



**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC**

**MÉMOIRE**

**PRÉSENTÉ À**

**L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA MAITRISE EN**

**MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE**

**PAR**

**STÉPHAN LESSARD**

**MICRONUTRIMENTS ALIMENTAIRES ET LEURS  
RÔLES DANS LE CONTRÔLE NATUREL DE LA  
CANCÉRISATION CELLULAIRE.**

**OCTOBRE 1995**

## TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES . . . . .	ii
LISTE DES TABLEAUX . . . . .	vii
LISTE DES FIGURES . . . . .	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS . . . . .	xi
SOMMAIRE . . . . .	xii
1 INTRODUCTION . . . . .	1
2 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE . . . . .	4
2.1 MÉTABOLISME CELLULAIRE DE CONTRÔLE . . . . .	5
2.2 DÉSTABILISATION DES LIPIDES DE LA MEMBRANE . . . . .	6
2.3 EFFETS DES COMPOSÉS CANCÉRIGÈNES SUR LES ENZYMES CELLULAIRES . . . . .	7
2.4 DÉSTABILISATION DE L'ADN CELLULAIRE . . . . .	8
2.5 MICRONUTRIMENTS ALIMENTAIRES ET CANCER . . . . .	10
2.5.1 Généralités sur les mécanismes d'action . . . . .	13
2.5.2 Classification des micronutriments pouvant avoir un rôle dans la prévention et possiblement le traitement du cancer . . . . .	16
2.5.2.1.1 Contenu énergétique de la diète et cancer . . . . .	17
2.5.2.1.2 Acides gras insaturés et cancer . . . . .	18
2.5.2.2 Antioxydants naturels de l'alimentation . . . . .	21
2.5.2.2.1 Les flavonoïdes . . . . .	22
2.5.2.2.2 Les thiols . . . . .	22
2.5.2.3 Les vitamines et leurs précurseurs . . . . .	22
2.5.2.4 Les minéraux . . . . .	26
2.5.2.5 Les acides nucléiques et leurs dérivés . . . . .	28
2.5.2.6 Certains produits provenant des plantes médicinales et autres . . . . .	30
2.6 REMARQUE . . . . .	31
2.7 MESURE DES PROPRIÉTÉ ANTIOXYDANTES . . . . .	31
2.7.1 Dégradation du déoxyribose . . . . .	32
2.7.2 Mesures polarographiques . . . . .	33
2.7.3 Dégradation de l'ADN . . . . .	34
2.7.4 Peroxydation non-enzymatique des microsomes de foie de rat . . . . .	34
2.8 TESTS DE MUTAGÉNÉCITÉ . . . . .	37
2.8.1 Test de mutagénéicité de Ames . . . . .	37
2.8.2 Test de mutagénéicité Umu . . . . .	38
2.8.3 Mesure du pouvoir antimutagène . . . . .	39
2.9 EN RÉSUMÉ . . . . .	39
2.9.1 Rôle des micronutriments dans le contrôle de la cancérisation . . . . .	39
2.9.2 Les technologies . . . . .	40

2.10	HYPOTHÈSE DE TRAVAIL . . . . .	41
2.11	OBJECTIF GÉNÉRAL . . . . .	41
2.11.1	Nos objectifs spécifiques au cours de ce travail seront de: . . . . .	42
2.12	PLAN DE TRAVAIL . . . . .	43
<b>3</b>	<b>MATÉRIEL ET MÉTHODE . . . . .</b>	<b>45</b>
3.1	MICROTECHNIQUE D'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE . . . . .	46
3.1.1	Préparation des liposomes . . . . .	46
3.1.2	Préparation de l'acide ascorbique de base . . . . .	47
3.1.3	Préparation du fer . . . . .	47
3.1.4	Préparation de la solution de sodium dodécyl sulfate (SDS) . . . . .	47
3.1.5	Préparation de l'acide thiobarbiturique . . . . .	48
3.1.6	Préparation de la solution de coloration . . . . .	48
3.1.7	Préparation des contrôles et des échantillons à analyser . . . . .	48
3.1.8	Préparation de la plaque réactionnelle . . . . .	49
3.1.9	Préparation du milieu réactionnel . . . . .	51
3.1.10	Élaboration d'une courbe standard . . . . .	52
3.1.11	Activité antioxydante d'un produit . . . . .	52
3.1.12	Force antioxydante d'un produit . . . . .	54
3.2	ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE DE DIFFÉRENTS PRODUITS COMMERCIAUX PURIFIÉS ET THÉRAPEUTIQUES . . . . .	56
3.2.1	Liste des produits étudiés pour leur propriété antioxydante . . . . .	56
3.2.2	Mesure de l'activité antioxydante . . . . .	58
3.2.3	Force antioxydante . . . . .	58
3.3	EXTRACTIONS D'ÉPICES ET ÉTUDE DE LEUR ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE . . . . .	58
3.3.1	Épices étudiées . . . . .	59
3.3.2	Méthode d'extraction . . . . .	59
3.3.3	Extractions d'épices effectuées . . . . .	60
3.3.4	Étude de l'activité antioxydante des différents extraits d'épices . . . . .	61
3.4	TEST DE MUTAGÉNÉCITÉ Umu . . . . .	61
3.4.1	Liste des produits à tester . . . . .	62
3.4.2	Souche bactérienne . . . . .	62
3.4.3	Préparation des produits à étudier . . . . .	62
3.4.4	Préparation des produits mutagènes . . . . .	63
3.4.5	Contrôles négatif . . . . .	64
3.4.6	Milieu TGA . . . . .	64
3.4.7	Solution de fraction S9 . . . . .	64
3.4.8	Le test Umu: mesure de mutagénéicité . . . . .	65
3.4.9	Test Umu: mesure d'antimutagénéicité . . . . .	66
3.4.10	Dosage de la $\beta$ -galactosidase . . . . .	67
3.4.11	Transformation des D.O. en unités de $\beta$ -galactosidase . . . . .	67
3.4.12	Interprétation des résultats de mutagénéicité . . . . .	68
3.4.13	Interprétation des résultats d'antimutagénéicité . . . . .	68

4	RÉSULTATS . . . . .	69
4.1	MICROTECHNIQUE DE MESURE DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE . . . . .	70
4.1.1	Courbe standard . . . . .	70
4.1.2	Effet de la pureté du SDS sur l'activité antioxydante des contrôles positifs . . . . .	72
4.1.3	Contrôles positifs et négatifs hydrosolubles et liposolubles . . . . .	72
4.1.4	Activité et force antioxydante d'un produit . . . . .	78
4.1.5	Limite de mesure des produits colorés intrinsèquement . . . . .	81
4.2	MESURE DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE DE DIFFÉRENTS PRODUITS COMMERCIAUX PURIFIÉS ET THÉRAPEUTIQUES . . . . .	83
4.2.1	Activité et force antioxydante des produits commerciaux purifiés hydrosolubles . . . . .	83
4.2.2	Activité et force antioxydante des produits commerciaux purifiés liposolubles . . . . .	87
4.2.3	Activité et force antioxydante des produits commerciaux thérapeutiques . . . . .	89
4.3	RÉSULTATS DES EXTRACTIONS D'ÉPICES ET LEUR ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE . . . . .	90
4.3.1	Résultats d'activité antioxydante des extraits d'épices . . . . .	90
4.3.2	Détermination de la meilleure extraction pour chacune des épices pour leur force antioxydante . . . . .	96
4.4	RÉSULTATS DU TEST Umu . . . . .	96
4.4.1	Étude de la mutagénéicité <u>per se</u> des produits à étudier . . . . .	96
4.4.1.1	Mutagénéicité <u>per se</u> des produits commerciaux purifiés . . . . .	101
4.4.1.2	Mutagénéicité <u>per se</u> des extraits d'épices . . . . .	101
4.4.1.3	Mutagénéicité <u>per se</u> des produits commerciaux thérapeutiques . . . . .	102
4.4.2	Étude de la mutagénéicité des métabolites des produits à étudier . . . . .	102
4.4.2.1	Mutagénéicité des métabolites des produits commerciaux purifiés . . . . .	106
4.4.2.2	Mutagénéicité des métabolites des extraits d'épices . . . . .	106
4.4.2.3	Mutagénéicité des métabolites des produits commerciaux thérapeutiques . . . . .	107
4.4.3	Étude de l'antimutagénéicité <u>per se</u> des produits étudiés sur le dichromate de potassium . . . . .	107
4.4.3.1	Antimutagénéicité <u>per se</u> des produits commerciaux purifiés . . . . .	111
4.4.3.2	Antimutagénéicité <u>per se</u> des extraits d'épices . . . . .	111
4.4.3.3	Antimutagénéicité <u>per se</u> des produits commerciaux thérapeutiques . . . . .	112

4.4.4	Étude de l'antimutagénéicité des métabolites de différents produits sur le quercétin . . . . .	113
4.4.4.1	Antimutagénéicité des métabolites des produits commerciaux purifiés . . . . .	113
4.4.4.2	Antimutagénéicité des métabolites des extraits d'épices . . . . .	117
4.4.4.3	Antimutagénéicité des métabolites des produits commerciaux thérapeutiques . . . . .	118
4.5	RÉSUMÉ DES RÉSULTATS . . . . .	119
5	DISCUSSION . . . . .	123
5.1	MICROTECHNIQUE D'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE . . . . .	124
5.1.1	Courbe standard du malonaldéhyde . . . . .	125
5.1.2	Pureté du SDS . . . . .	125
5.1.3	Contrôles positifs et négatifs . . . . .	126
5.1.4	Transformation des D.O. en pourcentage d'activité antioxydante . . . . .	126
5.1.5	Expression des concentrations . . . . .	127
5.1.6	Limitations de la microtechnique . . . . .	128
5.1.7	Rapidité de la microtechnique . . . . .	129
5.1.8	Simplicité de la microtechnique . . . . .	130
5.1.9	Avantages de la microtechnique . . . . .	130
5.2	LE TEST Umu . . . . .	131
5.2.1	Mesure de l'activité antimutagène . . . . .	132
5.3	ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE DES PRODUITS SÉLECTIONNÉS . . . . .	133
5.4	ÉTUDE DE LA MUTAGÉNÉICITÉ DES PRODUITS SÉLECTIONNÉS . . . . .	138
5.5	ÉTUDE DE L'ANTIMUTAGÉNÉICITÉ DES PRODUITS SÉLECTIONNÉS . . . . .	142
5.6	DISCUSSION SUR L'ENSEMBLE DES RÉSULTATS OBTENUS . . . . .	143
6	CONCLUSION . . . . .	147
6.1	MICROTECHNIQUE DE MESURE DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE . . . . .	149
6.2	ÉTUDE DE LA MUTAGÉNÉICITÉ ET DE L'ANTIMUTAGÉNÉICITÉ . . . . .	150
6.3	SYNTHÈSE DES RÉSULTATS OBTENUS SUR LES PRODUITS ÉTUDIÉS . . . . .	151
6.3.1	Produits possédant des propriétés antioxydantes, sans toutefois être mutagènes. . . . .	152
6.3.2	Produits possédant des propriétés antimutagènes, et qui ne sont pas mutagènes . . . . .	153
6.3.3	Produits possédant à la fois des propriétés antioxydantes et antimutagènes, sans toutefois être mutagènes . . . . .	154
6.4	SYNERGIE DES DIFFÉRENTES PROPRIÉTÉS . . . . .	154
6.5	AVENIR . . . . .	155

<b>7</b>	<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>157</b>
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>160</b>
	<b>ANNEXE A</b>	<b>169</b>

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Liste des produits commerciaux purifiés et thérapeutiques à étudier pour leur activité antioxydante à l'aide de la microtechnique..57
Tableau 2.1	Activité et force antioxydante de différents produits commerciaux purifiés hydrosolubles .84
Tableau 2.2	Activité et force antioxydante de différents produits commerciaux purifiés liposolubles ..85
Tableau 2.3	Activité et force antioxydante de différents produits commerciaux thérapeutiques .....86
Tableau 3.1	Activité et force antioxydante de différents extraits aqueux d'épices .....91
Tableau 3.2	Activité et force antioxydante de différents extraits éthyliques d'épices .....92
Tableau 4	Meilleurs extraits pour chacune des épices ..97
Tableau 5.1	Mutagénécité <u>per se</u> de différents produits commerciaux purifiés hydro et liposolubles déterminée à l'aide du test Umu .....98
Tableau 5.2	Mutagénécité <u>per se</u> de différents extraits d'épices déterminée à l'aide du test Umu ....99
Tableau 5.3	Mutagénécité <u>per se</u> de différents produits commerciaux thérapeutiques déterminée à l'aide du test Umu .....100
Tableau 6.1	Mutagénécité des métabolites de différents produits commerciaux purifiés hydro et liposolubles déterminée à l'aide du test Umu .....103
Tableau 6.2	Mutagénécité des métabolites de différents extraits d'épices déterminée à l'aide du test Umu .....104
Tableau 6.3	Mutagénécité des métabolites de différents produits commerciaux thérapeutiques déterminée à l'aide du test Umu .....105
Tableau 7.1	Étude de l'effet de l'ajout de différents produits commerciaux purifiés sur la mutagénécité du dichromate de potassium ....108

Tableau 7.2	Étude de l'effet de l'ajout de différents extraits d'épices sur la mutagénéité du dichromate de potassium.....	109
Tableau 7.3	Étude de l'effet de l'ajout de différents produits commerciaux thérapeutiques sur la mutagénéité du dichromate de potassium....	110
Tableau 8.1	Étude de l'effet de l'ajout de différents produits commerciaux purifiés sur la mutagénéité du quercétin.....	114
Tableau 8.2	Étude de l'effet de l'ajout de différents extraits d'épices sur la mutagénéité du quercétin.....	115
Tableau 8.3	Étude de l'effet de l'ajout de différents produits commerciaux thérapeutiques sur la mutagénéité du quercétin.....	116
Tableau 9.1	Activité antioxydante, mutagénéité et antimutagénéité de différents produits commerciaux purifiés hydrosolubles.....	120
Tableau 9.2	Activité antioxydante, mutagénéité et antimutagénéité de différents produits commerciaux purifiés liposolubles.....	120
Tableau 9.3	Activité antioxydante, mutagénéité et antimutagénéité de différents extraits d'épices.....	121
Tableau 9.4	Activité antioxydante, mutagénéité et antimutagénéité de différents produits commerciaux thérapeutiques.....	122

## LISTE DES FIGURES

Figure 1	Distribution des échantillons à l'intérieur d'une plaque. Chaque expérience contient 12 contrôles positifs et négatifs. Les contrôles positifs et les échantillons à analyser sont répartis en 4 concentrations, chacune en triplicata. Les contrôles négatifs (le solvant) est en 12 exemplaires à 0 $\mu\text{g/ml}$ .....50
Figure 2	Étalon de détermination de la force antioxydante d'un produit à partir de son activité antioxydante exprimé en pourcentage de celle de ses contrôles positifs et négatifs. L'activité antioxydante d'un antioxydant fort est supérieure à 70%, et celle d'un antioxydant de force moyenne est situé entre 40% et 70%. Pour une activité situé entre -30% et 40%, on parlera d'un produit neutre (ni antioxydant, ni oxydant); et si elle est inférieure à -30%, il s'agit d'un produit oxydant .....55
Figure 3	Courbe standard de la D.O. en fonction de la concentration de malonaldéhyde dans le milieu réactionnel .....71
Figure 4	Étude de l'effet du degré de purification du SDS sur la courbe d'activité antioxydante de la vitamine C en fonction de la concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) .....73
Figure 5	Étude de l'effet du degré de purification du SDS sur la courbe d'activité antioxydante de la vitamine E en fonction de la concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) .....74
Figure 6	Courbe d'activité antioxydante de la vitamine C utilisé comme contrôle positif des produits hydrosoluble, obtenue de 21 expériences successives .....75
Figure 7	Courbe d'activité antioxydante de la vitamine E utilisé comme contrôle positif des produits liposolubles, obtenue de 28 expériences successives .....77
Figure 8	Expérience de superposition des courbes d'activité antioxydante de l'hydroquinone par rapport à l'ensemble des contrôles positifs, vitamine C, (figure 4) en fonction de la concentration des produits en $\mu\text{g/ml}$ dans nos conditions expérimentales .....80

Figure 9	Courbe d'activité antioxydante d'un extrait aqueux d'hibiscus en fonction de la concentration en $\mu\text{g/ml}$ dans nos conditions expérimentales .....	82
Figure 10	Certaines molécules purifiées antioxydantes .....	88
Figure 11	Certaines molécules antioxydantes du romarin et du thym .....	95

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
BHA	Hydroxyanisole butylique
BHT	Hydroxytoluène butylique
D.O.	Densité optique
MNNG	N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
NAD(P)	Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate)
NK	<u>Natural killer</u>
nm	Nanomètre
pH	Potentiel hydrogène
ppm	Parties par million
RLB	<u>Remontent-Leucocytes-Beljansky</u>
SDS	Sodium dodécyl sulfate
TGA	Milieu tryptone-glucose-ampicilline
Umu	Gène du système S.O.S. de réparation de l'ADN de <u>Salmonella typhimurium</u>
V/V	Volume par volume
µg	Microgramme
µl	Microlitre
°C	Degré Celsius

## SOMMAIRE

Plusieurs micronutriments provenant des aliments ou des plantes semblent jouer un rôle prépondérant dans la prévention et même dans le traitement du cancer. Certains exerceraient leur effet par leurs pouvoirs antioxydants, d'autres par leurs capacités de moduler les réponses immunitaires ou les enzymes importantes de l'homéostasie cellulaire. On prétend que d'autres stabiliseraient l'ADN muté des cellules cancéreuses ou en voie de cancérisation, ou pourraient inhiber les collagénases qui permettent les métastases, etc.. Les phénols, les vitamines et leurs précurseurs, les minéraux, les acides gras insaturés et les acides nucléiques sont des micronutriments alimentaires et autant de familles de composés chimiques naturels présentement à l'étude afin de mieux connaître leurs propriétés anticancéreuses.

Notre travail avait comme objectifs le développement de techniques simples et leurs applications dans l'étude de certaines propriétés désirables des micronutriments alimentaires dans la prévention de la cancérisation.

Nous avons développé et mis au point une microtechnique pour étudier et mesurer quantitativement le pouvoir antioxydant d'une variété de produits chimiques, micronutriments, drogues ou plantes par l'intermédiaire de la peroxydation de membranes artificielles. Nous avons également mis au point et utilisé le

test de mutagénéicité bactérien Umu pour étudier les propriétés mutagéniques de ces différents produits en soi ainsi que les propriétés mutagéniques de leurs métabolites hépatiques une fois transformés par le cytochrome P-450. Nous avons mis au point une variation technologique du test Umu qui permet d'étudier les propriétés antimutagéniques d'un produit en soi aussi bien que de ses métabolites hépatiques.

En tout, nous avons étudié 56 produits différents à l'aide de ces technologies pour mieux connaître leurs propriétés biologiques. Des produits sélectionnés, 22 étaient d'origine commerciale, 12 sont vendus pour leurs propriétés thérapeutiques diverses par les magasins d'aliments naturels et 22 autres étaient des épices chez lesquelles nous avons extrait leurs composés par infusion dans l'eau bouillante ou dans l'éthanol.

Nos résultats montrent que sur les 56 produits sélectionnés et étudiés pour leurs propriétés antioxydantes, 14 (25%) possédaient des propriétés antioxydantes fortes, 12 autres (21%) possédaient des propriétés antioxydantes de force moyenne et 24 (43%) étaient ni antioxydants, ni oxydants. Cinq (9%) des produits étudiés possédaient des propriétés oxydantes.

Nos études sur la mutagénéicité montrent que sur les 56 produits étudiés, 53 (95%) ne sont pas mutagènes en soi, ni par

l'action de leurs métabolites hépatiques une fois transformés par les cytochromes P-450.

Nos études sur les propriétés antimutagéniques des mêmes 56 produits indiquent que 50% de ces derniers sont capables d'inhiber de plus de 35% les propriétés mutagéniques de mutagènes connus comme le dichromate de potassium. Nous avons observé que 19 des produits étudiés (34%) possèdent à la fois des propriétés antimutagéniques aussi bien en soi, que dans leurs métabolites hépatiques.

On a également observé que les extractions aqueuses d'épices de courtes durées semblent préférables aux extractions de longues durées ou aux extractions éthyliques pour récupérer les micronutriments qui possèdent des activités antioxydantes.

Nos résultats suggèrent que ce ne sont pas nécessairement les produits qui possèdent des propriétés antioxydantes fortes qui inhibent le plus la mutagénéité et permettent de penser que les sites d'action antioxydante d'une molécule purifiée, comme le catéchol, sont différents des sites responsables de l'activité antimutagène.

D'après les résultats que nous avons obtenus, l'activité mutagénique des composés mutagènes que nous avons utilisés au cours de nos études, soit le dichromate de potassium et le

quercetin, ne semble pas être relié à un mécanisme d'oxydation du bagage génétique des cellules. Ceci est suggéré parce que certains oxydants inhibent leurs mutagénécités alors que tous les produits antioxydants n'inhibent pas nécessairement leurs propriétés mutagéniques.

L'analyse des résultats obtenus suggère également que de tous les produits sélectionnés et étudiés, la rutine, la vitamine E, le catéchol, l'épicatéchine, le gossypol, l'origano doux, l'origano fort et la menthe seraient les produits les plus potentiellement intéressants à utiliser dans la prévention du cancer. En effet, ces produits ne sont pas mutagènes en soi ni par l'action de leurs métabolites hépatiques, ils possèdent des propriétés antioxydantes fortes et s'avèrent capables d'inhiber l'activité mutagénique de produits mutagènes.

En résumé, tout notre travail a porté sur le développement de méthodologies qui nous ont permis d'étudier certaines propriétés biologiques des micronutriments. Les résultats obtenus renforcent les hypothèses que plusieurs micronutriments possèdent effectivement des propriétés biologiques favorables et même réparatrices pour les cellules en voie de cancérisation. Les recherches scientifiques confirment de plus en plus que nous sommes ce que nous mangeons et que notre alimentation et notre mode de vie jouent un rôle important dans l'éclosion des maladies. L'augmentation de plusieurs types de

cancers n'est peut-être pas étrangère à notre alimentation.  
Alors mangeons mieux et nous vivrons mieux.

**1 INTRODUCTION**

Les cellules cancéreuses sont caractérisées par une prolifération incontrôlée qui les empêche de répondre normalement aux mécanismes de contrôle physiologiques internes de la cellule. Une fois leurs mécanismes de contrôle déréglés, les cellules prolifèrent sans arrêt, envahissent les tissus environnants et peuvent s'étendre, via la circulation ou la voie lymphatique, à des organes éloignés (métastases) et même conduire à la mort de l'hôte (SCHULLER, 1991). Un tel dérèglement des contrôles cellulaires survient lorsque des substances toxiques ou les déchets d'oxydation sont produits par l'hyperactivité cellulaire au cours de la défense de la cellule contre des agents agressants. En grande concentration, ces agents agressants engendrent des déstabilisations répétitives et profondes sur l'ADN cellulaire. On mesure souvent la résultante de ces effets toxiques pour la cellule en analysant les perturbations causées à l'ADN (DE FLORA et al., 1991; SAHU et WASHINGTON, 1991; SINGLETARY et NELSHOPPEN, 1991b; TRIZNA et al., 1991). La mutagénécité d'une substance toxique pour la cellule est souvent mesurée en analysant sa potentialité à déstabiliser *in vitro* l'ADN déjà fragilisé par mutation (test de Ames, test UmU) (LIGHT et al., 1987).

Au cours de cette revue de questions, nous discuterons de différents stress cellulaires "permanents" qui tendent à briser l'homéostasie physiologique de la cellule. Après un bref rappel de la physiologie cellulaire normale, nous verrons comment des

agents stressants comme les produits mutagènes, les virus et autres substances toxiques tendent à briser l'équilibre normal de la cellule. Seront ensuite passés en revue: 1) les effets bénéfiques connus de certains micronutriments naturels présents dans l'alimentation sur ces changements intracellulaires; 2) leurs rôles possibles dans la prévention des dérèglements cellulaires qui peuvent conduire à la cancérisation; 3) les quelques données qui permettent de penser que certaines substances issues des aliments peuvent avoir une action bénéfique sur la physiologie normale de la cellule et potentiellement dans le cancer; 4) les mécanismes, encore mal connus, par lesquels ces micronutriments agiraient.

