β and induces sensitization to cisplatin. *Oncology Reports*, 26(2):405-413.
- Ziegler, D.S., Kung, A.L., 2008. Therapeutic targeting of apoptosis pathways in cancer. *Current Opinion in Oncology*, 20(1):97-103.
- Zong, W. X., Ditsworth, D., Bauer, D. E., Wang, Z. Q., Thompson, C. B., 2004. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes & development*, 18(11):1272-1282.
- Zong, W. X., Thompson, C. B., 2006. Necrotic death as a cell fate. *Genes & development*, 20(1):1-15.
- Zou, H., Li, Y., Liu, X., Wang, X., 1999. An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *Journal of Biological Chemistry*, 274(17):11549-11556.
- Zygaldo, J.A., Lamarque, A.L., Maestri, D.M., Guzmán, C.A., Lucini, E.I., Grosso, N.R., Ariza-Espinar, L., 1994. Volatile constituents of *Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton. *Journal of Essential Oil Research*, 6(4):407-409.

Références webographiques

Feron, O., Anti-tumoraux, http://www.farm.ucl.ac.be/FARM2129/Feron/11-1_Antitumoraux.pdf

<http://laboratoire-labex.fr/principe-analytique-laboratoire-labex.html>

<http://laboratoire-labex.fr/principe-analytique-laboratoire-labex.html>

http://perso.ens-lyon.fr/thomas.rossi/perso.ens-lyon/Seconde_files/TP12_1.pdf

http://perso.ens-lyon.fr/thomas.rossi/perso.ens-lyon/Seconde_files/TP12_1.pdf

http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/dosart/imgArt/chromato/chromato_gaz1.html

http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/dosart/imgArt/chromato/chromato_gaz1.html

<http://www.ebiologie.fr/upload/s/84/apoptose-le-point-de-non-retour>

<http://www.ebiologie.fr/upload/s/91/activation-de-l-apoptose-de-l-exterieur-de-la-cellule-voie-extrinseque>

<http://www.ebiologie.fr/upload/s/94/activation-de-l-apoptose-de-l-interieur-de-la-cellule-voie-intrinseque>

<http://www.ebiologie.fr/upload/s/95/regulation-de-l-apoptose-par-bcl2bax>

<http://www.ebiologie.fr/upload/s/96/apoptose>

http://www.farm.ucl.ac.be/FARM2129/Feron/11-1_Antitumoraux.pdf

<http://www.futura-sciences.com/sante/dossiers/medecine-cancer-mecanismes-biologiques-1453/page/6/>

<http://www.tela-botanica.org/>

http://www.tela-botanica.org/page:verveine_odorante#

https://fr.wikipedia.org/wiki/Aloysia_citrodora

https://fr.wikipedia.org/wiki/Aloysia_citrodora

IARC: International Agency for Research on Cancer, 2013. <http://globocan.iarc.fr>.

Institut national du cancer, 2017. <http://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Comprendre-la-recherche/Les-progres-de-la-recherche/Les-dernieres-avancees#toc-l-apport-de-la-g-nomique>.

World Health Organization. Traditional medicine. Available at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>. Accessed January 15, 2010. www.fondation-arc.org

www.genomique.irc.ca.

www.genomique.irc.ca. Genomic Platform Institute of research in immunology and cancer, University of Montreal Quoi faire avec des résultats de qPCR.

Article 1

Moulay Ali Oukerrou, Mounir Tilaoui, Hassan Ait Mouse, Inass Leouifoudi, Abdeslam Jaafari, and Abdelmajid Zyad, 2017. Chemical composition and cytotoxic and antibacterial activities of the essential oil of *Aloysia citriodora* Palau grown in Morocco. *Advances in Pharmacological Sciences*, volume 2017, 10 pages.

Article 2

Oukerrou, M. A., Tilaoui, M., Mouse, H. A., Bouchmaa, N., Zyad, A. (2017). Differential Cytotoxic Activity of Essential Oil of *Lippia citriodora* from Different Regions in Morocco. *Chemistry & Biodiversity*, volume 14, issue 7.

Article 3

Moulay Ali Oukerrou, Mounir Tilaoui, Hassan Ait Mouse, Abdelmajid Zyad. Bax, Bcl-2, p53 and c-jun genes expression response to *Lippia citriodora* essential oil treatment on human breast cancer cells. (Soumis)

Article 4

Leouifoudi, I., Ziad, A., Amechrouq, A., Oukerrou, M. A., Mousse, H. A., & Mbarki, M., 2014. Identification and characterisation of phenolic compounds extracted from Moroccan olive mill wastewater. *Food Science and Technology*, 34(2), 249-257.