Nous discuterons également des différentes technologies permettant l'étude des propriétés antioxydantes et de technologies qui permettent l'étude de la mutagénicité de différents composés chimiques.

Notre travail de recherche s'est attardé plus spécifiquement sur les propriétés antioxydantes et antimutagènes des micronutriments alimentaires. Nous avons cherché des micronutriments possédant ces propriétés sans toutefois, être mutagènes.

## 2 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

La présente section de ce travail portera sur les métabolismes cellulaires de contrôle, la déstabilisation des membranes, les rôles probables des différents types de micronutriments dans le contrôle de la cancérisation, des différentes méthodes de mesure de l'activité antioxydante et de mutagénéicité. Enfin, l'hypothèse et les objectifs de ce projet de recherche seront présentés.

## **2.1 MÉTABOLISME CELLULAIRE DE CONTRÔLE**

Unité vivante, extrêmement complexe et autonome de tout être vivant, la cellule possède un éventail de mécanismes complexes de défense pour se protéger des agents agresseurs. Les membranes cellulaires endoplasmiques, nucléaires et autres, agissent comme premier agent protecteur pour empêcher l'entrée de substances toxiques ou oncogènes au sein de la cellule. Si d'aventure, ces substances parviennent à percer cette barrière, plusieurs réactions enzymatiques guidées par une multitude de gènes seront mises en branle afin de neutraliser et éliminer de la cellule ces substances toxiques qui pourraient briser l'homéostasie cellulaire.

Au cours de l'activité des enzymes de détoxification, de nombreux mécanismes sont déployés par la cellule. Des mécanismes de division cellulaire, à titre d'exemple, sont activés afin de fabriquer de nouvelles cellules et ainsi réduire la concentration des substances toxiques qui

envahissent la cellule mère. Les deux cellules filles contiennent ainsi moins de substances toxiques. D'autres produits cellulaires détoxiquent en se liant aux substances toxiques, en les transformant en produits moins toxiques et en favorisant leur élimination de la cellule. Mentionnons aussi toutes les enzymes du système S.O.S. de réparation de l'ADN, qui veillent à maintenir l'intégrité et la complémentarité parfaite de l'ADN cellulaire et à réparer les dommages au besoin.

Tous ces mécanismes de défense intracellulaire peuvent être considérés comme des outils dont les fonctions sont de conserver l'intégrité des contrôles génétiques de l'ADN. En effet, une fois l'ADN modifié ou muté par les produits de l'hydroxydation ou d'autres substances toxiques, la cellule peut perdre tout contrôle sur ses activités spécifiques normales. Les déséquilibres profonds observés dans la cellule cancéreuse, les organes et, finalement, dans tout l'organisme, sont, à titre d'exemple, les témoins frappant des batailles perdues par tous ces mécanismes dans leur lutte contre les multiples agents mutagènes et/ou toxiques auxquels ont été soumises les cellules de l'organisme.

## **2.2 DÉSTABILISATION DES LIPIDES DE LA MEMBRANE**

Après la barrière intestinale et pulmonaire et la détoxification hépatique, la peroxydation des lipides de la

membrane semble être le point de départ de modifications cellulaires qui peuvent engendrer, sous l'effet de stress chroniques, des déstabilisations permanentes de l'ADN et ouvrir la voie à la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse (SAHU et WASHINGTON, 1991; ZHANG et al., 1991). Le nombre croissant de stress chroniques de l'environnement ou des habitudes de vie que subit la cellule, l'exposition aux produits des réactions de peroxydation continues issus de ces agressions, les infections virales et autres, sont à l'origine des dégradations souvent permanentes des lipides de la membrane cellulaire et des événements qui contribuent au vieillissement prématuré des cellules (RUSTING, 1993). Ces phénomènes de peroxydation des lipides de la membrane cellulaire se manifestent sur toutes les membranes cellulaires, incluant la membrane nucléaire, responsable de la protection de l'ADN. Ce pourrait être en partie ces dommages qui aboutissent à des aberrations permanentes de l'ADN retrouvées dans la cellule cancéreuse et qui en modifient les fonctions (SAHU et WASHINGTON, 1991; ZHANG et SEVANI, 1991).

### **2.3 EFFETS DES COMPOSÉS CANCÉRIGÈNES SUR LES ENZYMES CELLULAIRES**

Les composés cancérogènes ayant traversés les membranes cellulaires, déclenchent des réactions de défense intracellulaire et la libération de substances toxiques d'oxydation comme les radicaux libres ( $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{O}_2^\cdot$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (SAHU et

WASHINGTON, 1991). La production de ces radicaux libres, est la résultante de l'hyperactivité des enzymes de détoxification de la cellule, aux prises avec ses mécanismes de régénération, de rejet ou de neutralisation des agents stressants mutagènes.

En plus des substances toxiques qui pénètrent la cellule, les produits toxiques de cette peroxydation des lipides membranaires et les radicaux libres peuvent réagir avec l'ADN et provoquer des bris moléculaires, des mutations somatiques ou des transformations de gènes dont la fonction est de contrôler toutes les fonctions normales de la cellule (ZHANG et SEVANI, 1991). Des études de plus en plus nombreuses démontrent que les vitamines E et A, qui sont des antioxydants lipophiles, ou la vitamine C, un antioxydant hydrophile et un grand nombre de phénols, polyphénols et autres molécules provenant de notre alimentation, agissent comme capteurs de produits de peroxydation et aident la cellule à combattre la formation de produits clastogéniques ainsi que leur fixation sur l'ADN (STAHELIN et al., 1991; ZHANG et SEVANI, 1991; ZHANG et al., 1991).

#### **2.4 DÉSTABILISATION DE L'ADN CELLULAIRE**

L'évaluation de la fragilité chromosomique et le dépistage d'anomalies dans les acides nucléiques cellulaires ont été utilisés depuis longtemps comme mesure du degré de l'instabilité de l'ADN et comme marqueurs d'une cellule en voie

de cancérisation (formation de DNA adducts) (DE FLORA et al., 1991; SINGLETARY et NELSHOPPEN, 1991a; SINGLETARY et NELSHOPPEN, 1991b). Nous avons mentionné qu'avant de modifier son ADN cellulaire, la cellule se défendra longuement contre les agresseurs de toutes natures qui menacent constamment son intégrité (substances cancérigènes, agents mutagènes, toxiques, etc.). La cancérisation ou la perturbation de l'ADN et de ses fonctions normales nous apparaît donc comme un phénomène résultant d'une longue lutte de la cellule, constamment exposée à des agents stressants. On a en effet rapporté que les déstabilisations permanentes de l'ADN cellulaire n'apparaissent qu'après de grands efforts de la part de la cellule pour rétablir son équilibre face à un composé cancérigène (TRIZNA et al., 1991). Les substances toxiques stressent la cellule, perturbent ou déséquilibrent son homéostasie, activent les mécanismes de défense intra et extracellulaires ainsi que les divisions cellulaires, qui ont comme objectif de rétablir l'équilibre normal de la cellule.

En contrepartie, toute substance capable d'aider la cellule à se débarrasser des produits d'oxydation, à stabiliser les divisions, ou à rétablir la physiologie cellulaire, serait susceptible de faire partie des substances anticancéreuses. À titre d'exemple, le camptothécine est un agent de chimiothérapie du cancer utilisé en clinique dans le traitement du cancer du côlon et des tumeurs solides en général. Sa fonction première

est d'inhiber la topoisomérase I impliquée dans la réplication de l'ADN et de la transcription de l'ARN. Le médicament s'accumule donc dans les cellules cancéreuses ou normales et neutralise presque totalement la topoisomérase I, empêchant ainsi la cellule de se diviser (CHEN et al., 1991). Malheureusement, comme la plupart des médicaments utilisés en chimiothérapie du cancer, le camptothécine est aussi très toxique pour les cellules normales. Les cellules normales vont donc également lutter afin de neutraliser et d'éliminer le médicament vers l'extérieur de la cellule. L'effet bénéfique vient du fait que la cellule cancéreuse étant une cellule anormale avec des mécanismes de défense affaiblis, il lui est plus difficile d'effectuer cette élimination de l'agent chimiothérapeutique. Cette chimiothérapie favorise donc la destruction de la cellule cancéreuse en se servant de son instabilité. C'est là un des objectifs principaux de la chimiothérapie et/ou de la radiothérapie du cancer utilisée à grande échelle dans la thérapie anticancéreuse.

## **2.5 MICRONUTRIMENTS ALIMENTAIRES ET CANCER**

On a observé que certains micronutriments naturels faisant partie intégrante de notre alimentation (fruits, légumes, poissons, etc.), ou provenant de certaines plantes, posséderaient des effets anticancérigènes, sans toutefois être toxiques pour la cellule. Ces micronutriments naturels ont manifesté leurs actions bénéfiques pour les cellules en

agissant soit comme substances antioxydantes, soit comme inhibiteurs des toxines, soit comme vidangeur des produits de l'hydroxydation résultant de la lutte de la cellule contre les agents mutagènes et stressants (STAHELIN et al., 1991; SZMURLO et al., 1991; THOMPSON, 1991; ZHANG et al., 1991). Plusieurs travaux de recherche *in vitro* et *in vivo* ont démontré qu'un grand nombre de micronutriments alimentaires aident ainsi la cellule à stabiliser son métabolisme (THOMPSON, 1991; ZHANG et al., 1991). Ce sont les composés phénoliques, les caroténoïdes, les thiols, certaines vitamines (A,C,E), certains minéraux (sélénium, cadmium), acides gras insaturés (oméga 3) et autres composés qui possèdent ces propriétés anticancérigènes (NARISAWA et al., 1991; SINGLETARY et NELSHOPPEN, 1991b; STAHELIN et al., 1991; THOMPSON, 1991). Les vitamines E et C et le  $\beta$ -carotène, par exemple, inhibent le développement et diminuent l'incidence des cancers du côlon, de la peau, du foie et du pancréas, probablement en conjuguant les radicaux libres produits par l'hydroxydation cellulaire (APPEL, Et al., 1991; COLACCHIO et al., 1989; SZMURLO et al., 1991).

Les mécanismes internes par lesquels ces micronutriments naturels agissent sur le ralentissement de la prolifération du cancer ou sur la diminution de son incidence sont encore loin d'être élucidés. Wattenberg (WATTENBERG, 1985) a avancé l'hypothèse que ces substances anticancérigènes naturelles agiraient selon trois types de mécanismes; 1) soit en prévenant

directement la formation de produits cancérigènes ou de produits toxiques fabriqués par la cellule au cours de sa lutte contre les agents stressants; 2) soit en empêchant les agents oncogènes d'agir sur la cellule en inhibant leurs actions, en potentialisant les pouvoirs de détoxification de la cellule ou en la débarrassant des formes réactives des oncogènes; 3) soit en agissant comme agent suppresseur et préventif de l'expression des néoplasies lorsque la cellule est exposée à un composé cancérigène.

Des travaux ont également démontré que les mécanismes d'action de ces micronutriments alimentaires pourraient être inter-reliés et agir en synergie de différentes façons sur différents composés de la cellule hyperactivée. Leurs propriétés antioxydantes seraient l'un des mécanismes importants des micronutriments. Plusieurs de ces produits diminueraient les risques de transformation cellulaire et de déstabilisation de l'ADN causés par les produits toxiques en agissant sur les multiples produits de l'hydroxydation (radicaux libres). En réduisant de ce fait les risques de cancérisation, ils prolongeraient la vie et la santé de la cellule (SAHU et WASHINGTON, 1991; SINGLETARY et NELSHOPPEN, 1991b; STAHELIN et *al.*, 1991; THOMPSON, 1991; ZHANG et *al.*, 1991).

Certains composés phénoliques et alcaloïdes pourraient agir directement sur les molécules d'ADN déstabilisées

(cancéreuses) pour en limiter la réplication. Beljansky et al. (BELJANSKY, 1979) ont en effet démontré que l'ADN provenant des cellules cancéreuses se répliquait plus rapidement *in vitro* que l'ADN des cellules normales. Ces chercheurs ont observé qu'en présence de certains composés phénoliques et alcaloïdes, l'ADN des cellules cancéreuses revient à un taux de réplication presque normal (BELJANSKY, M. et BELJANSKY, M.S., 1984; LE GOLF et BELJANSKY, 1982).

#### 2.5.1 Généralités sur les mécanismes d'action

Les travaux réalisés jusqu'à ce jour avec d'autres micronutriments que les acides gras polyinsaturés suggèrent que plusieurs micronutriments naturels hydrosolubles et liposolubles possèdent des effets antioxydants. Il est en effet bien connu que les vitamines C, E et le  $\beta$ -carotène (précurseur de la vitamine A), sont de puissants antioxydants naturels (THOMPSON, 1991; TRIZNA et al., 1991; ZHANG et SEVANIAN, 1991; ZHANG et al., 1991) qui agissent en synergie et contribuent, comme les acides gras N-3 polyinsaturés, à réduire les produits de l'hyperoxydation cellulaire causée par l'hyperactivité des cellules agressées par les substances oncogènes ou toxiques (MORENO et al., 1991; NARISAWA et al., 1991).

Même si les civilisations passées reconnaissaient à certains aliments et/ou plantes des propriétés médicinales (Rosemarynus officinalis par exemple), ce n'est que tout

récemment que l'on a commencé à reconnaître sur une base scientifique les pouvoirs anticancérigènes et bénéfiques de certains micronutriments provenant des plantes, des fruits, des légumes et des épices (SINGLETARY et NELSHOPPEN, 1991a). C'est ainsi que plusieurs groupes de micronutriments naturels présents dans l'alimentation sont capables d'aider la cellule à se débarrasser des produits toxiques d'hydroxydation, comme les radicaux libres. Des résultats de travaux de recherche de plus en plus nombreux confirment chaque jour davantage que beaucoup d'autres micronutriments comme les composés phénoliques (flavonoïdes, tannins, indoles, leucoanthocyanes), les thiols, les trépénoïdes, les glucosides, etc., font partie de ces micronutriments essentiels parce qu'ils jouent un rôle actif dans le maintien de l'homéostasie de la cellule. Selon leur classe et leurs propriétés, ces micronutriments semblent plus ou moins puissants et agissent à différents niveaux du métabolisme cellulaire de détoxication.

En résumé, un nombre impressionnant de micronutriments interviennent a) en participant à l'inhibition de la peroxydation des lipides, comme les vitamines E et C; b) en activant les enzymes de détoxication; c) en prévenant la fixation des produits toxiques sur l'ADN; d) en diminuant la vitesse de prolifération cellulaire; e) en modifiant directement la structure de certains mutagènes pour les rendre moins puissants; f) en agissant directement et spécifiquement

sur l'ADN des cellules cancéreuses pour ralentir leur développement sans affecter les cellules normales, comme le font certains alcaloïdes (BELJANSKY, M. et BELJANSKY, M.S., 1984; LE GOLF et BELJANSKY, 1982); g) en agissant comme stimulateur spécifique de la synthèse des cellules immunitaires, comme le font certains brins d'ARN bactériens (BELJANSKY et al., 1980).

Des concentrations trop élevées de prooxydants dans la cellule engendrent une dégénérescence prématurée de celle-ci (ZHANG et SEVANI, 1991). Si, à l'inverse, on observe qu'un surplus d'antioxydants dans la cellule améliore la longévité de celle-ci, c'est possiblement parce qu'elle devient plus résistante à l'oxydation (RUSTING, 1993).

D'autres micronutriments tels que les antioxydants phénoliques en général sont également capables d'accroître l'activité de certaines enzymes de détoxification intracellulaire comme la glutathion-s-transférase, l'époxyde hydrolase et la NAD(P)-H-quinone réductase (SINGLETARY et NELSHOPPEN, 1991b). Les aliments contenant des aminothiols tel que le glutathion, une substance naturelle, ou le N-acétyl-cystéine (synthétique), peuvent réguler l'activité cellulaire en augmentant ou en diminuant, selon le cas, l'activité de certaines enzymes cellulaires (DE FLORA et al., 1991). Ces molécules peuvent aussi modifier la structure de certains composés cancérigènes,

comme le N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG), à l'extérieur de la cellule, probablement en liant l'ion carbone du MNNG avec l'eau pour former du méthanol (DE FLORA et al., 1991). L'ion carbone étant nécessaire à l'activité mutagène du composé, il devient moins dangereux pour l'organisme. Cette réaction chimique peut se produire autant en milieu neutre qu'acide. Lorsqu'elle se produit dans le tube digestif, cette réaction diminue les risques de cancer gastro-intestinal (DE FLORA et al., 1991).

#### **2.5.2 Classification des micronutriments pouvant avoir un rôle dans la prévention et possiblement le traitement du cancer**

On peut classer les micronutriments naturels en six catégories, selon leur aspect moléculaire et leurs activités anticancérigènes possibles.

- 1) a) Les produits qui interviennent sur la valeur énergétique de la diète;  
b) les acides gras insaturés.
- 2) Les antioxydants naturels de l'alimentation.
- 3) Les vitamines et leurs précurseurs.
- 4) Les minéraux.
- 5) Les acides nucléiques et leurs dérivés.
- 6) Certains produits provenant des plantes médicinales et autres.

#### 2.5.2.1.1 Contenu énergétique de la diète et cancer

Il y a quelques années, la littérature scientifique parlait beaucoup plus de l'effet de la quantité d'énergie ingérée que du type d'aliments consommés, en tant que moyen pour contrôler l'incidence des cancers (GROSS, 1988; LOK et al., 1988; SINHA et al., 1988). Des expériences plus récentes sur l'effet de la restriction des diètes, effectuées chez le rat et la souris, ont démontré qu'une restriction calorique de la diète diminue significativement l'incidence des cancers induits chimiquement. Une diminution de 20 à 25% de la ration quotidienne de nourriture réduit de 52 à 58% l'incidence des cancers, sans entraîner d'anomalies physiologiques, tant chez les mâles que chez les femelles (GROSS, 1988; LOK et al., 1988; SINHA et al., 1988). Des restrictions de la ration quotidienne de l'ordre de 35 à 40 % favorisent une baisse d'incidence des néoplasies induites chimiquement, mais entraînent également des déséquilibres hormonaux et physiologiques (SINHA et al., 1988). En utilisant la thymidine tritiée comme index mitotique, on a observé chez ces animaux une diminution marquée de la prolifération cellulaire et de la synthèse d'ADN (LOK et al., 1988; SINHA et al., 1988). Ces expériences suggèrent donc fortement qu'en ralentissant la prolifération cellulaire par réduction de l'apport alimentaire, on ralentit aussi l'évolution des néoplasies.

Certains composés cancérigènes comme le 1-nitropropane n'augmentent pas le taux d'ions superoxydes, de radicaux hydroxyles ou de peroxyde d'hydrogène dans la cellule, mais sont capables d'activer le taux de prolifération cellulaire (CUNNINGHAM et MATTHEWS, 1991). Les travaux suggèrent donc l'existence d'un lien intéressant entre l'augmentation de la prolifération cellulaire et l'apparition de cellules tumorales (CUNNINGHAM et MATTHEWS, 1991). En effet, on sait depuis longtemps que plus une cellule est amenée à se diviser fréquemment (cellules des muqueuses par exemple), plus elle a de chance de muter en cellule tumorale. Il se pourrait que des produits comme le phorbol-12-miristate-13-acétate (PMA) et le N,N-diéthyl-2-[4-(phénylméthyl)phénoxy] éthanamine HCl, qui accroissent l'activité mitotique d'environ 7.5 fois, augmentent aussi la prolifération des tumeurs (BRANDES et al., 1991). Il semble donc qu'une prolongation de la phase de latence avant la division cellulaire permettrait de diminuer les risques de mutation cellulaire.

#### 2.5.2.1.2 Acides gras insaturés et cancer

Des observations scientifiques ont amené les chercheurs à étudier plus spécifiquement les propriétés anticancéreuses des acides gras sur les fonctions membranaires des cellules, plutôt que d'étudier l'effet de l'apport énergétique de ces composés dans l'organisme. On a ainsi observé que certains acides gras insaturés possèdent des effets anticancérigènes sur les

organismes vivants. Les acides gras N-3 polyinsaturés, comme l'acide  $\alpha$ -linoléique, diminuent l'incidence et la prolifération du cancer du côlon (NARISAWA et al., 1991). Il semble de plus en plus évident que l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA), extraits des huiles de poissons, possèdent des propriétés anticancérigènes naturelles (DEBRAVO et al., 1991; NARISAWA et al., 1991). D'autres acides gras par contre, comme les acides gras N-6 polyinsaturés, l'acide linoléique par exemple, augmenteraient les risques de cancer (NARISAWA et al., 1991). L'acide linoléique est le précurseur de l'acide arachidonique, à partir duquel sont formés les eicosanoïdes comme les prostaglandines, les tromboxanes et les leucotriènes, hormones connues dans les processus inflammatoires. Les acides gras (N-6) polyinsaturés agissent aussi comme promoteur de la prolifération des cellules cancéreuses, soit en altérant la prolifération des lymphocytes du système immunitaire, soit en inhibant les cellules NK (natural killer), les macrophages ou d'autres cellules très spécialisées du système immunitaire, impliquées dans la réponse immunitaire anticancéreuse (DEBRAVO et al., 1991; NARISAWA et al., 1991).

Narisawa et al., 1991 (NARISAWA et al., 1991), pensent que l'acide  $\alpha$ -linoléique rivalise avec l'acide linoléique pour s'incorporer dans les phospholipides membranaires de plusieurs cellules. Cette compétition diminue le taux de production des

dérivés eicosanoïdes et contribue à stabiliser la membrane contre l'agression des carcinogènes chimiques (NARISAWA et al., 1991). La peroxydation des acides gras membranaires résultant de l'hyperactivité cellulaire diminuerait lorsque des acides gras N-3 polyinsaturés sont incorporés dans les phospholipides de la membrane cellulaire, parce qu'ils sont plus difficilement oxydables.

Toutes ces recherches semblent indiquer que les acides gras N-3 polyinsaturés possèdent une action préventive dans la cancérisation, en protégeant les membranes cellulaires contre une éventuelle peroxydation des lipides. Ces acides gras peuvent également contribuer à maintenir et à assurer des réponses immunes cellulaires plus efficaces pour éliminer les cellules cancéreuses (DEBRAVO et al., 1991; NARISAWA et al., 1991). Toutes ces expériences suggèrent que ces acides gras naturels sont des micronutriments immunomodulateurs capables de stimuler le système immunitaire. D'autres mécanismes interviendraient puisque des acides gras comme le c9-t11-octadécadiénoïque, qui ne diminuent pas la peroxydation des lipides et n'augmentent pas non plus l'activité des enzymes de détoxification, réussissent tout de même à stabiliser la cellule et à diminuer de 30 à 50% l'incidence de cancers du sein dans les modèles animaux (IP et al., 1991).

#### 2.5.2.2 Antioxydants naturels de l'alimentation

On commence à reconnaître que les composés phénoliques et certains alcaloïdes possèdent des propriétés biologiques inestimables pour la santé cellulaire. On retrouve dans les plantes et les micronutriments une gamme étendue de phénols simples et de leurs dérivés, des flavonoïdes (ex: quercetin, kaempférol) et des proanthocyanidols (ex: catéchine, épicatechine) ainsi que des flavanoïdes et des tannins (hydrolysables et non-hydrolysables) (LACROIX, 1986). Les études scientifiques permettent maintenant d'identifier chez certains de ces métabolites des propriétés antioxydantes (MASQUELIER et al., 1979; MITJAVILA et al., 1990; STARVIC et MATULA, 1988), antimicrobiennes (BASHIR et al., 1990; LACROIX et al., 1990), antivirales (STARVIC et MATULA, 1988; VALANT-VETSCHERA et WOLLENWEBER, 1990) et anticancéreuses et/ou antitumorales (TOYOTA et al., 1990). Des expériences *in vitro* suggèrent que certains phénols, comme l'acide ellagique ou le kaempférol, peuvent inhiber la mutagénécité des hydrocarbures aromatiques polycycliques comme le benzo[a]pyrène en présence d'enzymes microbiennes (CHANG et al., 1985). D'autres travaux *in vitro* ont démontré que certains composés naturels, comme le naringénin, posséderaient aussi des effets protecteurs contre la peroxydation des lipides (STARVIC et MATULA, 1988).

#### 2.5.2.2.1 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques présents dans les plantes, les fruits et les légumes à l'état naturel. Plusieurs flavonoïdes contenus dans ces aliments sont capables d'inhiber l'activité de certaines enzymes cellulaires, comme la 5-lipooxygénase et/ou la cyclo-oxygénase, dépendamment de la molécule, en coupant une courte chaîne du radical actif de l'enzyme (LAUGHTON et al., 1991). La vitamine E pourrait aussi avoir une action à ce niveau (LAUGHTON et al., 1991).

#### 2.5.2.2.2 Les thiols

Les thiols font aussi partie de cette gamme de micronutriments alimentaires qui seraient utiles pour détoxiquer les cellules hyperactivées. On a observé, à titre d'exemple, que les thiols peuvent ralentir la vitesse de prolifération cellulaire et ainsi contribuer à diminuer les risques de mutation génétique, semble-t-il, en allouant plus de temps à l'ADN pour se réparer et/ou se diviser de façon adéquate (DE FLORA et al., 1991).

#### 2.5.2.3 Les vitamines et leurs précurseurs

Plusieurs vitamines et précurseurs vitaminiques se retrouvent dans nos aliments en plus ou moins grande concentration, tel que la vitamine E, C et le  $\beta$ -carotène lesquels possèdent des propriétés multiples et bénéfiques pour les cellules. La vitamine A et de nombreux rétinoïdes ne sont pas

considérés uniquement comme des agents antioxydants et possèdent des effets anticancérigènes évidents, observés scientifiquement. La vitamine A peut, à titre d'exemple, diminuer l'index mitotique (BABA et al., 1991) et la différenciation cellulaire (KNEKT et al., 1991). Si l'on sait que les vitamines et leurs précurseurs vitaminiques agissent souvent comme antioxydants protégeant ainsi la cellule contre les radicaux oxygènes libres produits au cours de l'hyperactivation de la cellule, on reconnaît maintenant à certains micronutriments la propriété de modifier la structure chimique de certains composés cancérigènes et même de ralentir la prolifération cellulaire (BABA et AL, 1991; MORENO et al., 1991; SZMURLO et al., 1991). On a identifié plus de 600 composés caroténoïdes en provenance des aliments et 10 à 20% d'entre eux sont des précurseurs de la vitamine A (MORENO et al., 1991; ZHANG et al., 1991). À titre d'exemple, le  $\beta$ -carotène est un précurseur de la vitamine A alors que l' $\alpha$ -carotène n'en est pas un. Les effets anticancérigènes de certaines molécules, antioxydantes ou non antioxydantes, de cette famille sont parfois semblables.

Certaines molécules comme l' $\alpha$ -tocophérol et les carotènes non provitamines A, inhibent plus fortement la peroxydation cellulaire que le  $\beta$ -carotène et la vitamine A. On croit cependant que tous les composés caroténoïdes semblent posséder

un pouvoir d'inhibition plus ou moins important sur la peroxydation des lipides (ZHANG et al., 1991).

On a observé que la vitamine E et le  $\beta$ -carotène possèdent d'autres propriétés bénéfiques intéressantes pour la cellule. Ils agissent aussi comme vidangeurs des produits d'oxydation de la cellule en la débarrassant des radicaux oxygènes libres et de plusieurs autres produits de biodégradation métabolique (MORENO et al., 1991; STAHELIN et al., 1991; SZMURLO et al., 1991; THOMPSON, 1991; ZHANG et al., 1991). La neutralisation des produits d'oxydation contribuerait de deux façons à la prévention des cancers: 1) en inhibant les produits oxydatifs qui ont eux-mêmes des activités tumorigènes et 2) en favorisant les communications intercellulaires (ZHANG et al., 1991). Par exemple, les nitrosamines que l'on retrouve dans la nourriture, les boissons, les médicaments, etc., sont des molécules oncogéniques qui ont besoin d'être modifiées chimiquement pour exercer leurs pouvoirs oncogènes (DARNELL et al., 1988; SCHULLER, 1991; STAHELIN et al., 1991; TRIZNA et al., 1991). Les nitrosamines peuvent induire des transformations de l'ADN de différentes façons (DNA adducts) comme, par exemple, en modifiant les enzymes de réparation de l'ADN ou l'expression des protooncogènes (DARNELL et al., 1988; SCHULLER, 1991). On a démontré que les vitamines C et E empêchent les transformations métaboliques des nitrosamines dans l'estomac, diminuant ainsi leur mutagénéicité et les risques de cancers

gastro-intestinaux (STAHELIN et al., 1991; TRIZNA et al., 1991). Le  $\beta$ -carotène, semble-t-il, a également des effets sur le métabolisme des substances cancérigènes (MORENO et al., 1991).

Par ailleurs, une relation intéressante entre l'augmentation de la communication intercellulaire et la diminution des transformations néoplasiques a été observée *in vivo*. Plusieurs produits cancérigènes aussi présents dans l'alimentation possèdent des effets bloqueurs sur la communication intercellulaire (ZHANG et al., 1991), alors que les caroténoïdes et les rétinoïdes ont, à l'opposé, l'effet d'augmenter la communication entre les cellules (ZHANG et al., 1991). Il semble donc qu'en plus de prévenir la peroxydation, ces molécules à qui l'on a attribué une fonction antioxydante pourraient aussi être dotées de plusieurs autres propriétés comme d'aider la cellule à se débarrasser des métabolites d'oxydation, détoxiquer les toxines, modifier la structure chimique de certains composés cancérigènes ou empêcher leur formation.

Des études ont aussi suggéré que le  $\beta$ -carotène et la vitamine A possèdent la propriété de pouvoir stimuler la formation de néovaisseaux sanguins à l'intérieur des tumeurs de façon à permettre aux éléments de la réponse immunitaire de venir attaquer les cellules cancéreuses de l'intérieur (SZMURLO

et al., 1991). Plusieurs réponses immunes peuvent aussi être potentialisées par les acides rétinoïques, semble-t-il par le biais d'une augmentation de l'interleukine-2, une lymphokine qui stimule les lymphocytes T à produire d'autres cellules immunes pour détruire les cellules cancéreuses (BABA et al., 1991). C'est surtout à cause de la démonstration de ces nouvelles propriétés que les rétinoïdes sont actuellement utilisés dans l'immunothérapie naturelle anticancéreuse. On a aussi rapporté que la vitamine A possédait un pouvoir antimittotique, un pouvoir de diminution de la différenciation cellulaire, d'inhibition de certaines enzymes comme l'ornithine décarboxylase et de modulation de l'activité de la protéine kinase C (BABA et al., 1991; KNEKT et al., 1991).

#### 2.5.2.4 Les minéraux

Les minéraux sont essentiels à l'activité d'une foule d'enzymes cellulaires. Les minéraux les plus étudiés pour leurs effets anticancérigènes sont le sélénium, le cadmium et le platine.

Le sélénium agit comme un antioxydant par l'intermédiaire d'une enzyme. Il s'incorporerait au site actif de la glutathion peroxydase pour en augmenter l'efficacité (THOMPSON, 1991). La glutathion peroxydase est une enzyme dont la spécificité est de réagir avec le peroxyde d'hydrogène pour former de l'eau et de l'oxygène moléculaire, une réaction qui diminue le taux de

peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) dans la cellule. On se souviendra que le  $H_2O_2$  disponible dans la cellule pourrait réagir avec l'ion superoxyde et le fer trivalent et ainsi, contribuer à la formation de radicaux hydroxyles (THOMPSON, 1991). Les risques de dommages à l'ADN et à l'ensemble de la cellule par les produits oxydatifs sont donc aussi contrôlés par le sélénium, par le biais de la glutathion peroxydase. On a démontré, chez l'animal, qu'une déficience en sélénium accélère l'apparition des tumeurs mammaires (THOMPSON, 1991). On a observé de plus que le sélénium et la vitamine E agissent en synergie dans la prévention de ces cancers (THOMPSON, 1991). Il faut mentionner que le sélénium n'est pas reconnu comme un élément toxique pour l'organisme.

Le cadmium est un métal lourd toxique capable d'initier et même de promouvoir le développement de plusieurs types de cancers. Par contre, le cadmium peut aussi diminuer l'incidence des cancers du foie et du poumon induit par d'autres composés cancérogènes, sans provoquer de lésions au foie ou aux testicules (WAALKES et al., 1991). Ces phénomènes sont directement reliés aux concentrations de cadmium utilisées. Les concentrations élevées s'avèrent toxiques, alors que des concentrations physiologiques permettent la prévention du cancer. La métallothionéine est une protéine capable de séquestrer le cadmium, aussi bien que d'autres métaux toxiques, tout en diminuant, du moins en partie, ses effets toxiques sur

l'organisme (WAALKES et al., 1991). L'action du cadmium s'exerce probablement par un ralentissement général de la croissance de l'organisme et des cellules tumorales. Quoiqu'il en soit le cadmium est un élément anticancérigène qui n'en possède pas moins des propriétés toxiques.

Le platine est un autre métal lourd incorporé dans la confection de certains médicaments utilisés en chimiothérapie, notamment dans le cisplatine et le carboplatine. Ces médicaments s'attaquent aux tumeurs solides grâce aux propriétés antitumorales du platine (TRESKES et al., 1991). Ils sont hautement néphrotoxiques et myélotoxiques (TRESKES et al., 1991).

#### 2.5.2.5 Les acides nucléiques et leurs dérivés

L'ADN des cellules cancéreuses est différent de celui des cellules normales. Un des premiers changements se manifeste par l'activation intrinsèque d'un protooncogène, en oncogène, à la suite d'une transformation induite par un agent, un virus, ou un produit du métabolisme cellulaire cancérigène (DARNELL et al., 1988). Ces premières mutations de l'ADN expliquent en partie la réplication plus rapide de la cellule cancéreuse par rapport à la cellule normale. Les tests de mutagénéicité comme le test de Ames, le test UmU et celui de Beljansky (BELJANSKY, 1979) ont pour objectifs de déceler ces minimes anomalies dans la réplication de l'ADN et de détecter les substances ou

composés capables de déstabiliser l'ADN (les substances mutagènes).

Beljansky (BELJANSKY et al., 1980) a aussi démontré que des fragments d'ARN provenant de l'Escherichia coli (les RLB: Remontent-Leucocytes-Beljansky) sont capables de stimuler la réplication de l'ADN de cellules normales sans augmenter celle de l'ADN des cellules cancéreuses. Ce sont les lymphocytes et les mégacaryocytes normaux qui sont les plus stimulés par ces fragments d'ARN et qui permettent d'augmenter la survie des patients à la suite d'une chimiothérapie, ou de diminuer les effets secondaires de ces médicaments (LECOMTE, 1991). Il semble donc que ces fragments d'ARN alimentaires ou bactériens (yogourt) sont capables, jusqu'à un certain point, de diminuer la réplication de l'ADN des cellules cancéreuses, en agissant comme des ARN antisens pour bloquer les gènes promoteurs de la réplication de ces cellules. Ainsi, les RLB agissent en stimulant fortement la réponse immunitaire comme un adjuvant non toxique de l'immunité et en diminuant un peu la prolifération des cellules cancéreuses, deux mécanismes qui se potentialisent (BELJANSKY et al., 1980).

Certaines bactéries lactières comme les Bifidobactéries, le Lactobacillus acidophilus, le Lactobacillus bulgaricus et le Streptococcus thermophilus sont reconnues pour leur action protectrice contre les infections intestinales, la prévention

des tumeurs et de l'accumulation chronique de substances toxiques (HUGHES et HOOVER, 1991). Ces bactéries jouent un rôle dans la prévention du vieillissement et l'accélération de la mortalité, selon trois types d'actions probables: 1) en favorisant l'élimination des procarcinogènes de façon directe; 2) en favorisant l'élimination des procarcinogènes de façon indirecte; 3) en augmentant la réponse immunitaire (HUGHES et HOOVER, 1991). Il semble que la réponse immune puisse aussi être stimulée par les fragments d'ARN de ces bactéries de la même façon que les RLB agiraient.

#### 2.5.2.6 Certains produits provenant des plantes médicinales et autres

On a observé au cours des temps que plusieurs plantes utilisées dans les pharmacopées tribales seraient bénéfiques contre le cancer à cause de leurs pouvoirs antioxydants. Certaines sont facilement accessibles et sont reconnues pour leur importante concentration en composés polyphénoliques. C'est le cas des feuilles de Tibouchina semidecandra de la famille des Melastomataceae, utilisées à des fins médicinales en Chine, en Malaisie et en Indonésie (YOSHIDA et al., 1991). Le thé vert (OTAKE et al., 1991), les grains de café vert (CHAE et al., 1991) et des extraits de Rosemarynus officinalis L. (SINGLETARY et NELSHOPPEN, 1991a) possèdent également des composés ayant des propriétés antioxydantes et plusieurs sortes de vitamines que l'on sait maintenant actives dans la

prévention des cancers ou la neutralisation des composés oncogènes. Des alcaloïdes de la Rauwolfia ont été rapportés comme capables de s'attaquer spécifiquement à l'ADN des cellules cancéreuses (BELJANSKY, M. et BELJANSKY, M.S., 1984).

## 2.6 REMARQUE

Il est intéressant de souligner que dans la plupart des expériences scientifiques rapportées on utilise des doses beaucoup plus grandes que les doses physiologiques retrouvées dans l'alimentation. Par exemple, on rapporte que le gamma-orysanol augmente le cancer du poumon, mais il faut prendre en considération que cet effet se manifeste à des doses de 100 à 150 fois plus grande que les doses thérapeutiques qui, elles, sont plus grandes que les doses physiologiques (HIROSE et al., 1991). Le BHT est un antioxydant puissant utilisé comme additif alimentaire et de façon très répandue. La consommation moyenne de l'humain en BHT est de 10 ppm / jour. Hors, à des doses 600 fois plus grandes par jour chez le rat, il est cancérigène.

## 2.7 MESURE DES PROPRIÉTÉ ANTIOXYDANTES

Nous présenterons maintenant différentes méthodologies utilisées pour mesurer les propriétés antioxydantes. Plusieurs types de techniques servent à mesurer les propriétés antioxydantes de différents composés chimiques. Elles sont basées entre autre sur soit: 1) la dégradation du déoxyribose

avec ou sans enzymes; 2) les mesures polarographiques qui utilisent des enzymes pour produire des radicaux libres; 3) la dégradation de l'ADN évaluée par de la chromatographie en phase gazeuse; ou 4) la peroxydation non-enzymatique des microsomes de foie de rat.

### 2.7.1 Dégradation du déoxyribose

La méthode de mesure par la dégradation du déoxyribose se déroule en présence de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et de fer pour générer l'anion hydroxyle ( $OH^\cdot$ ) qui dégrade le déoxyribose (LAUGHTON et al., 1989). On dose la dégradation du déoxyribose par colorimétrie à l'aide de l'acide thiobarbiturique et on extrait le chromogène avec du butane-1-ol. En présence d'un composé antioxydant, la dégradation du déoxyribose est diminuée ainsi que la coloration. Cette méthode, peut aussi utiliser de la xanthine oxydase et son substrat (la xanthine) pour accélérer l'oxydation du déoxyribose, car la réaction enzyme-substrat produit entre autre l'anion superoxyde ( $O_2^\cdot$ ) (HALLIWELL et al., 1987; HALLIWELL et GUTTERIDGE, 1981).

La méthode de dégradation du déoxyribose ne permet pas d'utiliser de solvant organique comme l'éthanol car ces solvants sont fortement vidangeurs du radical hydroxyle ( $OH^\cdot$ ) (LAUGHTON et al., 1989). Ces techniques ne permettent donc pas de mesurer le pouvoir antioxydant des composés lipophiles ce qui les limite. Cette limitation étant importante pour l'étude

que nous voulions réaliser, nous avons décidé de ne pas utiliser cette méthode.

### 2.7.2 Mesures polarographiques

Les mesures polarographiques qui utilisent des enzymes pour produire des radicaux libres servent également à déterminer la puissance d'un antioxydant. L'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) est généré par la réaction enzymatique de la xanthine oxydase sur la xanthine (DARMON et al., 1990a). La cinétique de formation de l'anion superoxyde, est suivie par la mesure de consommation nette d'oxygène à l'aide de la polarographie et d'une électrode au mercure (DARMON et al., 1990b). Une fois la xanthine oxydée complètement, l'ajout de catalase permet d'évaluer la quantité de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) formé en mesurant, par polarographie, l'oxygène libéré lors de la réaction enzymatique (DARMON et al., 1990a). On considère qu'un produit a un effet vidangeur ou antioxydant sur l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) si ses effets sur la consommation ou la libération d'oxygène sont contrecarrés en présence de superoxydes dismutases, sinon on attribue les effets de diminution de consommation ou de libération d'oxygène à un effet inhibiteur sur la xanthine oxydase (DARMON et al., 1990a).

### 2.7.3 Dégradation de l'ADN

La technique utilisée par Aruoma et al, 1989, est basée sur l'oxydation causée à l'ADN par le radical hydroxyle ( $\text{OH}^\cdot$ ). On quantifie certains produits de dégradation de l'ADN comme la thymine glycol, la 5,6-dihydroxycytosine ou encore la 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine, par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (ARUOMA Et al., 1990; ARUOMA et al., 1989). Pour générer les radicaux hydroxyles ( $\text{OH}^\cdot$ ) on utilise du fer et du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

### 2.7.4 Peroxydation non-enzymatique des microsomes de foie de rat

La mesure de peroxydation non-enzymatique sur les microsomes de foie de rat est une méthode populaire pour évaluer le pouvoir antioxydant et l'inhibition des dommages d'oxydations causés aux membranes cellulaires (ARUOMA Et al., 1990; LAUGHTON et al., 1991; QUINLAN et al., 1988; WILLS, 1969b). Le principe de cette technique est de laisser oxyder des microsomes par le fer. On recommande de prélever des échantillons à intervalles réguliers lors de l'oxydation (WILLS, 1969a). Le produit de l'oxydation des membranes microsomiques, le malonaldéhyde, est dosé par colorimétrie en présence d'acide thiobarbiturique qui donne une couleur orangée (WILBUR et al., 1949; WILLS et WILKINSON, 1967). On conseille

ensuite d'extraire le chromogène formé à l'aide de butane-1-ol (QUINLAN et al., 1988).

Pour réaliser cette technique, il faut préalablement préparer des microsomes de foie de rat et sacrifier des rats âgés de 6 à 10 mois, prélever leur foie, l'homogénéiser (WILLS, 1969a) et, séparer les noyaux, les mitochondries et les lysosomes par la méthode de centrifugations successives de Aldridge (ALDRIDGE, 1957). Pour concentrer les microsomes on centrifuge à 100000 X g et on resuspend le culot contenant les microsomes (WILLS et WILKINSON, 1967). Il faut ensuite quantifier le contenu protéinique de la solution microsomale à l'aide de la méthode de Lowry (LOWRY et al., 1951) et l'ajuster à  $15.0 \pm 1.49$  mg de protéines / ml (WILLS et WILKINSON, 1967). On conseil également de quantifier le fer libre et le fer lié à l'hème présent dans la solution microsomale (WILLS, 1969c). La solution microsomale ainsi obtenue se conserve au maximum trois semaines à  $-20^{\circ}\text{C}$  (QUINLAN et al., 1988).

Toutes ces méthodes sont longues et/ou coûteuses, ou requièrent le sacrifice d'animaux. Elles ne permettent l'étude du pouvoir antioxydant que d'une petite quantité de produits à la fois car elles se font en éprouvette et se prêtent mal à la réalisation de nos objectifs de développer une méthode pour sélectionner rapidement plusieurs plantes, extraits de plante ou composés d'extractions pour leur pouvoir antioxydant.

Nos objectifs étant d'accélérer la sélection et la classification d'un grand nombre d'agents antioxydants hydrophiles et lipophiles et, pour éviter de prélever des tissus frais chez des animaux de laboratoire et ainsi éliminer des frais d'animalerie, nous avons développé une microtechnique de mesure du pouvoir antioxydant en plateau de 96 puits basé sur une modification de la technique de peroxydation non-enzymatique des microsomes de foie de rat. La microtechnique mise au point et décrite dans ce mémoire, utilise des liposomes d'acide linoléique en guise de substrat membranaire pour remplacer les microsomes de foie de rat. Le fer trivalent enclenche la peroxydation des membranes artificielles. Le malonaldéhyde formé par l'oxydation de l'acide linoléique causée par le fer, est révélé en colorimétrie par l'ajout d'acide thiobarbiturique qui donne une coloration orangée. Les résultats présentés ici décrivent cette microtechnique simple qui permet de mesurer rapidement et simultanément le pouvoir antioxydant de plusieurs substances en plateau de 96 puits. Les résultats d'activité antioxydante des substances étudiées seront exprimés en pourcentage par rapport aux résultats de contrôles positifs, la vitamine C pour les produits hydrosolubles et la vitamine E pour les produits liposolubles. Les contrôles négatifs sont l'eau distillée ou l'éthanol 95%, selon le cas.

## 2.8 TESTS DE MUTAGÉNÉCITÉ

Nous présenterons maintenant les technologies utilisées pour mesurer la mutagénéicité de différents composés chimiques. Les tests de mutagénéicité, comme 1) le test d'Ames (MARON et AMES, 1983) ou 2) le test Umu (ODA et al., 1985), sont extrêmement utiles pour étudier les propriétés mutagènes de différents produits chimiques par eux-mêmes (per se) ou par l'intermédiaire de leurs métabolites hépatiques, c'est-à-dire une fois digérés par les enzymes du foie.

### 2.8.1 Test de mutagénéicité de Ames

Le test de Ames (MARON et AMES, 1983) utilise généralement quatre souches bactériennes *Salmonella typhimurium* de catégories différentes pour étudier une substance car chacune de ces catégories sert à détecter un type de mutation différent. Par exemple, la souche TA102 est sensible au cross-linking, alors que la souche TA100 l'est à la substitution de pair de bases (MARON et AMES, 1983). De plus, chaque substance doit être étudiée, pour chacune des souches bactériennes, en absence et en présence de fraction S9. La fraction S9 est une fraction de foie de rat traité à l'Aroclor-1254 (MARON et AMES, 1983) et sert à étudier l'effet de la métabolisation hépatique sur les différentes substances à étudier, c'est-à-dire une fois ces substances digérées par les enzymes hépatiques. Un produit peut être mutagène par lui-même (mutagénéicité per se) ou encore par l'action de ces métabolites hépatiques. Le test de Ames est

très bien standardisé et très utilisé, mais il est long, dispendieux et se prête mal à l'étude d'une grande quantité de substances.

### 2.8.2 Test de mutagénéicité Umu

Le test Umu mesure l'activité de réparation de l'ADN codé par le système S.O.S. des cellules. Les gènes *umuC* et *sfiA* font partis du système S.O.S. de réparation de l'ADN. Ces derniers sont activés par les promoteurs *lexA* et *recA* (WHONG et al., 1986). La souche bactérienne test *Salmonella typhimurium* porte un plasmide en multicopies. Ce plasmide contient le gène de fusion *umuC-lacZ*, en plus d'un gène de résistance à l'ampicilline. Lorsque le système S.O.S. (*umuC*) de réparation de l'ADN est activé à la suite d'un dommage cellulaire, le *lacZ* produit de la  $\beta$ -galactosidase en quantité mesurable en colorimétrie. Ainsi, plus un produit est mutagène ou génotoxique, plus les bactéries produiront de  $\beta$ -galactosidase. La mesure de  $\beta$ -galactosidase indique le pouvoir mutagénique du produit. Le gène de résistance à l'ampicilline assure une pression de sélection positive pour forcer la souche bactérienne à conserver son plasmide, étant donné qu'elle est cultivée en présence de l'antibiotique.