Article 5

Zyad A, Tilaoui M, Jaafari A, Oukerrou MA, Mouse HA, 2017. More insights into the pharmacological effects of artemisinin. *Phytotherapy Research*, 32(2):216-229.

Article 6

Najat Bouchmaa, Mounir Tilaoui, Youness Boukharsa, Abdessalam Jaâfari, Hassan Aît Mouse, My. Ali Oukerrou, Jamal Taoufik, M'hammed Ansar, Abdelmajid Zyad, 2018. In Vitro Antitumor Activity of Newly Synthesized Pyridazin-3(2H)-One Derivatives via Apoptosis Induction. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, volume 51, Issue 10, pp 893-901.

**Lettres d'invitation et d'acceptation au professeur A. Zyad de
participer au 2nd Word Chemistry Conference and Exhibition.
Valencia Spain (Innovinc)**

Annexes

Composition du milieu de culture DMEM utilisé pour la culture des lignées cellulaires

Substances ou composés	Concentration (mg/L)	Substances ou composés	Concentration (mg/L)
<i>Glycine</i>	30	<i>Niacinamide</i>	4
<i>L-arginine hydrochloride</i>	84	<i>Pyridoxine hydrochloride</i>	4
<i>L-cystine</i>	63	<i>Riboflavin</i>	0.4
<i>L-glutamine</i>	584	<i>Thiamine hydrochloride</i>	4
<i>L-histidine</i>	42	<i>I-inositol</i>	7.2
<i>L-isoleucine</i>	105	<i>Calcium chloride</i>	200
<i>L-leucine</i>	105	<i>Ferric nitrate</i>	0.1
<i>L-lysine hydrochloride</i>	146	<i>Magnesium</i>	97.67
<i>L-methionine</i>	30	<i>Potassium chloride</i>	400
<i>L-phenylalanine</i>	66	<i>Sodium bicarbonate</i>	3700
<i>L-serine</i>	42	<i>Sodium chloride</i>	6400
<i>L-threonine</i>	95	<i>Sodium phosphate monobasic</i>	125
<i>L-tryptophan</i>	16	D-glucose (dextrose)	4500
<i>L-tyrosine disodium salt dihydrate</i>	104	<i>Phenol red</i>	15
<i>L-valine</i>	94	<i>Sodium pyruvate</i>	110
<i>Choline chloride</i>	4		
<i>D-calcium pantothenate</i>	4		
<i>Folic acid</i>	4		

Principe de la chromatographie en phase gazeuse

Le principe de la chromatographie en phase gazeuse est la séparation des constituants d'un mélange mis sous forme vapeur, et entraîné dans une colonne qui va séparer les différents composés en fonction de leur affinité avec sa surface.

Dans un premier temps, l'échantillon d'intérêt passe par une phase d'extraction éventuelle (extraction liquide-liquide, extraction en phase solide, précipitation des protéines, etc.) ; ensuite l'échantillon est vaporisé par chauffage, et injecté dans le chromatographe en phase gazeuse. A ce niveau-là, les molécules gazeuses, transportées par un gaz vecteur (hélium, argon, hydrogène ou azote), sont séparées du fait de leurs différentes propriétés chimiques. La colonne du chromatographe est tapissée de molécules (phase stationnaire) qui peuvent retenir plus ou moins les composés qui y passent selon leurs affinités. A la sortie de la colonne, on peut donc analyser les composés un à un puisqu'ils auront un temps de rétention (temps de sortie de la colonne) qui leur sera propre. On obtient un chromatogramme qui montre une intensité de signal des composés séparés en fonction de leur temps de rétention.

Dans un deuxième temps, les composés séparés arrivent dans le spectromètre de masse à fin de détection. Ils sont ionisés par un mécanisme d'impact électronique. Les molécules sont ensuite soumises à collision, fractionnées, et les différents fragments sont analysés en déterminant leur

masse propre. Ceci permet l'obtention d'un spectre de masse caractéristique, véritable « empreinte génétique » de la molécule mère.

Le chromatogramme et le spectre de masse sont traités simultanément pour le rendu des résultats grâce à une interface informatisée. Avec des étalons internes intégrés durant la préparation de l'échantillon, il est possible de quantifier les composés.