Le test Umu est d'abord effectué en absence de fraction S9 pour déterminer si un produit est mutagénique par lui-même (per se). Les produits qui ne sont pas mutagènes d'eux-mêmes doivent

être réétudiés en présence de fraction S9 pour déterminer si leurs métabolites hépatiques sont également non-mutagènes.

### **2.8.3 Mesure du pouvoir antimutagène**

Au cours des expériences de mutagénéicité, nous utiliserons le test Umu pour étudier également si les produits naturels possèdent des effets inhibiteurs sur l'activité de produits mutagènes. Ainsi, nous voulons étudier si l'ajout d'un produit naturel inhibe l'activité mutagénique qu'a un composé mutagène sur ce modèle bactérien. L'inhibition de la mutagénéicité d'un produit sera mesurée à l'aide d'un composé mutagène en soi (sans fraction S9) comme le dichromate de potassium ou d'un composé mutagène par l'action de ses métabolites hépatiques, le quercetin. Voir partie 3.4 et plus spécifiquement 3.4.9 de la section matériel et méthode du présent document.

## **2.9 EN RÉSUMÉ**

Nous résumerons dans les prochaines lignes 1) le rôle des micronutriments dans le contrôle de la cancérisation cellulaire et 2) les technologies qu'il convient d'utiliser pour l'étude de certains de ces rôles qu'ont les micronutriments.

### **2.9.1 Rôle des micronutriments dans le contrôle de la cancérisation**

Les micronutriments qui possèdent des propriétés anticancérigènes, n'interviennent pas tous au même niveau du

développement des tumeurs. Nous avons mentionné plus tôt que certains micronutriments préviennent l'apparition des cancers, alors que d'autres sont plus efficaces pour inhiber les phases de promotion cellulaire, en passant par plusieurs moyens possibles d'intervention au niveau des mécanismes cellulaires de défense. Les études sur les effets synergiques de ces composés seront certainement une voie à exploiter dans l'avenir.

Il semble donc évident que les micronutriments alimentaires ont des rôles à jouer à plusieurs niveaux dans la prévention et même le traitement du cancer. Ces micronutriments agiraient par l'intermédiaire de différentes propriétés. Parmi les propriétés intéressantes dans le contrôle de la cancérisation et pour le maintien de la santé cellulaire, il y a les propriétés antioxydantes, antimutagènes, immunostimulantes, cytotoxiques pour les cellules cancéreuses, potentialisant le système de réparation cellulaire, réparatrices de l'ADN, modulatrices de la division cellulaire, potentialisant les communications inter-cellulaires ou capables d'inhiber le développement des métastases.

### 2.9.2 Les technologies

Nous utiliserons une microtechnique que nous avons développée sur la base de la peroxydation des microsomes de foie de rat pour étudier les propriétés antioxydantes de

différents produits et sélectionner les plus antioxydants. Nous utiliserons également le test Umu pour étudier la mutagénicité per se et la mutagénicité des métabolites hépatiques de ces mêmes produits. Le test Umu nous permettra également d'étudier les propriétés antimutagéniques per se et des métabolites hépatiques de ces produits sur l'activité mutagénique de composés mutagènes.

#### 2.10 HYPOTHÈSE DE TRAVAIL

Le groupe de travail sur la nutraceutique a émis l'hypothèse qu'il serait possible de développer des méthodologies simples pour mesurer les propriétés anticancéreuses des micronutriments alimentaires.

#### 2.11 OBJECTIF GÉNÉRAL

Développer des technologies susceptibles de nous permettre d'identifier et de sélectionner les micronutriments possédant une ou plusieurs des propriétés suivantes: antioxydantes, antimutagènes, immunostimulantes, cytotoxiques pour les cellules cancéreuses, stimulatrices du système de réparation cellulaire, réparatrices de l'ADN, etc.

**2.11.1 Nos objectifs spécifiques au cours de ce travail seront de:**

- Mettre au point différentes techniques pour permettre l'étude des différentes propriétés des micronutriments. Entre autres:

- Les propriétés antioxydantes
- Les propriétés antimutagéniques
- Les produits non-mutagènes

Nous laisserons à d'autres chercheurs le soin d'étudier:

- A) - Les propriétés réparatrices de l'ADN
- Les propriétés de cytotoxicité sur les cellules cancéreuses
  - Les propriétés d'immunostimulation
  - Les propriétés de modulation de l'activité de certaines enzymes cellulaire
- B) - La mise au point de modèles de cancérisation cellulaire pour étudier l'effet anticancéreux des micronutriments sur des cellules vivantes.
- C) - La synergie de ces différentes propriétés à l'aide des différentes technologies développées.

## 2.12 PLAN DE TRAVAIL

Le projet d'étude du groupe de recherche est vaste et diversifié. Ce mémoire de maîtrise représente une partie du projet du groupe multidisciplinaire et en voici la description.

Nous développerons une microtechnique de mesure d'activité antioxydante rapide effectuée en microplaque de 96 puits, basée sur la technique de peroxydation non-enzymatique des microsomes de foie de rat.

Cette microtechnique nous permettra d'étudier l'activité antioxydante de différents produits commerciaux purifiés et thérapeutiques et d'extraits de différentes épices.

Toutes ces substances seront étudiées à l'aide du test de mutagénéicité Umu en tube que nous avons mis au point pour étudier leur mutagénéicité en soi (per se) et leur mutagénéicité une fois digérées par les enzymes hépatiques.

Nous étudierons ensuite leur propriété d'antimutagénéicité en évaluant l'inhibition de l'activité mutagénique de composés mutagènes per se, le dichromate de potassium, et l'action mutagénique des métabolites hépatiques du quercetin.

Nous n'avons pas eu le temps d'étudier la synergie de ces différentes propriétés à l'aide des technologies que nous présenterons ici.

Les travaux de ce mémoire représentent donc une étape dans le projet multidisciplinaire sur la nutriceutique de l'IAF et relatent les problèmes techniques rencontrés lors des expérimentations.

### 3 MATÉRIEL ET MÉTHODE

Une description explicite du matériel et des différentes techniques utilisées sera présentée dans cette section. En premier lieu, il sera question de la mise au point de la microtechnique de mesure de l'activité antioxydante que nous avons développée. Nous parlerons ensuite du matériel et des méthodes utilisées pour étudier les propriétés antioxydantes de différents produits et extraits d'épices à l'aide de cette microtechnique. Finalement, nous présenterons les méthodes d'étude de la mutagénécité et de l'antimutagénécité de ces différents produits per se et de leurs produits de métabolites une fois digérés par les enzymes hépatiques.

### 3.1 MICROTECHNIQUE D'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE

Nous présentons ici la description de la mise au point et de l'utilisation de la microtechnique de mesure d'activité antioxydante que nous avons développée.

#### 3.1.1 Préparation des liposomes

Les liposomes sont formés par une méthode d'injection tel que décrite par Batzri et Korn, 1973, et Tyrrel et al., 1976. Cette méthode de préparation des liposomes d'acide linoléique se déroule de la façon décrite ci-dessous. L'acide linoléique (Anachemia) est mélangé dans de l'éthanol 95% et du tampon phosphate (20 mM pH 7,4), dans une proportion respective de 2:15:3 (V/V/V). Le mélange est injecté à l'aide d'une seringue

hypodermique et d'une aiguille fine (calibre 26) dans du tampon phosphate (20 mM pH 7,4), dans une proportion de 1:9 (V/V).

### 3.1.2 Préparation de l'acide ascorbique de base

L'acide ascorbique (Fisher, New Jersey, USA) est utilisé à faible concentration pour régénérer la boucle du fer, c'est-à-dire ramener le fer à un nombre de valance pour qu'il puisse oxyder à nouveau les acides gras. Le composé est solubilisé dans l'eau distillée à la concentration de 0,0031 g/ml.

### 3.1.3 Préparation du fer

Le  $\text{FeCl}_3$  (Sigma, St-Louis, USA) est dissous dans de l'eau distillée à une concentration de 4,3 mg/ml.

### 3.1.4 Préparation de la solution de sodium dodécyl sulfate (SDS)

Une solution de SDS (Molecular biology grade; Boehringer Mannheim, Montréal, Canada) est ajustée dans l'eau distillée afin d'obtenir une concentration de 10% (M/V). Le rôle du SDS est de contribuer à arrêter la réaction d'oxydation. L'ajout du SDS permet également d'éclaircir le milieu réactionnel en diluant les liposomes d'acide linoléique, permettant ainsi une bonne lecture de l'absorbance au spectrophotomètre.

### 3.1.5 Préparation de l'acide thiobarbiturique

L'acide thiobarbiturique est dissous dans l'eau distillée à la concentration de 0,67% (M/V). Ce composé sert de chromogène pour la réaction d'oxydation. En se couplant au malonaldéhyde formé par l'oxydation des liposomes et sous l'effet de la chaleur, une coloration orangée se développe.

### 3.1.6 Préparation de la solution de coloration

La solution de coloration est préparée quelques minutes avant son utilisation, en mélangeant la solution de SDS et d'acide thiobarbiturique dans un rapport 1:2 (V/V) respectivement.

### 3.1.7 Préparation des contrôles et des échantillons à analyser

L'eau distillée et l'éthanol 95% sont utilisés comme contrôles négatifs en fonction de la solubilité des produits à analyser (hydrosolubles vs liposolubles).

Les contrôles positifs sont la vitamine C pour les produits hydrosolubles et la vitamine E pour les produits liposolubles. Les produits analysés pour leurs propriétés antioxydantes et les contrôles positifs sont dissous dans l'eau distillée ou dans l'éthanol 95%, selon qu'ils sont hydrosolubles ou liposolubles. Les concentrations des produits à analyser et celle des contrôles positifs sont toutes ajustées à 1250 µg/ml. Des dilutions subséquentes sont effectuées afin

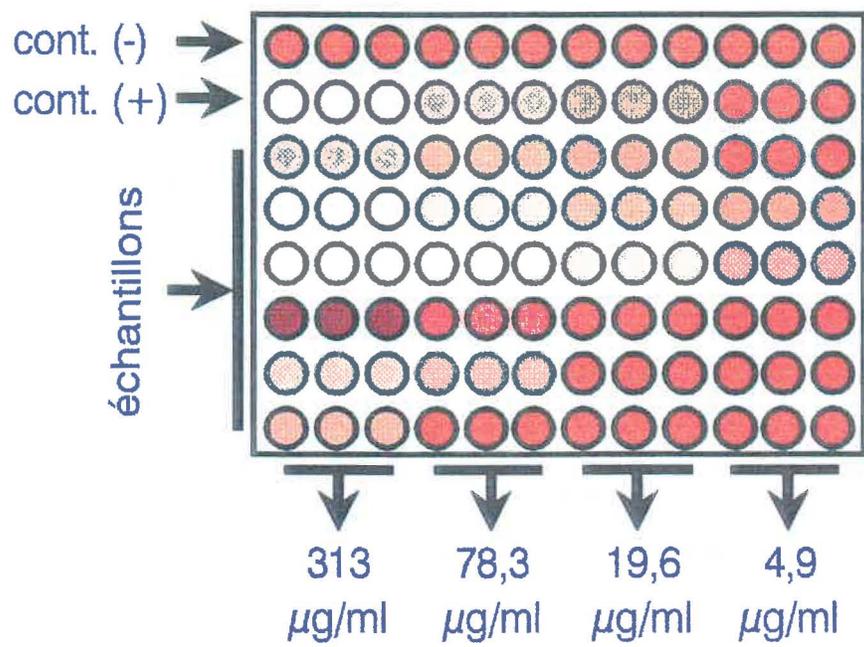
d'obtenir des concentrations de: 313, 78.3 et 19.6  $\mu\text{g/ml}$ . Ces quatre concentrations seront diluées un dans quatre (1/4) une dernière fois lors de la préparation du milieu réactionnel (section 3.1.9). Les concentrations finales auxquelles nous étudierons les propriétés antioxydantes des produits ainsi dilués, seront donc de: 313, 78.3, 19.6 et 4.9  $\mu\text{g/ml}$ .

### 3.1.8 Préparation de la plaque réactionnelle

La figure 1 présente les dispositions des concentrations en triplicata des contrôles positifs et négatifs, ainsi que celles des produits analysés dans l'expérience. Vingt-cinq  $\mu\text{l}$  de produits sont ajoutés dans chaque puits de chaque rangée. La première rangée de 12 puits de la microplaque réactionnelle contient le contrôle négatif approprié (l'eau ou l'éthanol). La seconde rangée sert à accueillir le contrôle positif approprié à différentes concentrations variant de 4.9 à 313  $\mu\text{g/ml}$ . Les contrôles positifs sont répartis en triplicata, à raison de 25  $\mu\text{l}$  dans chaque puits pour les quatre concentrations mentionnées ci-dessus.

Les échantillons à analyser sont répartis dans les six autres rangées de la microplaque, selon les mêmes dilutions que les contrôles positifs et à des concentrations finales identiques à leur contrôle positif. Ainsi, nous pouvons facilement comparer le pouvoir antioxydant des échantillons

Figure 1: Distribution des échantillons à l'intérieur d'une plaque. Chaque expérience contient 12 contrôles positifs et négatifs. Les contrôles positifs et les échantillons à analyser sont répartis en 4 concentrations, chacune en triplicata. Les contrôles négatifs (le solvant) est en 12 exemplaires à 0  $\mu\text{g/ml}$ .



avec celui de leur contrôle positif, pour chaque dilution et sur la même plaque de 96 puits.

### 3.1.9 Préparation du milieu réactionnel

La préparation du substrat réactionnel pour une plaque requiert le mélange de 4 ml de liposomes avec 2,25 ml de tampon phosphate (20 mM pH 7,4) et 250  $\mu$ l de solution d'acide ascorbique de base servant à régénérer la boucle du fer. La solution de substrat réactionnel ainsi obtenue, est ajoutée à raison de 65  $\mu$ l dans chaque puits de la microplaque. Chaque puits de la microplaque contenait déjà 25  $\mu$ l de contrôle négatif ou positif, ou encore des produits à analyser aux concentrations désirées. L'ajout de 10  $\mu$ l de solution de fer à chaque puits, permet d'enclencher la réaction d'oxydation. Ainsi tous les puits contiennent 100  $\mu$ l du mélange réactionnel final. Les échantillons et les contrôles ont donc subi une dilution de 1:4 pour obtenir des concentrations finales de 313, 78.3, 19.6 et de 4,9  $\mu$ g/ml.

Suite à l'ajout du fer, la plaque réactionnelle est incubée à 37°C pendant 15 minutes. Après l'incubation, 150  $\mu$ l de solution de coloration sont ajoutés dans chaque puits. La plaque réactionnelle est ensuite incubée à 80°C pendant 30 minutes pour permettre le développement de la coloration. Nous laissons la plaque réactionnelle reposer 30 minutes à la température de la pièce après l'incubation. L'absorbance de

chaque puits est mesurée par la suite à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre automatique à filtre (Microplate Autoreader EL 309, Bio-Tek Instruments). Les résultats de densité optique (D.O.) de chaque puits sont enregistrés automatiquement sur papier, à l'aide du même instrument.

#### **3.1.10 Élaboration d'une courbe standard**

Une courbe standard mettant en relation les D.O. obtenues par colorimétrie en fonction de la concentration de malonaldéhyde (Sigma, St-Louis, USA) est établie de la façon suivante. Des solutions de malonaldéhyde ayant des concentrations finales variant entre 0,1 mM et 15 mM dans du tampon phosphate (20 mM pH 7,4), sont mises en présence 150  $\mu$ l de solution de coloration. Les incubations et les lectures d'absorbance sont effectuées comme décrit à la section précédente (section 3.1.9). Cette courbe standard permet de déterminer pour quelles D.O. la relation est linéaire entre la concentration de malonaldéhyde et les D.O.. Toutes les D.O. obtenues hors de cette droite sont rejetées.

#### **3.1.11 Activité antioxydante d'un produit**

Les D.O. mesurées au spectrophotomètre sont transformées mathématiquement par la formule suivante (LESSARD et al., 1995) en pourcentage d'activité antioxydante. Cette formule tient compte des contrôles positifs et négatifs et permet d'éliminer les variations techniques journalières et dans le temps.

$$\frac{((\text{moy. D.O. cont. nég.}) + (\text{E.T. D.O. cont. nég.})) - (\text{D.O. de l'échant. à une concent. donnée})}{((\text{moy. D.O. cont. nég.}) + (\text{E.T. D.O. cont. nég.})) - (\text{moy. D.O. cont. positif à } 313 \mu\text{g/ml})} \times 100 = \text{\% d'activité anti-oxydante}$$

où: moy. D.O. cont. nég. = moyenne des D.O. des contrôles négatifs.

E.T. D.O. cont. nég. = écart type des D.O. des contrôles négatifs.

moy. D.O. cont. positifs à 313  $\mu\text{g/ml}$   
 = moyenne des D.O. des contrôles positifs à 313  $\mu\text{g/ml}$ .

D.O. de l'échant. à une concent. donnée  
 = la valeur de D.O. de l'échantillon à étudier à une concentration donnée.

Le pourcentage d'activité antioxydante d'une substance étudiée est obtenu par rapport aux contrôles positifs et négatifs pour chaque concentration. L'ajout de l'écart type des contrôles négatifs à la moyenne de ces mêmes contrôles permet d'éliminer une partie des variations techniques journalières. Les pourcentages d'activité antioxydante d'un produit analysé obtenus pour ses différentes concentrations, permettent d'établir une courbe d'activité antioxydante. La courbe d'activité antioxydante d'un produit peut être superposée à celles de ses contrôles positifs pour les comparer sur la base de concentrations identiques.

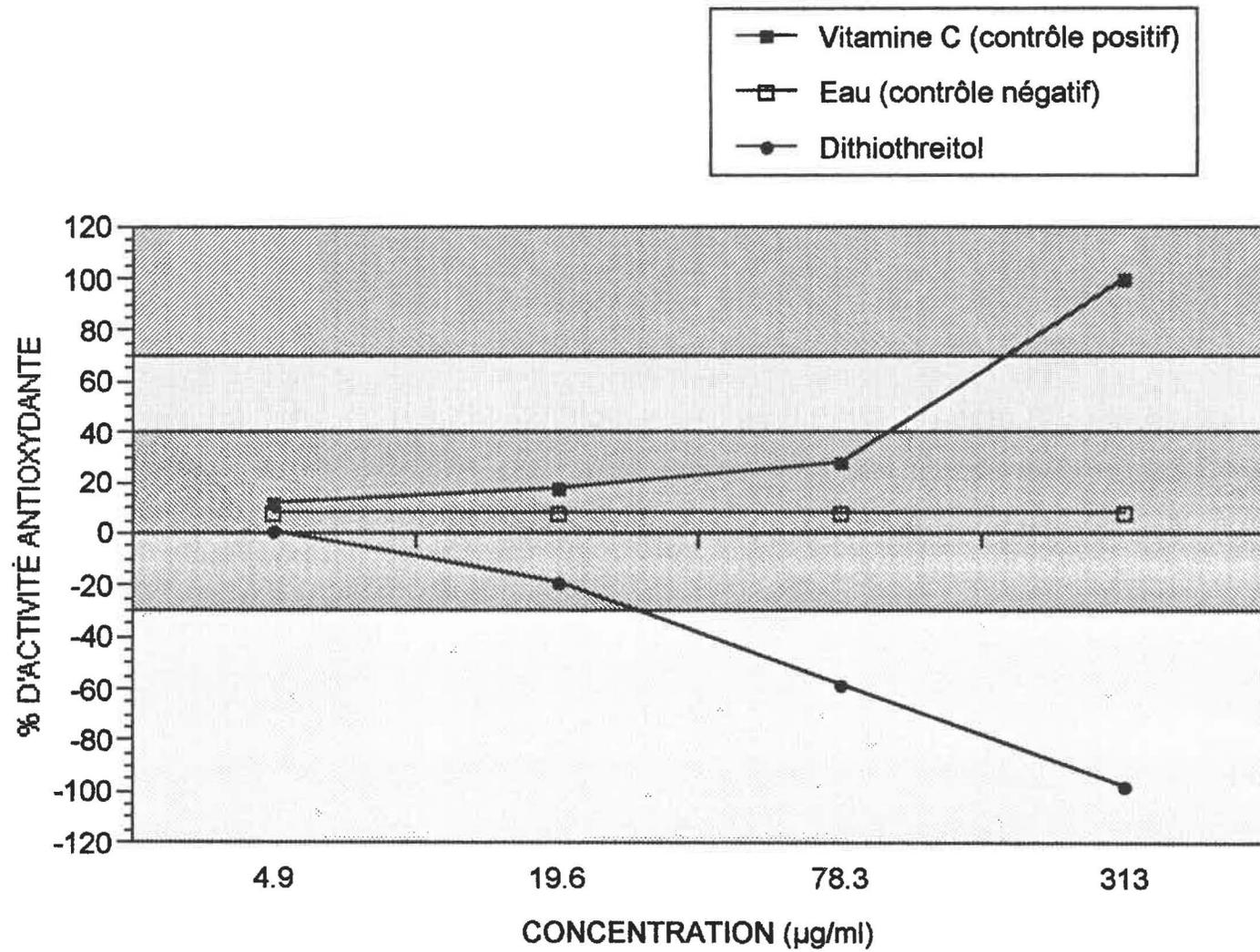
L'activité antioxydante d'un produit est un pourcentage calculé par rapport à ses contrôles positifs et négatifs. Cela signifie qu'il est possible que le pourcentage d'activité antioxydante d'un produit donné soit supérieur à 100% si le produit est plus antioxydant que son contrôle positif. De la même façon, le pourcentage d'activité antioxydante d'un produit donné peut être inférieur à 0%, si il est plus oxydant que son contrôle négatif.

### **3.1.12 Force antioxydante d'un produit**

La force antioxydante d'un produit est déterminée à une concentration donnée, par la comparaison du pourcentage d'activité antioxydante avec l'étalon de détermination de la force antioxydante (figure 2). Un antioxydant fort est un produit dont l'activité antioxydante est supérieure ou égale à 70%. Un produit antioxydant de force moyenne possède une activité antioxydante entre 40% et 70%. Un produit est considéré neutre au niveau de la force antioxydante, si son activité antioxydante se situe entre -30% et 40%. Et, il est oxydant si son activité antioxydante est inférieure à -30%.

On peut déterminer la force antioxydante d'un produit pour chacune des concentrations auxquelles on a déterminé son activité antioxydante. Par contre, nous nous limiterons à déterminer la force antioxydante d'un produit seulement à la concentration la plus forte à laquelle il est étudié: soit à

Figure 2: Étalon de détermination de la force antioxydante d'un produit à partir de son activité antioxydante exprimé en pourcentage de celle de ses contrôles positifs et négatifs. L'activité antioxydante d'un antioxydant fort est supérieure à 70%, et celle d'un antioxydant de force moyenne est situé entre 40% et 70%. Pour une activité situé entre -30% et 40%, on parlera d'un produit neutre (ni antioxydant, ni oxydant); et si elle est inférieure à -30%, il s'agit d'un produit oxydant.



313  $\mu\text{g/ml}$ ; parce que nous cherchons les antioxydants les plus forts et l'activité antioxydante d'un produit est en relation avec sa concentration.

### **3.2 ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE DE DIFFÉRENTS PRODUITS COMMERCIAUX PURIFIÉS ET THÉRAPEUTIQUES**

Les explications de la méthodologie utilisée pour étudier l'activité antioxydante de différents produits commerciaux purifiés (vendus par des fournisseurs de produits chimiques de toutes sortes) et thérapeutiques (vendus dans les magasins d'aliments naturels pour leurs propriétés bénéfiques sur la santé) sont présentés ici.

#### **3.2.1 Liste des produits étudiés pour leur propriété antioxydante**

Vingt produits commerciaux purifiés et douze produits commerciaux thérapeutiques ont été étudiés pour leur propriété antioxydante. La liste de ces produits est énumérée au tableau 1. On y retrouve également la famille chimique des produits commerciaux purifiés. Tous les produits commerciaux purifiés ont été achetés de Sigma, St-Louis, USA, à l'exception de l'ajmalicine, de la sempervirine et de l'épicatéchine qui ont été achetées de Indofine, New Jersey, USA. Tous les produits commerciaux thérapeutiques ont été achetés chez Optima, Montréal, Canada.

**TABLEAU 1: Liste des produits commerciaux purifiés et thérapeutiques à étudier pour leur activité antioxydante à l'aide de la microtechnique.**

Produits commerciaux purifiés		Produits commerciaux thérapeutiques
Nom du produit	Famille chimique	Nom du produit
BHA *	Additif alimentaire synthétique	Bioflavonoïdes de citron ***
BHT *	Additif alimentaire synthétique	Chaparral ***
Ajmalicine **	Alcaloïde	Co-Q10 ***
Sempervirine **	Alcaloïde	Echinaforce ***
Glutathion *	Aminothiols	Fluxarola ***
N-acétyl-cystéine *	Aminothiols	Gotu-cola ***
Épicatéchine **	Catéchine	Lapacho ***
Catéchol *	Catéchol	Poudre d'ail ***
Hydroquinone *	Catéchol	Pycnogenol ***
Morin *	Flavonoïde	Reishi ***
Rutine *	Glucoside	Spirulina ***
Indole-3-acétonitryl *	Indole	Trèfle rouge ***
Biochanin A *	Isoflavone	
Acide phytique *	Phytate	
Cadmium *	Minéraux	
Dithiothreitol *	Thiol	
Vitamine A *	Vitamines et précurseurs	
Bathophenanthroline *	Autres	
Gossypol *	Autres	
Phénidone *	Autres	

- \* Sigma, St-Louis, USA.
- \*\* Indofine, New Jersey, USA
- \*\*\* Optima, Montréal, Canada

### **3.2.2 Mesure de l'activité antioxydante**

Les mesures d'activité antioxydante ont été réalisées selon la microtechnique de mesure d'activité antioxydante décrite à la section 3.1 de ce mémoire. Les contrôles positifs utilisés sont la vitamine C (vitamine hydrosoluble) et la vitamine E (vitamine liposoluble). Les contrôles négatifs sont l'eau distillée et l'éthanol selon la solubilité des produits à analyser.

Les différents produits étudiés et les contrôles positifs sont dissous à des concentrations de 4.9, 19.6, 78.3 et 313  $\mu\text{g/ml}$ , permettant ainsi de comparer l'activité antioxydante des produits entre eux et avec leurs contrôles.

### **3.2.3 Force antioxydante**

La force antioxydante des produits à étudier sera déterminée en référence aux barèmes de la figure 2 en fonction de leur activité antioxydante à la concentration de 313  $\mu\text{g/ml}$ .

## **3.3 EXTRACTIONS D'ÉPICES ET ÉTUDE DE LEUR ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE**

Cette partie traite des méthodologies utilisées pour procéder à l'extraction de micronutriments à partir d'épices alimentaires à fin d'en étudier leurs propriétés antioxydantes.

### 3.3.1 Épices étudiées

Toutes les épices à extraire et à étudier pour leur activité antioxydante ont été achetées au Marché Jean-Talon, Montréal, Canada de la ferme Denis Lauzon, sauf le pollen qui provient de la Ferme Murphy au Marché Jean-Talon toujours.

### 3.3.2 Méthode d'extraction

Les épices ont été séchées à la température de la pièce. Les extractions sont faites par infusion dans deux solvants: l'eau distillée ou l'éthanol 95%. Nous extrayons toutes les épices dans ces deux solvants.

Pour les extractions aqueuses, l'eau distillée est chauffée jusqu'à ébullition. Nous ajoutons 10 ml d'eau chaude pour chaque gramme de poids sec d'épice. Le mélange est homogénéisé dans un homogénéisateur (Sorvall, modèle Omni-Mixer) pendant 5 minutes. Une heure après l'ajout de l'eau, nous filtrons sous vide le mélange et nous recueillons le filtrat. Nous procédons de la même façon pour une extraction d'une période de vingt-quatre heures.

Pour les extractions à l'éthanol 95%, nous suivons le même processus que pour les extractions aqueuses, mis à part que l'éthanol n'est pas chauffée. Le filtrat est recueilli au bout de quatre heures et de vingt-quatre heures plutôt qu'au bout d'une heure et vingt-quatre heures.

Les filtrats d'extractions sont mis en aliquotes dans des flacons de 15 ml et conservés à -20°C jusqu'à leurs utilisations.

### 3.3.3 Extractions d'épices effectuées

Soixante-dix-neuf extractions ont été faites à partir des vingt-deux épices à étudier. La camomille, l'estragon, la marjolaine et l'origano fort ont été extraits dans l'eau pour une période de 24 heures et dans l'éthanol pour les périodes de quatre et 24 heures. L'aneth, le basilic et la sauge ont été extraits dans l'eau pour une période de une heure et dans l'éthanol pour les périodes de quatre et 24 heures. La rhue a été extraite dans l'eau pour une période de 24 heures et dans l'éthanol pour une période de 24 heures. Certaines extractions n'ont pas été effectuées à cause d'une quantité insuffisante d'épice séchée pour faire les quatre extractions.

Les quatorze autres épices ont été extraites des quatre façons: soit dans l'eau pour les périodes d'une et de vingt-quatre heures; et dans l'éthanol pendant quatre et vingt-quatre heures.

### **3.3.4 Étude de l'activité antioxydante des différents extraits d'épices**

L'activité antioxydante des différents extraits d'épices est mesurée à l'aide de la microtechnique de mesure décrite précédemment dans ce mémoire (section 3.1).

Les contrôles positifs sont la vitamine C et la vitamine E représentant ainsi les produits hydrosolubles et liposolubles respectivement. L'eau distillée et l'éthanol 95% ont servis de contrôle négatifs pour les produits hydrosolubles et liposolubles respectivement.

Les extraits d'épices ont été analysés à des concentrations finales de 98, 391, 1563 et 6250  $\mu\text{g/ml}$  dans le milieu réactionnel total avant l'ajout de la solution de coloration (SDS + acide thiobarbiturique).

### **3.4 TEST DE MUTAGÉNÉCITÉ Umu**

Dans cette partie, nous décrivons la technologie permettant l'étude des propriétés mutagéniques et antimutagéniques des différents produits commerciaux purifiés et thérapeutiques et des extraits d'épices, à l'aide du test de mutagénéicité Umu.

#### 3.4.1 Liste des produits à tester

Les fournisseurs des produits commerciaux purifiés et des produits commerciaux thérapeutiques sont présentés à la section 3.2.1 et ceux des d'épices à la section 3.3.1. Nous voulons étudier tous ces produits à l'aide du test de mutagénéité Umu pour déterminer leurs propriétés mutagéniques et antimutagéniques per se et de leurs métabolites hépatiques.

#### 3.4.2 Souche bactérienne

La souche bactérienne utilisée pour le test Umu est la Salmonella typhimurium TA1535 portant le plasmide pSK1002. La souche provient de M. Wen-Zong Whong du National Institute for Occupational Safety and Health, Morgantown, WV. Le plasmide pSK1002 contient des gènes qui codent pour la résistance à l'ampicilline et le gène umuC couplé au lacZ qui code respectivement pour le système S.O.S. de réparation de l'ADN et pour la  $\beta$ -galactosidase.

#### 3.4.3 Préparation des produits à étudier

Les produits commerciaux purifiés et thérapeutiques sont dissous dans l'eau ou l'éthanol, selon leurs affinités, à une concentration 0,0093 g/ml. Deux autres dilutions subséquentes sont préparées à partir de ces solutions mères afin d'obtenir des concentrations finales standardisées de 19.6, 78.3 et 313  $\mu$ g/ml. Ces concentrations ont été choisies pour faciliter la comparaison des résultats de mutagénéité et

d'antimutagénéicité, avec ceux des propriétés antioxydantes réalisés précédemment en utilisant ces mêmes concentrations.

Les extraits d'épices ont été réalisés selon la méthode décrite précédemment dans la méthodologie (section 3.3.2). Ces extraits sont utilisés directement pour préparer deux autres dilutions afin d'obtenir trois concentrations différentes (y compris la solution mère) pour chacun des extraits à analyser. Les concentrations sont de 210, 840 et 3360  $\mu\text{g/ml}$  dans le milieu réactionnel. Les concentrations utilisées pour les extraits d'épices sont plus grandes que celles des produits purifiés étant donné que ce sont des extraits bruts dont les complexes actifs n'ont justement pas été purifiés.

#### 3.4.4 Préparation des produits mutagènes

Le dichromate de potassium est une substance mutagène par elle-même (sans fraction S9) (ODA et al., 1985) et a été solubilisé dans de l'eau distillée. Il servira de contrôle positif et de mutagène à inhiber pour l'étude de la mutagénéicité et de l'antimutagénéicité per se.

Le quercétin est mutagène lorsqu'il est métabolisé par les enzymes hépatiques (fraction S9) (ODA et al., 1985) et a été solubilisé dans du NaOH (Fisher, New Jersey, USA) 0,1 N. Il servira de contrôle positif et de mutagène à inhiber pour

l'étude de la mutagénéicité et de l'antimutagénéicité des métabolites hépatiques.

#### 3.4.5 Contrôles négatifs

Les solvants pour dissoudre les produits à analyser (l'eau distillée, l'éthanol 95% et le NaOH 0,1 N) servent de contrôles négatifs.

#### 3.4.6 Milieu TGA

Le milieu TGA sert de milieu de culture bactérienne. Il contient 1% de Bacto tryptone (Difco), 0,5% de NaCl (American Chemicals), 0,2% de glucose (Baker, New Jersey, USA) et 20 µg/ml d'ampicilline (Sigma, St-Louis, USA) (WHONG et al., 1986).

#### 3.4.7 Solution de fraction S9

La fraction S9 est une fraction de foie de rat traité à l'Aroclor-1254 (MARON et AMES, 1983) et sert à étudier l'effet de la métabolisation hépatique sur les différentes substances à étudier, c'est-à-dire une fois ces substances digérées par les enzymes hépatiques. La fraction S9 est riche en enzymes hépatiques du type cytochrome P-450. Ainsi, la fraction S9 permet d'étudier si la substance analysée forme des métabolites mutagènes une fois dégradée par les enzymes hépatiques.

La solution contenant la fraction S9 est composé de 1 ml de fraction S9 (Microbiological Associates, Maryland, USA); 10 ml de tampon phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Baker, New Jersey, USA),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Fisher, New Jersey, USA)) 0,2 M pH 7,4 stérile; 0,4 ml de solution stérile de  $\text{MgCl}_2$ -KCl (1,65 M KCl (Fisher, New Jersey, USA)+ 0,4 M  $\text{MgCl}_2$  (Baker, New Jersey, USA)); 7,7 ml d'eau distillée stérile; 0,1 ml de glucose-6-phosphate (Boehringer Mannheim, Montréal, Canada) stérile 1 M; et 0,8 ml de NADP (Boehringer Mannheim, Montréal, Canada) stérile 1 M (MARON et AMES, 1983). Le mélange est constamment maintenu à 4°C. La fraction S9 et le NADP sont ajoutés en dernier.

#### 3.4.8 Le test Umu: mesure de mutagénéité

La *S. typhimurium* est cultivée pendant 16 heures à 37°C dans du milieu TGA (WHONG et al., 1986). La culture est diluée 1/10 dans du milieu TGA et incubée à 37°C pendant 2 heures pour atteindre une phase logarithmique de croissance (WHONG et al., 1986). Nous distribuons un ml de milieu de culture bactérienne par tube. On ajoute ensuite dans chacun des tubes 208  $\mu\text{l}$  de tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 (pour la mutagénéité per se), ou 208  $\mu\text{l}$  de solution de fraction S9 (pour la mutagénéité des métabolites) et 42  $\mu\text{l}$  de produit à analyser ou de contrôle négatif ou de produits mutagènes. Ce mélange est incubé durant 2 heures à 37°C. Nous prélevons 50  $\mu\text{l}$  du mélange pour la détermination de la  $\beta$ -galactosidase et avec le reste, nous prenons une lecture de densité optique (D.O.) à 600 nm.

Chaque produit qui est trouvé non-mutagène per se (sans l'utilisation de fraction S9), doit être réétudié en présence de fraction S9 pour déterminer si ses métabolites hépatiques sont également non-mutagènes.

#### 3.4.9 Test Umu: mesure d'antimutagénéicité

Pour mesurer les propriétés antimutagéniques d'un produit, nous ajoutons 42  $\mu$ l de produit mutagène (à 336  $\mu$ g/ml pour le dichromate de potassium et à 313  $\mu$ g/ml pour le quercetin) en plus de 42  $\mu$ l du produit à analyser (à 313  $\mu$ g/ml pour les produits commerciaux purifiés et thérapeutiques et à 3360  $\mu$ g/ml pour les extraits d'épices). Si le produit à analyser possède des propriétés antimutagènes, il inhibera l'action du composé mutagène sur l'activation du système S.O.S. et ainsi, la production de  $\beta$ -galactosidase engendrée par le produit mutagène.

Nous obtiendrons donc deux résultats d'activité antimutagène pour chaque produit: l'activité antimutagène sur un composé mutagénique per se (dichromate de potassium); et l'activité antimutagène sur un composé mutagénique par l'action de ses métabolites hépatiques (quercetin) de chaque produit à analyser.

#### 3.4.10 Dosage de la $\beta$ -galactosidase

Les 50  $\mu$ l de cellules prélevées précédemment sont ajoutés à 450  $\mu$ l de tampon B (16,1 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Fisher, New Jersey, USA); 5,5 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Baker, New Jersey, USA); 0,75 g de KCl (Fisher, New Jersey, USA); 0,25 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  (Baker, New Jersey, USA); 1 g de sodium dodécyl sulfate (SDS) (Boehringer Mannheim, Montréal, Canada); 2,7 ml de  $\beta$ -mercaptoéthanol (Sigma, St-Louis, USA); et 1 litre d' $\text{H}_2\text{O}$ ) (pH 7,0) et 100  $\mu$ l de O-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG) (Sigma, St-Louis, USA) pour un volume total de 600  $\mu$ l. Le mélange est incubé à 28°C pendant 25 minutes. On arrête la réaction en ajoutant 400  $\mu$ l de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Fisher, New Jersey, USA) 1 M. On prend une lecture de D.O. à 420 nm et à 550 nm de chacun des tubes.

#### 3.4.11 Transformation des D.O. en unités de $\beta$ -galactosidase

L'activité enzymatique de la  $\beta$ -galactosidase est convertie en unités à partir des D.O. lues à 420, 550 et 600nm, selon la formule de Miller (MILLER, 1972):

$$U = 1000 \times (\text{D.O.} 420 \text{ nm} - 1,75 \times \text{D.O.} 550 \text{ nm}) / (t \times V \times \text{D.O.} 600 \text{ nm})$$

où t représente le temps de réaction en minutes,

V représente les ml de cellules.

#### 3.4.12 Interprétation des résultats de mutagénéité

Un produit est considéré mutagène lorsqu'il provoque la génération d'unités de  $\beta$ -galactosidase équivalente au double des unités d'enzyme générées par le contrôle négatif (solvant du produit). Cette norme s'applique qu'on analyse la mutagénéité per se (la mutagénéité du produit par lui-même) ou la mutagénéité des métabolites du produit (en présence de fraction S9).

#### 3.4.13 Interprétation des résultats d'antimutagénéité

Comme le test Umu ne sert pas habituellement à étudier l'inhibition de la mutagénéité (l'antimutagénéité), mais est utilisé plutôt pour déterminer si un produit est mutagène, il n'y a pas de standard pour décider de l'antimutagénéité d'un produit. Nous conviendrons ainsi, qu'une inhibition de 35% ou plus de la mutagénéité d'un produit mutagène induit par le produit à analyser, équivaut à un résultat d'antimutagénéité convainquant. Ce pourcentage d'inhibition est calculé en comparant les unités de  $\beta$ -galactosidase produites par les bactéries en présence du produit à étudier lorsqu'il est mélangé à une substance mutagène, par rapport aux unités de  $\beta$ -galactosidase produites par les bactéries en présence du mutagène seul.

## 4 RÉSULTATS

Cette section est divisée en quatre grandes parties. Dans la première partie, nous présenterons les résultats de la mise au point de notre microtechnique de mesure de l'activité antioxydante. Dans la seconde partie, nous rapportons les résultats d'activité antioxydante des différents produits commerciaux et thérapeutiques étudiés. La troisième partie porte sur les résultats des extractions d'épices et leurs propriétés antioxydantes. Finalement, la quatrième partie porte sur les résultats de mutagénéicité et d'antimutagénéicité per se et des métabolites hépatiques des différents produits à analyser transformés par le complexe enzymatique du cytochrome P-450.

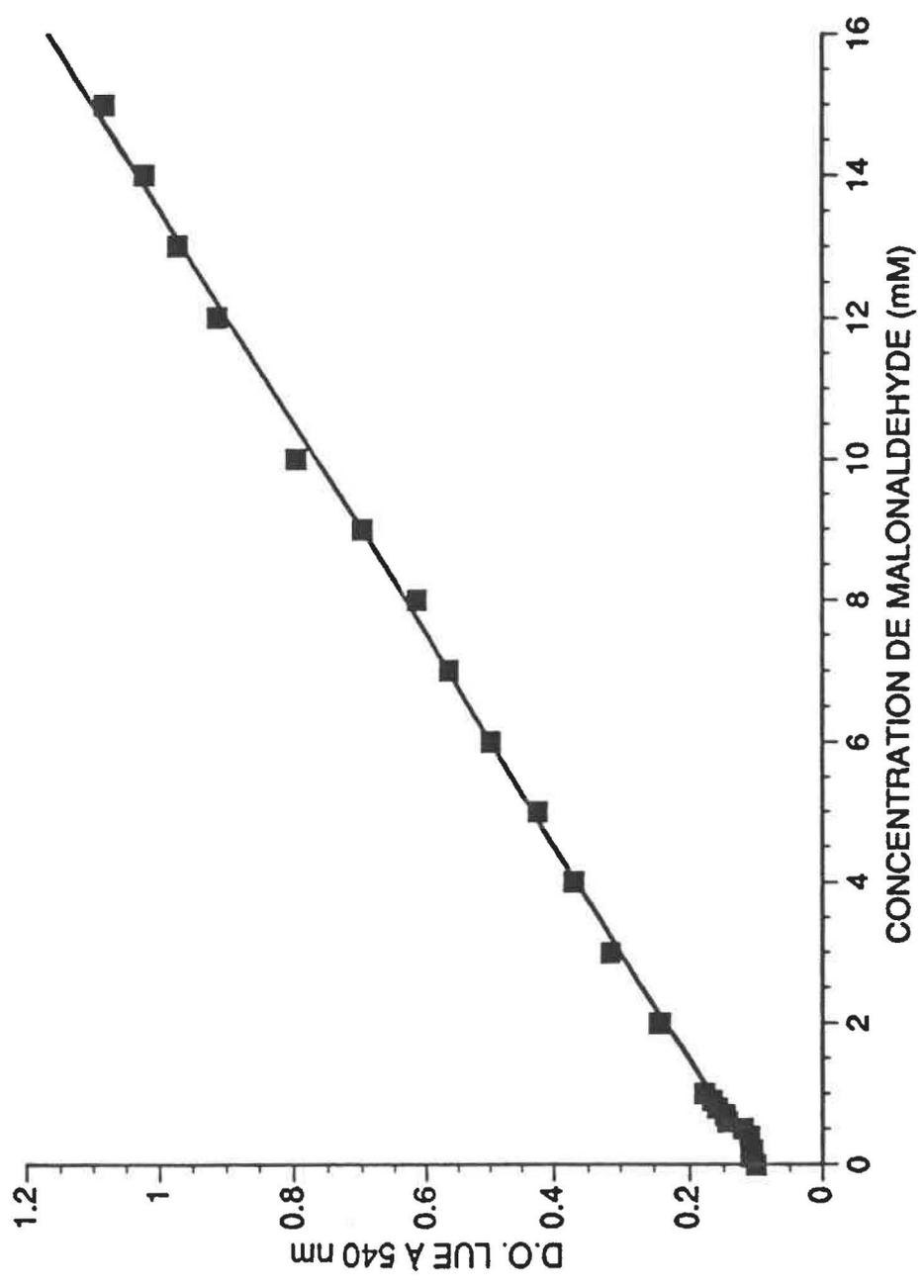
#### **4.1 MICROTECHNIQUE DE MESURE DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE**

Cette partie présente les résultats de la mise au point et de la capacité de mesurer l'activité antioxydante de notre microtechnique.

##### **4.1.1 Courbe standard**

La figure 3 représente une courbe standard effectuée tel que décrit dans la méthodologie. La relation entre les D.O. et les différentes concentrations de malonaldéhyde, est linéaire avec une valeur de corrélation de 0,999 pour des D.O. situées entre 0,000 et 1,200. Ainsi, les valeurs de D.O. hors de ces bornes seront rejetées. La courbe est linéaire et la pente est constante.

Figure 3: Courbe standard de la D.O. en fonction de la concentration de malonalaldéhyde dans le milieu réactionnel.



#### 4.1.2 Effet de la pureté du SDS sur l'activité antioxydante des contrôles positifs

La figure 4 montre les courbes de l'activité antioxydante de la vitamine C en fonction de sa concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) en utilisant deux sources de SDS ayant des puretés différentes (60% et 99%). On remarque que les deux courbes suivent le même patron d'activité antioxydante. Cependant, l'activité antioxydante de la vitamine C utilisant la solution de SDS à 99% atteint son maximum de 100% d'activité à la concentration de 312.5  $\mu\text{g/ml}$  alors que celle qui utilise la solution de SDS à 60% n'est encore qu'à 30% d'activité antioxydante. La vitamine C utilisant la solution de SDS à 60% atteint son maximum de 100% d'activité antioxydante à la concentration de 625  $\mu\text{g/ml}$ . Ainsi, la courbe d'activité antioxydante de la vitamine C utilisant la solution de SDS à 99% est décalée vers la gauche, soit vers des concentrations plus basses pour une activité antioxydante équivalente. Le même phénomène est également observé pour la vitamine E (figure 5).

#### 4.1.3 Contrôles positifs et négatifs hydrosolubles et liposolubles

La figure 6 présente les courbes d'activité antioxydante moyenne de la vitamine C et de l'eau distillée, obtenues au cours de 21 expériences successives. La courbe de la vitamine C présentée est donc la moyenne de 21 séries de 12 mesures réparties en 4 concentrations chacune en triplicata. Ainsi,

Figure 4: Étude de l'effet du degré de purification du SDS sur la courbe d'activité antioxydante de la vitamine C en fonction de la concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ).

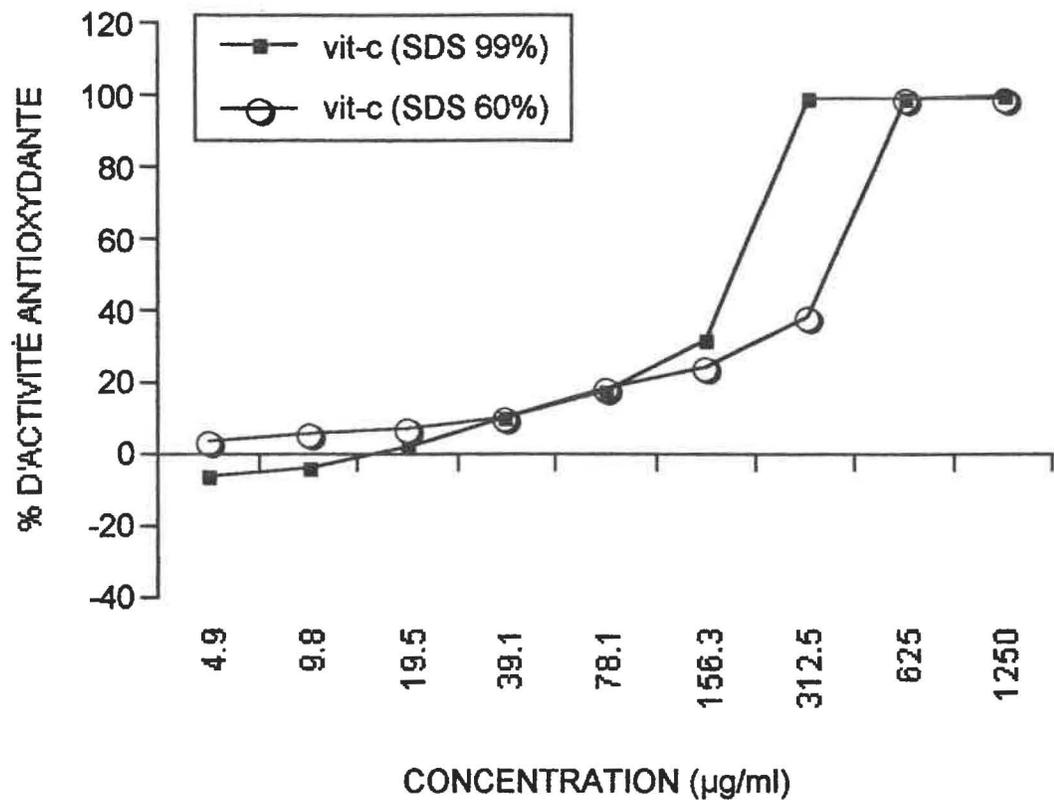


Figure 5: Étude de l'effet du degré de purification du SDS sur la courbe d'activité antioxydante de la vitamine E en fonction de la concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ).

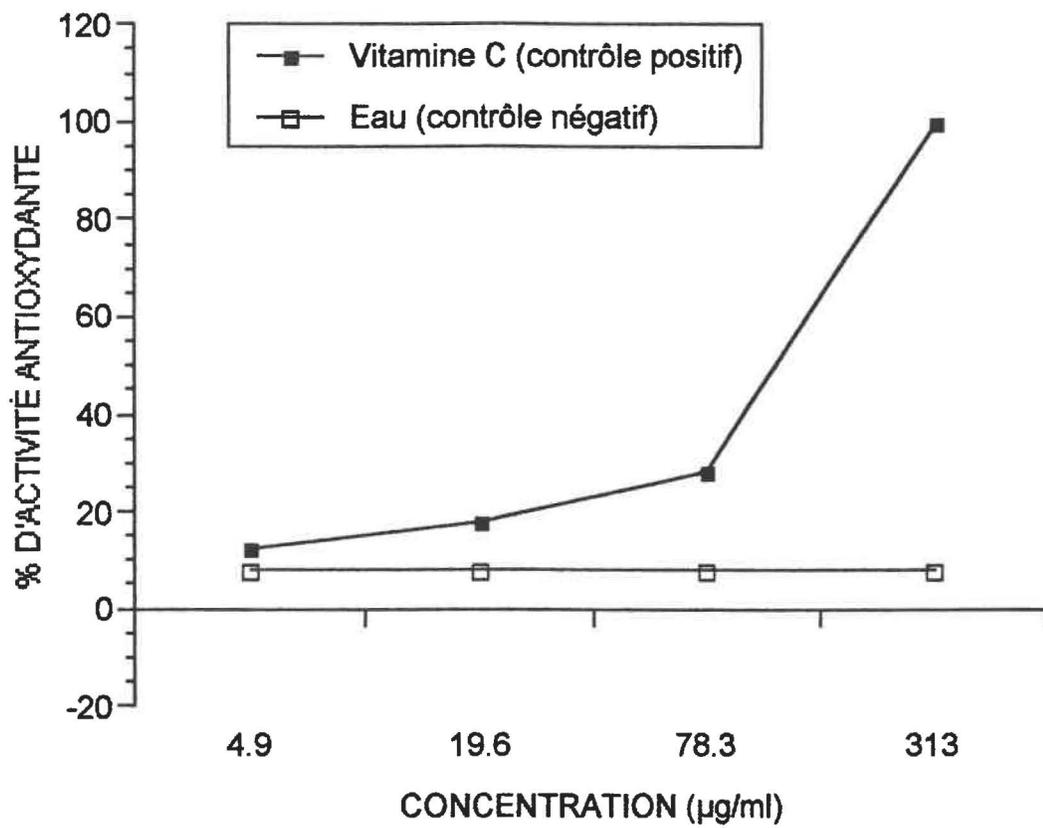
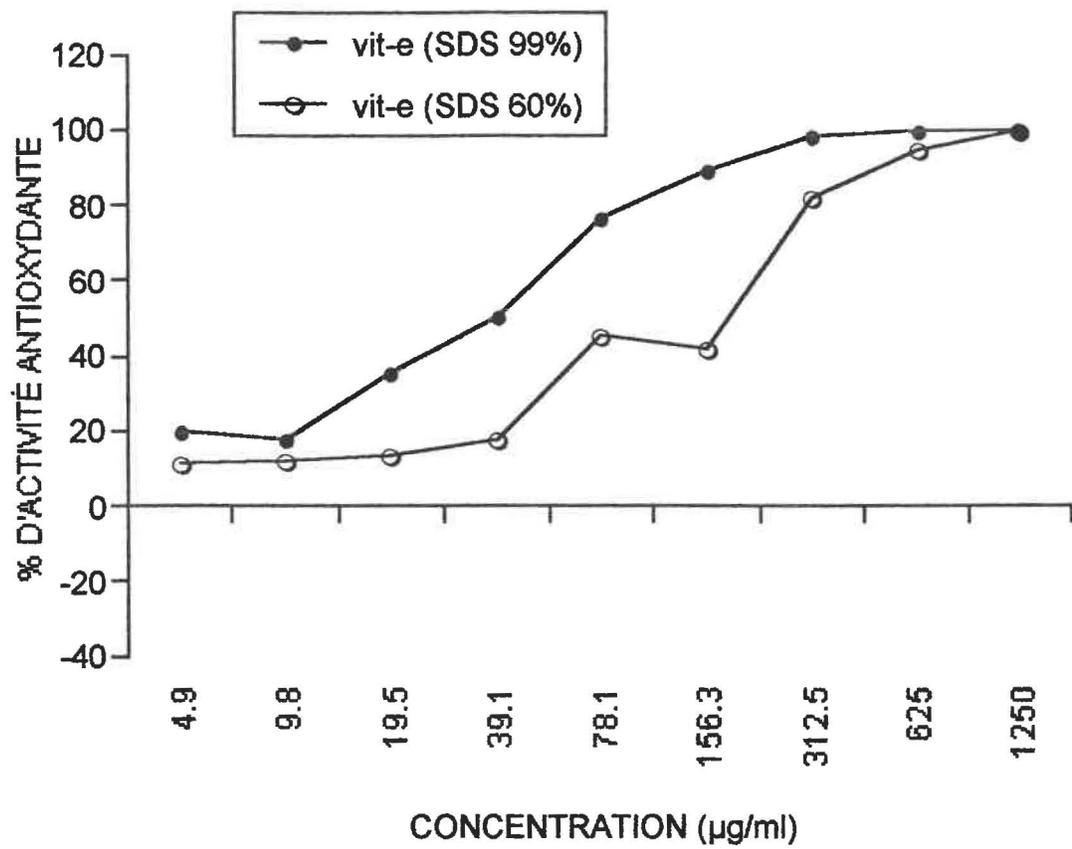


Figure 6: Courbe d'activité antioxydante de la vitamine C utilisé comme contrôle positif des produits hydrosolubles, obtenue de 21 expériences successives.

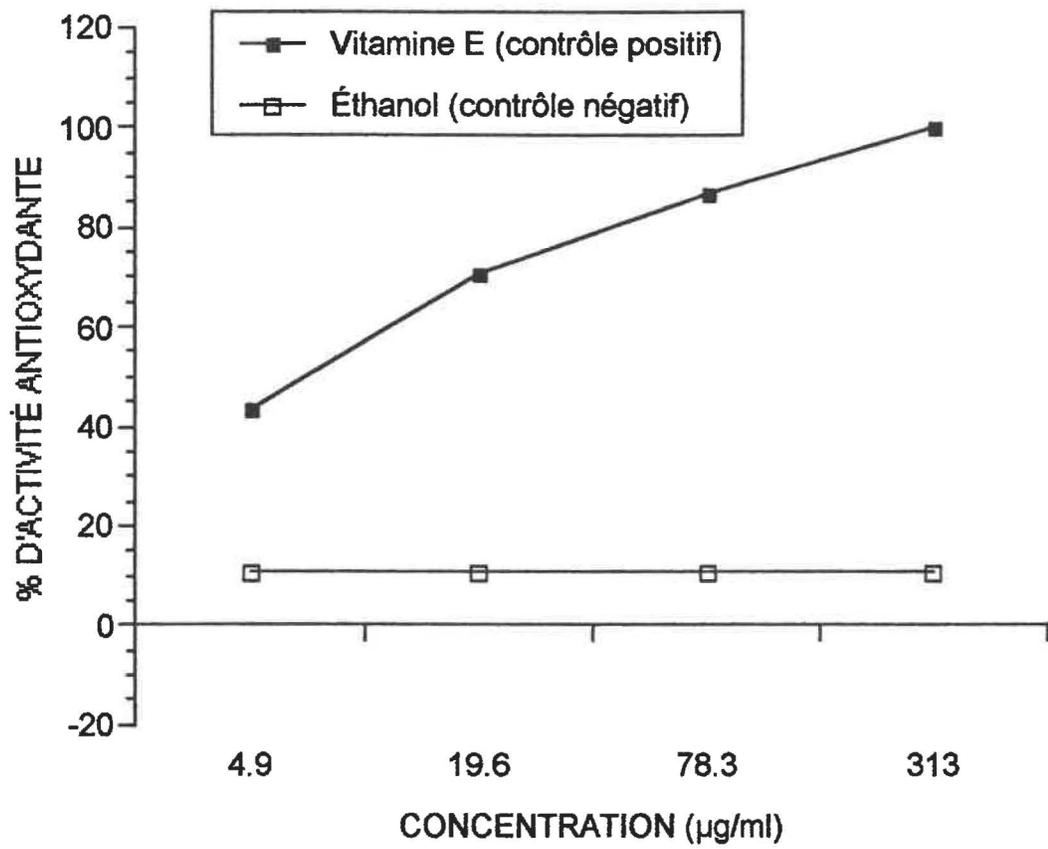


chaque point de la courbe représente la moyenne de 63 mesures d'activité antioxydante. L'activité antioxydante de la vitamine C augmente peu en fonction de la concentration entre 4.9 et 78.3  $\mu\text{g/ml}$  et subit une augmentation brusque entre 78.3 et 313  $\mu\text{g/ml}$  pour atteindre un maximum de 100% d'activité antioxydante à cette dernière concentration. On détermine que la vitamine C possède une forte activité antioxydante en référant à la figure 2.

La courbe d'activité antioxydante de l'eau distillée utilisée comme contrôle négatif est aussi la moyenne de 21 séries de mesures à raison de 12 données par série pour un total de 252 données. L'activité antioxydante de l'eau est stable à une moyenne de 8.1%.

La figure 7 présente les courbes d'activité antioxydante moyenne de la vitamine E et de l'éthanol 95% réalisées à partir de la moyenne de 28 séries de mesures. Chaque série de mesures compte 12 mesures d'activité antioxydante réparties en 4 concentrations chacune en triplicata. Ainsi, chaque point de la courbe représente la moyenne de 84 mesures d'activité antioxydante. L'activité antioxydante de la vitamine E augmente de façon continue de 4.9 à 313  $\mu\text{g/ml}$  pour atteindre un maximum de 100% d'activité antioxydante à la concentration la plus élevée. Cette activité antioxydante de 100% indique que la

Figure 7: Courbe d'activité antioxydante de la vitamine E utilisé comme contrôle positif des produits liposolubles, obtenue de 28 expériences successives.



vitamine E est fortement antioxydante si l'on se rapporte à la figure 2.

La courbe d'activité antioxydante de l'éthanol faite comme nous l'avons décrite pour la courbe de l'eau distillée représente une moyenne de 336 mesures. L'activité antioxydante de l'éthanol est constante à une moyenne de 11.2%.

Nous discuterons plus loin pour quelles raisons les activités antioxydantes des contrôles négatifs sont supérieures à zéro, mais c'est tout à fait normale et ça s'explique par la méthode de calcul que nous utilisons pour transformer les densités optiques en pourcentage d'activité antioxydante.

#### 4.1.4 Activité et force antioxydante d'un produit

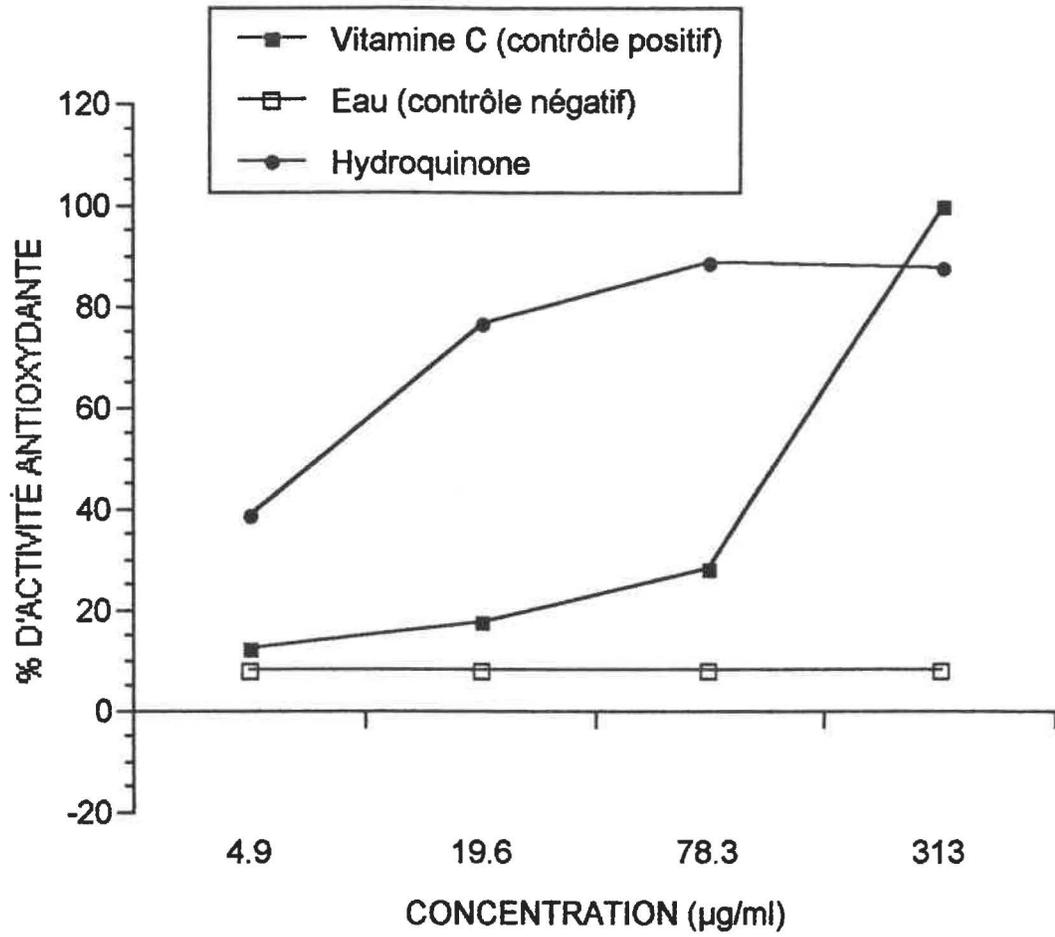
L'activité antioxydante d'un produit est déterminée par sa capacité à diminuer l'oxydation des liposomes d'acide linoléique causé par le fer et les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux contrôles positif et négatif de ce produit. Les contrôles négatifs, eau distillée ou éthanol 95%, n'empêchent pas l'oxydation des membranes liposomiques et une certaine quantité de malonaldéhyde est ainsi formé. La coloration causée par la réaction du malonaldéhyde et de l'acide thiobarbiturique est donc relativement forte. Lorsqu'un produit est antioxydant, il diminue l'oxydation des membranes liposomiques et il y a moins de malonaldéhyde de formé ce qui

se traduit par une coloration moins intense. Un produit qui n'affecte pas la coloration du milieu réactionnel par rapport à celle du contrôle négatif n'a donc pas d'activité antioxydante. À l'opposé, un produit qui augmente la coloration du milieu réactionnel par rapport au contrôle négatif, témoigne d'une activité oxydante.

Les pourcentages d'activité antioxydante calculés pour différentes concentrations d'un produit permettent d'établir une courbe d'activité antioxydante en fonction de la concentration. Cette courbe peut être superposée à celles des contrôles positifs et négatifs pour comparer l'activité antioxydante du produit avec celles de ses contrôles.

La figure 8 présente la courbe d'activité antioxydante de l'hydroquinone superposée avec celles de ses contrôles, positif et négatif. On remarque que l'activité antioxydante de l'hydroquinone est moins affectée par les dilutions que celle de la vitamine C. Ainsi l'hydroquinone conserve plus d'activité antioxydante que la vitamine C aux faibles concentrations. L'hydroquinone atteint un maximum d'activité antioxydante de 89% à partir de 78.3  $\mu\text{g/ml}$  jusqu'à 313  $\mu\text{g/ml}$ . La tendance positive de cette courbe nous indique que l'hydroquinone est un antioxydant. Un oxydant montrerait, au contraire, une pente négative. Par contre, on ne peut pas se fier à l'inclinaison de la pente pour juger de la force antioxydante d'un produit, car

Figure 8: Expérience de superposition des courbe d'activité antioxydante de l'hydroquinone par rapport à l'ensemble des contrôles positifs, vitamine C, (figure 4) en fonction de la concentration des produits en  $\mu\text{g/ml}$  dans nos conditions expérimentales.



une pente plus faible indique seulement une faible diminution de l'activité antioxydante d'un produit en raison de ses dilutions et non pas un antioxydant plus faible.

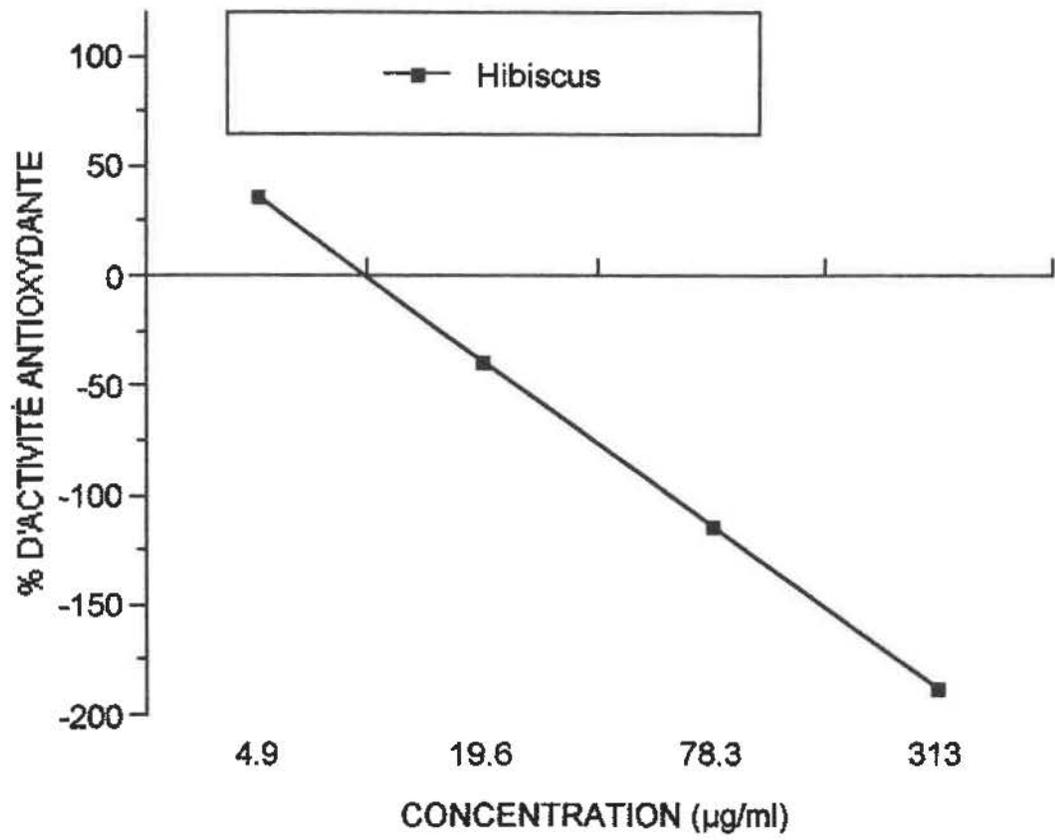
La force antioxydante d'un produit est déterminée en suivant les critères représentés à la figure 2, sur la base des résultats d'activité antioxydante obtenus pour la plus grande concentration de ce produit, soit 313  $\mu\text{g/ml}$ .

Le pourcentage d'activité antioxydante de l'hydroquinone à 313  $\mu\text{g/ml}$  sur cette courbe est de 89%. En se rapportant à l'étalon de détermination de la force antioxydante (figure 2), on observe que l'hydroquinone est un antioxydant fort par ce qu'il possède une activité antioxydante supérieure à 70% à la concentration de 313  $\mu\text{g/ml}$ .

#### 4.1.5 Limite de mesure des produits colorés intrinsèquement

La figure 9 montre la courbe d'activité antioxydante d'un extrait de fleur d'hibiscus. L'hibiscus a une forte coloration rouge et les lectures spectrophotométriques sont effectuées dans cette bande spectrale. L'activité antioxydante semble diminuer constamment de 4.9 à 313  $\mu\text{g/ml}$  pour atteindre un minimum de -188%. La pente négative indiquerait en théorie un produit oxydant. Cependant, ici elle est due à la coloration intrinsèque de l'hibiscus, la microtechnique ne nous permet pas d'étudier ces produits qui donnent des colorations qui masquent

Figure 9: Courbe d'activité antioxydante d'un extrait aqueux d'hibiscus en fonction de la concentration en  $\mu\text{g/ml}$  dans nos conditions expérimentales.



les lectures spectrophotométriques à 540 nm. Ceci est un exemple de produit dont l'activité antioxydante est non mesurable dans nos conditions expérimentales.

#### **4.2 MESURE DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE DE DIFFÉRENTS PRODUITS COMMERCIAUX PURIFIÉS ET THÉRAPEUTIQUES**

Cette partie rapporte les résultats d'activité antioxydante des différents produits commerciaux purifiés et thérapeutiques étudiés à l'aide de notre microtechnique de mesure de l'activité antioxydante.

L'activité antioxydante (en pourcentage) des différents produits étudiés à différentes concentrations est représentée aux tableaux 2.1 à 2.3. La force antioxydante de ces différents produits y figure également. Le tableau 2.1 expose les résultats d'activité antioxydante des produits commerciaux purifiés hydrosolubles. Le tableau 2.2 rapporte ceux des produits commerciaux purifiés liposolubles. Et les résultats des produits commerciaux thérapeutiques sont présentés au tableau 2.3.

##### **4.2.1 Activité et force antioxydante des produits commerciaux purifiés hydrosolubles**

Au tableau 2.1, on observe que l'hydroquinone et la rutine sont des antioxydants forts possédant des activités antioxydantes supérieures à 70% par rapport à leurs contrôles,

**TABLEAU 2.1: Activité et Force antioxydante de différents produits commerciaux purifiés hydrosolubles.**

Nom du produit	Famille chimique	Activité antioxydante (moyenne de triplicate) en % à différente concentration en µg/ml				Force antioxydante à 313 µg/ml
		4.9	19.6	78.3	313.0	
Hydroquinone	Catéchol	39	77	89	89	Fort
Rutine	Glucoside	33	38	57	71	Fort
Acide phytique	Phytate	20	-5	28	33	Neutre
Glutathion	Aminothiols	4	-15	-54	-112	Oxydant
N-acétyl-L-cystéine	Aminothiols	3	-6	-15	-92	Oxydant
Cadmium chloride	Minéraux	21	5	26	-264	Oxydant
Dithiothreitol	Thiol	1	-19	-58	-97	Oxydant

**TABLEAU 2.2: Activité et Force antioxydante de différents produits commerciaux purifiés liposolubles.**

Nom du produit	Famille chimique	Activité antioxydante (moyenne de triplicata) en % à différente concentration en µg/ml				Force antioxydante à 313 µg/ml
		4.9	19.6	78.3	313.0	
Phénidone	Autres	11	25	80	108	Fort
Catéchol	Catéchol	41	68	92	96	Fort
Épicatéchine	Catéchine	14	37	60	91	Fort
Morin	Flavonoïde	10	14	43	74	Fort
BHA	Additif alimentaire synth.	17	32	69	72	Fort
BHT	Additif alimentaire synth.	19	24	47	57	Moyen
Gossypol	Autres	38	51	61	N.D.	Moyen-Fort (P.C.)
Indole-3-acétonitryl	Indole	-13	-3	-7	21	Neutre
Vitamine A	Vitamines et précurseurs	-7	-4	19	15	Neutre
Ajmalicine	Alcaloïde	-7	-6	4	3	Neutre
Biochanin A	Isoflavone	-1	-23	28	-3	Neutre
Sempervirine	Alcaloïde	0	-13	-10	-20	Neutre
Bathophenantrholine	Autres	21	18	1	-139	Oxydant

P.C. : Problème de coloration

N.D. : Non déterminé

**TABLEAU 2.3: Activité et Force antioxydante de différents produits commerciaux thérapeutiques.**

Nom du produit	Activité antioxydante (moyenne de triplicata) en % à différente concentration en µg/ml								Force antioxydante à 313 µg/ml	
	4.9	19.6	78.3	313.0	4.9	19.6	78.3	313.0	Solubilisé dans	
	Solubilisé dans l'eau distillée				Solubilisé dans l'éthanol 95%				Eau	Éthanol
Pycnogenol (Acide)	13	17	6	-37					Oxydant	
Spirulina (Base)	-20	-3	10	17					Neutre	
Bioflavonoïdes de citron	7	3	12	-2	29	22	26	48	Neutre	Moyen
Chaparral	1	11	30	45	5	33	35	56	Moyen	Moyen
Co-Q10	-7	-31	-62	-38	9	15	12	36	Oxydant	Neutre
Échinaforce	19	22	26	30	14	23	30	31	Neutre	Neutre
Fluxarola	29	41	61	66	11	25	22	-9	Moyen	Neutre
Gotu-kola	11	14	5	14	6	17	26	21	Neutre	Neutre
Lapacho	8	19	21	18	5	19	34	18	Neutre	Neutre
Poudre d'ail	13	10	11	-2	21	34	37	46	Neutre	Moyen
Pycnogenol	4	0	-18	-24	31	29	33	51	Neutre	Moyen
Reishi	16	17	16	13	6	19	25	21	Neutre	Neutre
Spirulina	9	2	-11	-27	19	25	10	43	Neutre	Moyen
Trèfle rouge	3	-6	-2	-4	22	21	23	40	Neutre	Moyen

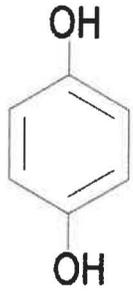
vitamine C (positif) et l'eau distillée (négatif). L'acide phytique est un antioxydant neutre. Et le N-acétyl-cystéine, le dithiothreitol, le glutathion et le cadmium se comportent comme des produits oxydants.

#### 4.2.2 Activité et force antioxydante des produits commerciaux purifiés liposolubles

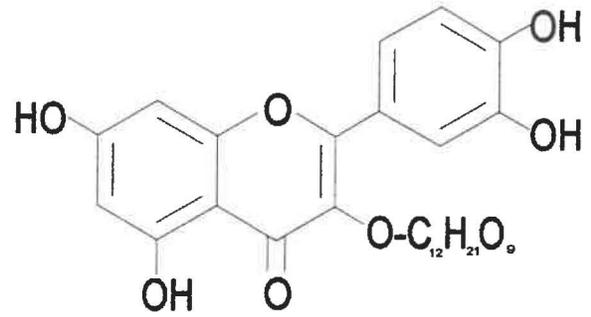
On observe au tableau 2.2, que le phenidone, le catéchol, l'épicatéchine, le morin et le BHA se présente comme des antioxydants forts. Le gossypol et le BHT possèdent des propriétés antioxydantes de force moyenne. Dans le cas du gossypol, nous indiquons "moyen-fort (P.C.)" car son résultat d'activité antioxydante est de force moyenne lorsque déterminée à  $78.3 \mu\text{g/ml}$ . À cause d'un problème de coloration intrinsèque nous ne pouvons pas l'évaluer à une concentration aussi grande que  $313 \mu\text{g/ml}$ . La vitamine A, l'indole-3-acétonitryl, le biochanin A, l'ajmalicine et la sempervirine sont considérés neutres. Et la bathophenanthroline est un produit oxydant.

La figure 10 présente quelques unes des molécules purifiées les plus fortement antioxydantes que l'on a étudiées. On y retrouve l'hydroquinone, la rutine et la vitamine C, trois molécules hydrosolubles. Le phénidone, le morin et la vitamine E, trois molécules liposolubles, y sont également exposés.

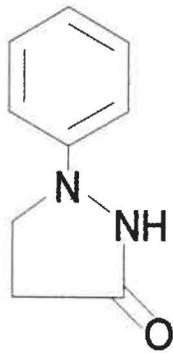
Figure 10: Certaines molécules purifiées antioxydantes.



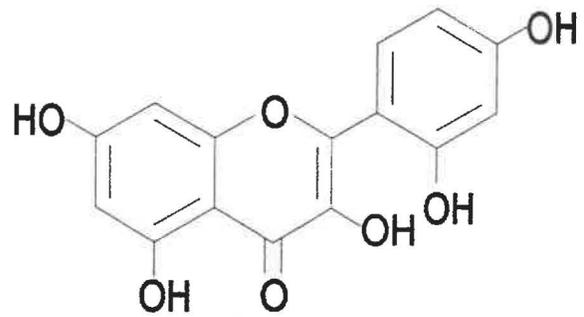
Hydroquinone



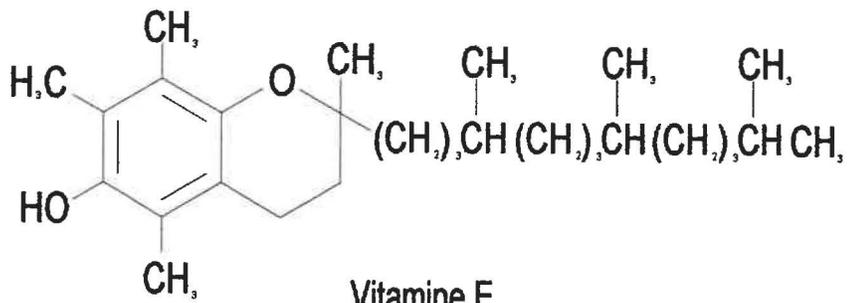
Rutine



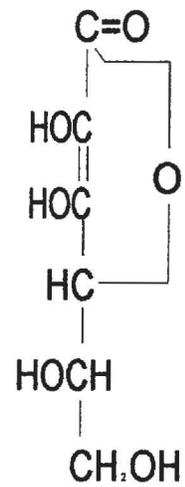
Phénidone



Morin



Vitamine E



Vitamine C

#### 4.2.3 Activité et force antioxydante des produits commerciaux thérapeutiques

Aux tableaux 2.3 on retrouve les résultats d'activité antioxydante des produits commerciaux thérapeutiques utilisant l'eau distillée et l'éthanol 95% comme solvant.

Lorsque l'eau distillée est utilisée comme solvant, le fluxarola et le chaparral ont une activité antioxydante de force moyenne. On observe également que le Co-Q10 apparaît comme un oxydant et que tous les autres sont neutres.

On remarque que le pycnogenol qui a été solubilisé dans l'acide (HCl en solution aqueuse pH 3), s'avère oxydant dans ces conditions (-37% d'activité antioxydante). Cependant, solubilisé dans l'eau, il devient neutre (-24%). Mais ces deux résultats sont tout près de la limite de l'oxydation qui est -30% d'activité antioxydante et inférieure.

La spirulina a été solubilisée dans une solution basique (NaOH en solution aqueuse pH 10), en plus d'avoir utilisé l'eau distillée. Elle présente une activité antioxydante supérieure à 313 µg/ml en solution alcaline (17% d'activité antioxydante) par rapport à la solution aqueuse (-27%).

Lorsque nous solubilisons ces produits commerciaux thérapeutiques dans l'éthanol 95%, les activités antioxydantes

sont supérieures à celles obtenues lorsqu'ils sont solubilisés dans l'eau pour onze produits sur douze (92%). Cela suggère que les parties antioxydantes des molécules de ces onze produits sont plus lipophiles qu'hydrophiles. Ainsi, le chaparral, le pycnogenol, la poudre d'ail, les bioflavonoïdes de citron, la spirulina et le trèfle rouge possèdent des activités antioxydantes de forces moyennes. Les autres produits commerciaux thérapeutiques que nous avons étudiés sont neutres dans ces conditions.

#### **4.3 RÉSULTATS DES EXTRACTIONS D'ÉPICES ET LEUR ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE**

Cette partie présente les résultats d'extractions d'épices et leurs activités antioxydantes étudiés à l'aide de notre microtechnique.

##### **4.3.1 Résultats d'activité antioxydante des extraits d'épices**

Les tableaux 3.1 et 3.2 présentent l'activité et la force antioxydante des différentes épices pour toutes leurs extractions. Plus précisément, le tableau 3.1 rapporte les résultats d'activité et de force antioxydante pour les extraits aqueux et le tableau 3.2 présente ceux des extraits éthyliques. La force antioxydante des extraits d'épices est déterminée à l'aide de l'étalon (figure 2) à 6250 µg/ml. On indique également sur ces tableaux, l'extraction qui donne le meilleur

**TABLEAU 3.1: Activité et force antioxydante de différents extraits aqueux d'épices.**

Nom de l'épice	Activité antioxydante en % (moyenne de triplicata) concentration en µg/ml								Force antioxydante à 6250 µg/ml	
	98	391	1563	6250	98	391	1563	6250	Extrait dans l'eau	
	Extrait dans l'eau 1 heure				Extrait dans l'eau 24 heures				1 heure	24 heures
Ail	27	32	38	42	16	9	16	19	* Moyen *	Neutre
Aneth	21	28	45	27	-	-	-	-	* Neutre *	
Basilic	21	39	56	68	-	-	-	-	* Moyen *	
Camomille	-	-	-	-	24	21	25	6		* Neutre *
Ciboulette à l'ail	1	16	33	37	-3	6	20	20	* Neutre *	Neutre
Coriandre	4	10	15	16	17	14	24	-11	* Neutre *	Neutre
Estragon	-	-	-	-	35	27	37	21		* Neutre *
Feuilles de céleri rave	31	35	34	35	31	37	31	N.D.	* Neutre *	(Neutre)
Marjolaine	-	-	-	-	21	30	46	50		* Moyen *
Menthe	0	9	24	43	-7	-9	5	4	Moyen	Neutre
Origano doux	9	51	62	78	3	10	28	N.D.	* Fort *	(Neutre)
Origano fort	-	-	-	-	32	39	68	77		* Fort *
Persil	-9	-2	21	35	-17	-13	3	23	* Neutre *	Neutre
Persil Italien	-1	0	13	19	3	-5	7	18	* Neutre *	Neutre
Pollen	18	16	11	-12	29	31	20	-7	Neutre	Neutre
Rhue	-	-	-	-	22	15	23	17		Neutre
Romarin	-15	3	49	76	-4	-1	34	51	* Fort *	Moyen
Sariette	21	25	26	11	17	23	32	35	Neutre	* Neutre *
Sauge	5	22	45	70	-	-	-	-	Fort	
Thym	20	40	51	41	28	35	45	39	Moyen	Neutre
Verveine	10	19	23	24	7	-4	6	16	* Neutre *	Neutre

N.B. \* Force \* : Indique l'extrait donnant le résultat d'activité antioxydante le plus élevé à 6250 µg/ml.  
 (Force) : Indique que la force antioxydante est déterminé à une autre concentration que 6250 µg/ml  
 N.D. : Non déterminé

**TABLEAU 3.2: Activité et force antioxydante de différents extraits éthyliques d'épices.**

Nom de l'épice	Activité antioxydante en % (moyenne de triplicata) concentration en µg/ml								Force antioxydante à 6250 µg/ml	
	98	391	1563	6250	98	391	1563	6250	Extrait dans l'éthanol	
	Extrait dans l'éthanol 4 heures				Extrait dans l'éthanol 24 heures				1 heure	24 heures
Ail	-10	11	25	32	31	27	35	28	Neutre	Neutre
Aneth	18	2	-14	-32	10	-7	-10	-40	Oxydant	Oxydant
Basilic	20	11	12	10	21	11	12	5	Neutre	Neutre
Camomille	-33	-65	-66	-199	-11	-12	-17	-126	Oxydant	Oxydant
Ciboulette à l'ail	-8	5	23	12	30	23	35	15	Neutre	Neutre
Coriandre	-56	-7	-12	-26	10	25	21	-26	Neutre	Neutre
Estragon	-53	-39	-40	-101	-12	-16	-31	-56	Oxydant	Oxydant
Feuilles de céleri rave	17	10	7	-15	9	15	24	4	Neutre	Neutre
Marjolaine	-25	14	26	8	-13	5	17	41	Neutre	Moyen
Menthe	38	41	59	71	27	31	54	59	* Fort *	Moyen
Origano doux	12	16	23	19	13	5	17	41	Neutre	Moyen
Origano fort	27	39	77	N.D.	54	63	60	49	(Fort)	Moyen
Persil	13	10	12	-13	9	21	12	-8	Neutre	Neutre
Persil Italien	11	11	23	-13	15	2	5	-10	Neutre	Neutre
Pollen	-6	14	32	13	10	21	44	39	Neutre	* Neutre *
Rhue	-	-	-	-	15	19	40	29		* Neutre *
Romarin	29	39	58	66	32	45	59	49	Moyen	Moyen
Sariette	-20	-6	31	-43	-16	-15	20	-5	Oxydant	Neutre
Sauge	38	59	74	79	45	62	75	74	* Fort *	Fort
Thym	13	54	65	54	50	54	64	51	* Moyen *	Moyen
Verveine	-57	-96	-50	-106	-37	-13	4	-25	Oxydant	Neutre

N.B. \* Force \* : Indique l'extrait donnant le résultat d'activité antioxydante le plus élevé à 6250 µg/ml.  
 (Force) : Indique que la force antioxydante est déterminé à une autre concentration que 6250 µg/ml  
 N.D. : Non déterminé

résultat de force antioxydante pour chaque épice à l'aide d'astérisque.

Les extraits manifestant une activité antioxydante forte sont la menthe (éthanol 4 heures), l'origano doux (eau 1 heure), l'origano fort (eau 24 heures), le romarin (eau 1 heure) et la sauge (eau 1 heure, éthanol 4 et 24 heures).

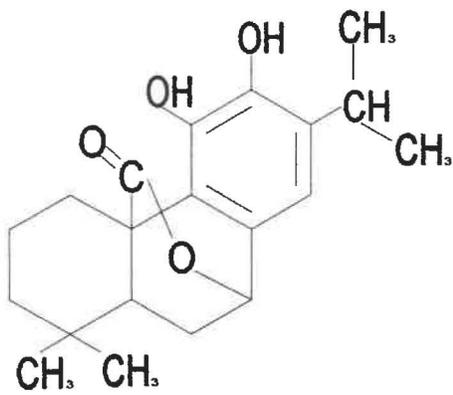
L'ail (eau 1 heure), le basilic (eau 1 heure), la marjolaine (eau 24 heures et éthanol 24 heures), la menthe (eau 1 heure et éthanol 24 heures), l'origano doux (éthanol 24 heures), l'origano fort (éthanol 24 heures), le romarin (eau 24 heures, éthanol 4 et 24 heures) et le thym (eau 1 heures, éthanol 4 et 24 heures) présentent tous une activité antioxydante de force moyenne dans nos conditions expérimentales.

Les autres extractions montrent une activité antioxydante neutre ou encore une activité oxydante dans nos conditions expérimentales.

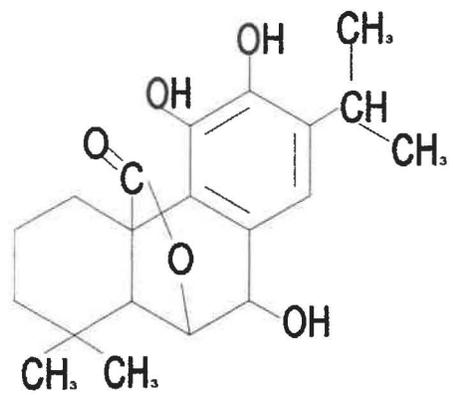
Sur les vingt et une épices extraites et étudiées pour leur activité antioxydante, cinq (24%) présentent de meilleurs résultats d'activité antioxydante lorsqu'extraites dans l'éthanol et seize (76%) présentent de meilleures activités antioxydantes pour les extraits dans l'eau distillée. Des seize

qui sont meilleures dans l'eau, il y en a dix qui ont été extraits des quatre façons. Sur ces dix, neuf (soit 90%) sont meilleures lorsque l'extraction ne dure qu'une heure plutôt que vingt-quatre heures. Sur les cinq épices qui sont meilleures lorsqu'extraites dans l'éthanol trois sont meilleures avec une extraction de 4 heures et deux avec une extraction de 24 heures. Mais des deux dernières une seule fut extraite des quatre façons. Les extractions dans l'éthanol ne semblent pas avoir apporté grand chose. Si nous faisons de nouvelles études, nous choisirions les extractions dans l'eau une heure pour une meilleure conservation des propriétés antioxydantes.

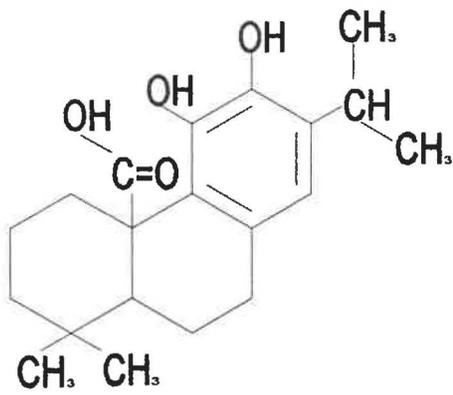
La figure 11 présente cinq molécules antioxydantes. Le carnosol, le rosemanol, l'acide carnosique et le rosemariidiphenol sont quatre molécules antioxydantes extraites du romarin (CHEN et al., 1992). Ils est donc possible que ces molécules ait un rôle dans l'activité antioxydante que nous avons mesuré pour les extrait de romarin. Toutes fois, il y a certainement plusieurs autres molécules présente dans le romarin qui peuvent intervenir dans l'activité antioxydante. La figure 11 présente également le thymol, une des molécules antioxydantes du thym (DEIGHTON et al., 1993). LAUGHTON et al., 1991, ont observé que de façon générale, l'activité antioxydante des molécules augmentait avec le nombre de groupement hydroxyle présent sur ces molécules.



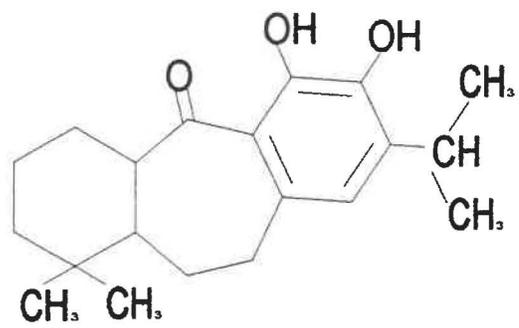
Camosol



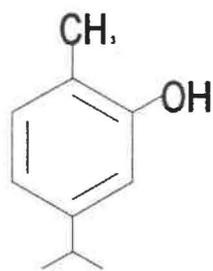
Rosemanol



Acide camosique



Rosemaridiphenol



Thymol

#### 4.3.2 Détermination de la meilleure extraction pour chacune des épices pour leur force antioxydante

Le tableau 4 présente la meilleure extraction, c'est-à-dire celle qui donne l'activité antioxydante la plus forte à 6250  $\mu\text{g/ml}$ , pour chacune des épices. Ces résultats tiennent compte du solvant, du temps d'extraction, de l'activité et la force antioxydante de chacune de ces extractions d'épices. Les antioxydants forts sont l'origano doux (eau 1 heure), l'origano fort (eau 24 heure), le romarin (eau 1 heure), le basilic (eau 1 heure), la sauge (éthanol 4 heures) et la menthe (éthanol 4 heures). La marjolaine (eau 24 heures), l'ail (eau 1 heures) et le thym (éthanol 4 heures) sont de force antioxydante moyenne. Les meilleures extractions des autres épices sont neutres au niveau de l'activité antioxydante.

#### 4.4 RÉSULTATS DU TEST Umu

Dans cette partie, nous présentons les résultats obtenus lors de l'étude des propriétés mutagéniques et antimutagéniques per se et des métabolites hépatiques des différents produits commerciaux purifiés et thérapeutiques et extraits d'épices, à l'aide du test de mutagénicité Umu.

##### 4.4.1 Étude de la mutagénicité per se des produits à étudier

Les tableaux 5.1 à 5.3 présente les résultats de mutagénicité per se des produits commerciaux purifiés, des extraits d'épices et des produits commerciaux thérapeutiques.

TABLEAU 4: Meilleurs extraits pour chacune des épices.

Nom de l'épice	Solvant	Temps d'extraction en heures	% d'activité antioxydante à 6250 µg/ml	Force antioxydante à 6250 µg/ml
Origano doux	Eau	1	78	Fort
Origano fort	Eau	24	77	Fort
Romarin	Eau	1	76	Fort
Basilic	Eau	1	68	Moyen
Marjolaine	Eau	24	50	Moyen
Ail	Eau	1	42	Moyen
Ciboulette à l'ail	Eau	1	37	Neutre
Feuilles de céleri rave	Eau	1	35	Neutre
Sariette	Eau	24	35	Neutre
Persil	Eau	1	35	Neutre
Aneth	Eau	1	27	Neutre
Verveine	Eau	1	24	Neutre
Estragon	Eau	24	21	Neutre
Persil italien	Eau	1	19	Neutre
Coriandre	Eau	1	16	Neutre
Camomille	Eau	24	6	Neutre
Sauge	Éthanol	4	79	Fort
Menthe	Éthanol	4	71	Fort
Thym	Éthanol	4	54	Moyen
Pollen	Éthanol	24	39	Neutre
Rhue	Éthanol	24	29	Neutre

TABLEAU 5.1: Mutagénéicité "per se" de différents produits commerciaux purifiés hydro et liposolubles déterminé à l'aide du test Umu.

Nom du produit	Famille chimique	Unités de B-galactosidase (moyennes de duplicata) à différente concentration du produit (en µg/ml)			Mutagénéicité	Unités de B-galactosidase (moyennes de duplicata) des contrôles			
		19.6	78.3	313		Contrôle (-)		Contrôle (+) Dichro. de K. à	
						Solvant	Unités	336 µg/ml	1680 µg/ml
Acide Phytique	Phytate	62.5	60.6	60.8	-	Eau	65.9	101.4	205.9
Cadmium chloride	Minéraux	65.3	24.3	44.8	-	Eau	124.9	142.5	197.0
Dithiothreitol	Thiol	35.2	33.5	30.7	-	Eau	34.5	72.8	175.9
Glutathion	Aminothiol	35.2	28.4	30.6	-	Eau	34.5	72.8	175.9
Hydroquinone	Catéchol	97.8	128.4	108.9	-	Eau	73.5	103.5	223.8
N-acétyl-cystéine	Aminothiol	84.1	81.2	82.2	-	Eau	86.7	120.9	206.0
Rutine	Glucoside	66.6	72.7	86.4	-	Eau	65.9	101.4	205.9
Vitamine C	Vitamine et préc.	99.3	85.7	82.8	-	Eau	73.5	103.5	223.8
Ajmalicine	Alcaloïde	17.0	13.9	13.1	-	Éthanol	25.7	79.0	255.8
Bathophénanthrolone	Autres	118.3	107.5	112.9	-	Éthanol	120.2	142.5	197.0
BHA	Add. alimentaire	74.7	83.1	233.6	+	Éthanol	68.2	101.4	205.9
BHT	Add. alimentaire	72.8	74.1	45.6	-	Éthanol	68.2	101.4	205.9
Biochanin A	Isoflavone	78.2	85.5	96.1	-	Éthanol	75.3	120.9	206.0
Catéchol	Catéchol	135.6	101.5	74.2	-	Éthanol	121.3	278.4	670.4
Épicatéchine	Catéchine	16.0	11.9	11.4	-	Éthanol	25.7	79.0	255.8
Gossypol	Autres	96.5	100.8	111.2	-	Éthanol	75.3	120.9	206.0
Indole-3-acétonitryl	Indole	31.4	31.9	28.7	-	Éthanol	31.2	72.8	175.9
Morin	Flavonoïde	139.4	184.6	466.0	+	Éthanol	120.2	142.5	197.0
Phenidone	Autres	79.2	75.3	64.5	-	Éthanol	75.3	120.9	206.0
Sempervirine	Alcaloïde	18.0	12.4	-4.2	-	Éthanol	25.7	79.0	255.8
Vitamine A	Vitamine et préc.	17.6	12.1	17.3	-	Éthanol	25.7	79.0	255.8
Vitamine E	Vitamine et préc.	28.6	10.3	10.5	-	Éthanol	121.3	278.4	670.4

N.B. : La mutagénéicité d'un produit est positive (+) lorsque les unités de B-galactosidase sont équivalentes au double de celle du contrôle négatif (le solvant).

**TABLEAU 5.2: Mutagénicité "per se" de différents extraits d'épices déterminé à l'aide du test Umu.**

Nom du produit	Unités de B-galactosidase (moyennes de duplicata) à différente concentration du produit (en µg/ml)			Mutagénicité	Unités de B-galactosidase (moyennes de duplicata) des contrôles			
	210	840	3360		Contrôle (-)		Contrôle (+) Dichro. de K. à	
					Solvant	Unités	336 µg/ml	1680 µg/ml
Ail (eau 1 heure)	61.8	56.7	39.1	-	Eau	60.9	118.8	106.5
Aneth (eau 1 heure)	65.2	69.6	61.5	-	Eau	94.2	216.2	176.3
Basilic (eau 1 heure)	23.2	24.8	26.4	-	Eau	28.9	49.8	33.3
Camomille (eau 24 heures)	80.7	75.7	70.6	-	Eau	102.8	148.2	277.1
Ciboulette à l'ail (eau 1 heure)	22.7	22.8	25.4	-	Eau	28.9	49.8	33.3
Coriandre (eau 1 heure)	81.3	71.5	64.9	-	Eau	94.2	216.2	176.3
Estragon (eau 24 heures)	79.2	72.2	70.2	-	Eau	102.8	148.2	277.1
Feuilles de céleri rave (eau 1 heure)	64.0	71.6	68.6	-	Eau	94.2	216.2	176.3
Hibiscus (eau 1 heure)	83.8	74.9	68.9	-	Eau	102.8	148.2	277.1
Marjolaine (eau 24 heures)	69.1	60.5	59.5	-	Eau	60.9	118.8	106.5
Origano Doux (eau 1 heure)	41.0	37.9	37.7	-	Eau	38.3	92.7	120.2
Origano Fort (eau 24 heures)	32.3	30.9	42.6	-	Eau	38.3	92.7	120.2
Persil (eau 1 heure)	18.9	20.0	21.7	-	Eau	28.9	49.8	33.3
Persil Italien (eau 1 heure)	20.8	21.9	23.7	-	Eau	28.9	49.8	33.3
Romarin (eau 1 heure)	32.7	37.1	33.9	-	Eau	38.3	92.7	120.2
Sariette (eau 24 heures)	61.1	54.7	50.7	-	Eau	60.9	118.8	106.5
Verveine (eau 1 heure)	73.1	68.7	61.7	-	Eau	94.2	216.2	176.3
Menthe (éthanol 4 heures)	39.1	41.9	28.3	-	Éthanol	50.6	105.1	169.4
Pollen (éthanol 24 heures)	42.3	34.2	26.5	-	Éthanol	50.6	105.1	169.4
Rhue (éthanol 24 heures)	38.4	49.9	63.1	-	Éthanol	50.6	105.1	169.4
Sauge (éthanol 4 heures)	38.0	39.8	310.8	+	Éthanol	50.6	105.1	169.4
Thym (éthanol 4 heures)	97.4	90.9	64.1	-	Éthanol	111.8	148.2	277.1

N.B. : La mutagénicité d'un produit est positive (+) lorsque les unités de B-galactosidase sont équivalentes au double de celle du contrôle négatif (le solvant).

**TABLEAU 5.3: Mutagénicité "per se" de différents produits commerciaux thérapeutiques déterminé à l'aide du test Umu.**

Nom du produit	Unités de B-galactosidase (moyennes de duplicata) à différente concentration du produit (en µg/ml)			Mutagénicité	Unités de B-galactosidase (moyennes de duplicata) des contrôles			
	19.6	78.3	313		Contrôle (-)		Contrôle (+) Dichro. de K. à	
					Solvant	Unités	336 µg/ml	1680 µg/ml
Fluxarola	77.0	62.6	64.3	-	Eau	60.9	118.8	106.5
Bioflavonoïd de citron	32.0	31.2	33.9	-	Éthanol	33.4	80.0	152.5
Chapparal	75.3	81.9	82.8	-	Éthanol	84.7	126.9	230.5
Co-Q10	98.9	108.1	106.8	-	Éthanol	99.4	146.0	262.1
Échinaforce	85.3	104.8	99.0	-	Éthanol	99.4	146.0	262.1
Gotu-kola	83.7	77.7	78.8	-	Éthanol	84.7	126.9	230.5
Lapacho	29.5	31.4	31.0	-	Éthanol	33.4	80.0	152.5
Poudre d'ail	82.7	99.8	110.7	-	Éthanol	99.4	146.0	262.1
Pycnogenol	84.2	92.2	90.8	-	Éthanol	99.4	146.0	262.1
Reishi	78.7	79.0	87.1	-	Éthanol	84.7	126.9	230.5
Spirulina	30.4	35.0	34.5	-	Éthanol	33.4	80.0	152.5
Trèfle rouge	33.6	35.6	31.8	-	Éthanol	33.4	80.0	152.5

N.B. : La mutagénicité d'un produit est positive (+) lorsque les unités de B-galactosidase sont équivalentes au double de celle du contrôle négatif (le solvant).

On y retrouve les noms des produits étudiés, les unités de  $\beta$ -galactosidase qu'il engendre à différentes concentrations, leur solvant ainsi que les unités d'enzyme engendrées par ce dernier. On se rappellera que pour obtenir un résultat de mutagénéicité positif (+), il faut que les unités de  $\beta$ -galactosidase produites par les bactéries en présence du produit à analyser soit équivalentes au double des unités du solvant.

#### 4.4.1.1 Mutagénéicité per se des produits commerciaux purifiés

Les résultats de mutagénéicité per se des produits commerciaux purifiés hydro et liposolubles sont présentés au tableau 5.1. Sur les 22 produits de cette classe 20 (91%) n'ont pas d'effet mutagénique sur les bactéries. Les deux (9%) produits mutagènes sont le BHA et le morin. Le BHA induit une production de 233.6 unités de  $\beta$ -galactosidase à 313  $\mu\text{g/ml}$  par rapport à 68.2 unités pour son solvant (contrôle négatif). Le morin provoque la génération de 466.0 unités de l'enzyme à 313  $\mu\text{g/ml}$  contre 120.2 pour son contrôle négatif.

#### 4.4.1.2 Mutagénéicité per se des extraits d'épices

Nous avons étudié 22 extraits d'épices pour évaluer leur mutagénéicité per se (tableau 5.2). L'extrait éthylique de sauge semble mutagène selon les résultats que nous avons obtenus. En concentration finale à 3360  $\mu\text{g/ml}$ , cet extrait induit la production de 310.8 unités de  $\beta$ -galactosidase, alors que

l'éthanol (solvant) provoque la production de seulement 50.6 unités. Les autres extraits d'épice (21/22 soit 96%) ne possèdent pas de propriétés mutagènes dans nos conditions expérimentales aux concentrations de 210, 840, 3360  $\mu\text{g/ml}$ .

#### 4.4.1.3 Mutagénécité per se des produits commerciaux thérapeutiques

Aucun des 12 produits commerciaux thérapeutiques dont nous avons étudiés la mutagénécité per se ne sont mutagènes par eux-mêmes aux concentrations utilisées au cours des expérimentations. Ces résultats sont présentés au tableau 5.3.

#### 4.4.2 Étude de la mutagénécité des métabolites des produits à étudier

Les tableaux 6.1 à 6.3 présentent les résultats de mutagénécité des métabolites hépatiques des produits commerciaux purifiés, des extraits d'épices et des produits commerciaux thérapeutiques. On y retrouve pour les produits étudiés, les unités de  $\beta$ -galactosidase produites à différentes concentrations, leur solvant ainsi que les unités d'enzyme engendrées par ce dernier. Les variations d'unités de  $\beta$ -galactosidase varient pour un même solvant de façon journalière étant donné qu'on n'utilise pas exactement le même nombre de bactéries d'une journée à l'autre.

**TABLEAU 6.1: Mutagénicité des métabolites de différents produits commerciaux purifiés hydro et liposolubles déterminé à l'aide du test Umu.**

Nom du produit	Famille chimique	Unités de B-galactosidase (moyennes de duplicata) à différente concentration du produit (en µg/ml)			Mutagénicité	Unités de B-galactosidase (moyennes de duplicata) des contrôles			
		19.6	78.3	313		Contrôle (-)		Contrôle (+) Quercetin à	
						Solvant	Unités	78.3 µg/ml	313 µg/ml
Acide phytique	Phytate	58.2	55.2	55.2	-	Eau	65.8	116.3	224.7
Cadmium chloride	Minéraux	27.2	11.0	11.6	-	Eau	65.8	116.3	224.7
Dithiothréitol	Thiol	81.4	95.9	101.6	-	Eau	98.9	168.4	231.4
Glutathion	Aminothiol	78.0	77.2	94.9	-	Eau	98.9	168.4	231.4
Hydroquinone	Catéchol	57.3	60.5	64.6	-	Eau	65.8	116.3	224.7
N-acétyl-L-cystéine	Aminothiol	85.4	89.4	86.9	-	Eau	98.9	168.4	231.4
Rutine	Glucoside	94.7	96.9	91.4	-	Eau	95.3	168.4	231.4
Vitamine C	Vitamine et préc.	52.4	57.0	64.1	-	Eau	65.8	116.3	224.7
Ajmalicine	Alcaloïde	95.6	101.2	107.6	-	Éthanol	104.8	158.3	236.2
Bathophéнанthroline	Autres	122.0	140.2	155.7	-	Éthanol	147.6	158.1	221.9
BHA	Add. alimentaire	102.9	122.9	282.1	+	Éthanol	104.5	171.7	231.5
BHT	Add. alimentaire	98.3	103.1	98.9	-	Éthanol	104.5	171.7	231.5
Biochanin A	Isoflavone	53.8	64.3	66.4	-	Éthanol	60.8	84.8	105.9
Catéchol	Catéchol	103.6	108.7	111.4	-	Éthanol	104.5	171.7	231.5
Épicatéchine	Catéchine	56.6	59.1	55.7	-	Éthanol	60.8	84.8	105.9
Gossypol	Autres	98.0	110.9	58.3	-	Éthanol	104.8	158.3	236.2
Indole-3-acetonitryl	Indole	51.4	60.9	61.6	-	Éthanol	60.8	84.8	105.9
Morin	Flavonoïde	125.2	154.8	255.6	-	Éthanol	147.6	158.1	221.9
Phénidone	Autres	137.8	141.0	145.6	-	Éthanol	147.6	158.1	221.9
Sempervirine	Alcaloïde	102.4	112.1	N.D.	-*	Éthanol	104.8	158.3	236.2
Vitamine A	Vitamine et préc.	82.2	80.3	58.7	-	Éthanol	104.8	158.3	236.2
Vitamine E	Vitamine et préc.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Éthanol	104.5	171.7	231.5

N.B. : La mutagénicité d'un produit est positive (+) lorsque les unités de B-galactosidase sont équivalentes au double de celle du contrôle négatif (le solvant).

N.D. signifie non déterminé.

\* indique qu'une concentration manque

**TABLEAU 6.2: Mutagénicité des métabolites de différents extraits d'épices déterminé à l'aide du test Umu.**

Nom du produit	Unités de B-galactosidase à différente concentration du produit (en µg/ml)			Mutagénicité	Unités de B-galactosidase des contrôles			
	210	840	3360		Contrôle (-)		Contrôle (+) Quercetin à	
					Solvant	Unités	78.3 µg/ml	313 µg/ml
Ail (eau 1 heure)	94.8	64.4	69.4	-	Eau	89.0	195.9	120.8
Aneth (eau 1 heure)	76.8	84.3	87.3	-	Eau	83.9	81.9	187.4
Basilic (eau 1 heure)	83.6	81.3	82.9	-	Eau	89.0	195.9	120.8
Camomille (eau 24 heures)	74.5	92.1	81.0	-	Eau	89.9	149.1	140.7
Ciboulette à l'ail (eau 1 heure)	69.2	76.2	65.5	-	Eau	79.9	130.2	253.4
Coriandre (eau 1 heure)	71.4	82.9	62.2	-	Eau	89.0	195.9	120.8
Estragon (eau 24 heures)	111.2	115.8	97.8	-	Eau	107.1	199.3	196.9
Feuille de céleri rave (eau 1 heure)	84.1	91.2	89.9	-	Eau	89.0	195.9	120.8
Hibiscus (eau 1 heure)	89.1	90.8	103.1	-	Eau	83.9	81.9	187.4
Marjolaine (eau 24 heures)	121.9	123.9	98.7	-	Eau	107.1	199.3	196.9
Origano doux (eau 1 heure)	84.5	72.8	78.1	-	Eau	79.9	130.2	253.4
Origano Fort (eau 24 heures)	123.3	111.0	101.9	-	Eau	107.1	199.3	196.9
Persil (eau 1 heure)	67.8	80.1	85.0	-	Eau	79.9	130.2	253.4
Persil Italien (eau 1 heure)	76.4	75.8	86.5	-	Eau	79.9	130.2	253.4
Romarin (eau 1 heure)	114.0	115.1	109.1	-	Eau	107.6	133.5	215.1
Sariette (eau 24 heures)	95.8	78.4	62.0	-	Eau	83.9	81.9	187.4
Verveine (eau 1 heure)	85.3	78.2	68.1	-	Eau	83.9	81.9	187.4
Menthe (éthanol 4 heures)	112.8	109.3	75.9	-	Éthanol	108.1	133.5	215.1
Pollen (éthanol 24 heures)	94.3	92.5	66.1	-	Éthanol	100.1	149.1	140.7
Rhue (éthanol 24 heures)	89.1	92.7	60.0	-	Éthanol	100.1	149.1	140.7
Sauge (éthanol 4 heures)	118.4	114.2	105.1	-	Éthanol	108.1	133.5	215.1
Thym (éthanol 4 heures)	103.8	121.8	107.5	-	Éthanol	108.1	133.5	215.1

N.B. : La mutagénicité d'un produit est positive (+) lorsque les unités de B-galactosidase sont équivalentes au double de celle du contrôle négatif (le solvant).

**TABLEAU 6.3: Mutagénicité des métabolites de différents produits commerciaux thérapeutiques déterminé à l'aide du test Umu.**

Nom du produit	Unités de B-galactosidase à différente concentration du produit (en µg/ml)			Mutagénicité	Unités de B-galactosidase des contrôles			
	19.6	78.3	313		Contrôle (-)		Contrôle (+) Quercetin à	
					Solvant	Unités	78.3 µg/ml	313 µg/ml
Fluxarola	115.4	115.9	102.6	-	Eau	107.1	199.3	196.9
Bioflavonoïds de citron	69.0	62.5	61.2	-	Éthanol	65.1	56.5	154.7
Chaparral	87.6	84.8	82.5	-	Éthanol	85.0	77.1	293.7
Co-Q10	87.6	84.0	84.6	-	Éthanol	85.0	77.1	293.7
Échinaforce	102.7	120.3	114.1	-	Éthanol	108.6	74.4	161.1
Gotu-kola	95.7	113.4	124.7	-	Éthanol	108.6	74.4	161.1
Lapacho	85.6	85.4	73.4	-	Éthanol	85.0	77.1	293.7
Poudre d'ail	69.7	72.9	72.3	-	Éthanol	65.1	56.5	154.7
Pycnogenol	66.2	57.2	48.8	-	Éthanol	65.1	56.5	154.7
Reishi	155.5	115.7	113.3	-	Éthanol	108.6	74.4	161.1
Spirulina	70.7	66.5	60.9	-	Éthanol	65.1	56.5	154.7
Trèfle rouge	85.1	86.0	87.9	-	Éthanol	85.0	77.1	293.7

N.B. : La mutagénicité d'un produit est positive (+) lorsque les unités de B-galactosidase sont équivalentes au double de celle du contrôle négatif (le solvant).

On se souviendra qu'un produit peut ne pas être mutagène par lui-même, mais ses métabolites produits par sa métabolisation hépatique peuvent l'être. La métabolisation hépatique est assurée, dans nos expérimentations, par la fraction S9 de foie de rat qui contient les enzymes de type cytochrome P-450 que nous ajoutons au milieu de culture des bactéries en présence du produit à étudier.

#### **4.4.2.1 Mutagénéicité des métabolites des produits commerciaux purifiés**

Le tableau 6.1 présente les résultats de mutagénéicité obtenus avec les métabolites des produits commerciaux purifiés que nous avons étudiés. Un seul de ces derniers s'avère mutagène par l'action de ces métabolites. Il s'agit du BHA qui provoque la production de 282.1 unités de  $\beta$ -galactosidase par rapport à 104.5 dans le cas de son solvant (contrôle négatif). Les 20 autres produits étudiés ne possèdent pas d'activité mutagénique dans leurs métabolites une fois transformés par les cytochromes P-450.

#### **4.4.2.2 Mutagénéicité des métabolites des extraits d'épices**

Le tableau 6.2 montre qu'aucun des 22 extraits d'épices étudiées ne devient mutagène sous l'action des enzymes hépatiques, dans le modèle bactérien, dans nos conditions expérimentales et aux concentrations finales de 210, 840 et 3360  $\mu\text{g/ml}$ .

#### 4.4.2.3 Mutagénéicité des métabolites des produits commerciaux thérapeutiques

Aucun des 12 produits commerciaux que nous avons étudiés ne se s'est transformé en substances mutagènes une fois digéré par les enzymes hépatiques. Ces résultats sont présentés au tableau 6.3.

#### 4.4.3 Étude de l'antimutagénéicité per se des produits étudiés sur le dichromate de potassium

Les tableaux 7.1 à 7.3 présente les résultats sur les propriétés antimutagènes des produits commerciaux purifiés, des extraits d'épices et des produits commerciaux thérapeutiques étudiés. L'antimutagénéicité est évaluée par l'inhibition que provoque le produit étudié sur la mutagénéicité d'une substance mutagénique soit le dichromate de potassium pour l'antimutagénéicité per se du produit en soi, soit le quercetin pour l'étude des propriétés antimutagènes des métabolites du produit. Le pourcentage d'inhibition est mesuré en unités de  $\beta$ -galactosidase engendrées par le dichromate de potassium ou le quercetin (produits mutagènes). La différence mesurée en unités de  $\beta$ -galactosidase exprimée en pourcentage entre le mutagène seul et le mutagène en présence du produit étudié est représentative du pouvoir antimutagène du produit étudié.

**TABLEAU 7.1: Étude de l'effet de l'ajout de différents produits commerciaux purifiés sur la mutagénicité du dichromate de potassium.**

Nom du produit	Famille chimique	Solvant du produit	Unités de B-galactosidase		% de d'inhibition ou de potentialisation de l'activité mutagénique	
			Produit + Mutagène (Dichromate de potassium)	Mutagène seul (Dichromate de potassium)	Inhibition	Potentia-lisation
Acide Phytique	Phytate	Eau	97.1	101.4	4.2	
Cadmium chloride	Minéraux	Eau	30.6	142.5	78.5	
Dithiothreitol	Thiol	Eau	45.5	72.8	37.4	
Glutathion	Aminothiols	Eau	46.1	72.8	36.6	
Hydroquinone	Catéchol	Eau	82.9	103.5	19.9	
N-acétyl-cystéine	Aminothiols	Eau	101.2	120.9	16.3	
Rutine	Glucoside	Eau	4.2	101.4	95.9	
Vitamine C	Vitamine et préc.	Eau	90.3	103.5	12.8	
Ajmalicine	Alcaloïde	Éthanol	41.0	79.0	48.0	
Bathophénanthroline	Autres	Éthanol	141.1	142.5	1.0	
BHA	Add. alimentaire	Éthanol	146.0	101.4		44.0
BHT	Add. alimentaire	Éthanol	-141.8	101.4	239.9	
Biochanin A	Isoflavone	Éthanol	111.5	120.9	7.8	
Catéchol	Catéchol	Éthanol	113.2	278.4	59.3	
Épicatéchine	Catéchine	Éthanol	3.0	79.0	96.2	
Gossypol	Autres	Éthanol	54.9	120.9	54.6	
Indole-3-acétonitryl	Indole	Éthanol	30.4	72.8	58.2	
Morin	Flavonoïde	Éthanol	61.1	142.5	57.2	
Phenidone	Autres	Éthanol	101.8	120.9	15.8	
Sempervirine	Alcaloïde	Éthanol	-4.6	79.0	105.9	
Vitamine A	Vitamine et préc.	Éthanol	25.4	79.0	67.9	
Vitamine E	Vitamine et préc.	Éthanol	-10.3	278.4	103.7	

**TABLEAU 7.2: Étude de l'effet de l'ajout de différents extraits d'épices sur la mutagénicité du dichromate de potassium.**

Nom du produit	Solvant du produit	Unités de B-galactosidase		% de d'inhibition ou de potentialisation de l'activité mutagénique	
		Produit + Mutagène (Dichromate de potassium)	Mutagène seul (Dichromate de potassium)	Inhibition	Potentia-lisation
Ail (eau 1 heure)	Eau	92.5	118.8	22.2	
Aneth (eau 1 heure)	Eau	155.4	216.2	28.1	
Basilic (eau 1 heure)	Eau	24.8	49.8	50.2	
Camomille (eau 24 heures)	Eau	95.9	148.2	35.3	
Ciboulette à l'ail (eau 1 heure)	Eau	41.0	49.8	17.6	
Coriandre (eau 1 heure)	Eau	163.7	216.2	24.3	
Estragon (eau 24 heures)	Eau	-20.3	148.2	113.7	
Feuille de céleri rave (eau 1 heure)	Eau	173.9	216.2	19.6	
Hibiscus (eau 1 heure)	Eau	99.2	148.2	33.0	
Marjolaine (eau 24 heures)	Eau	81.2	118.8	31.6	
Origano Doux (eau 1 heure)	Eau	56.6	92.7	39.0	
Origano Fort (eau 24 heures)	Eau	60.4	92.7	34.9	
Persil (eau 1 heure)	Eau	36.8	49.8	26.1	
Persil Italien (eau 1 heure)	Eau	58.8	49.8		18.2
Romarin (eau 1 heure)	Eau	82.6	92.7	10.9	
Sariette (eau 24 heures)	Eau	109.2	118.8	8.1	
Verveine (eau 1 heure)	Eau	131.2	216.2	39.3	
Menthe (éthanol 4 heures)	Éthanol	30.8	105.1	70.7	
Pollen (éthanol 24 heures)	Éthanol	21.4	105.1	79.6	
Rhue (éthanol 24 heures)	Éthanol	54.0	105.1	48.7	
Sauge (éthanol 4 heures)	Éthanol	14.4	105.1	86.3	
Thym (éthanol 4 heures)	Éthanol	111.7	148.2	24.6	

**TABLEAU 7.3: Étude de l'effet de l'ajout de différents produits commerciaux thérapeutiques sur la mutagénicité du dichromate de potassium.**

Nom du produit	Solvant du produit	Unités de B-galactosidase		% de d'inhibition ou de potentialisation de l'activité mutagénique	
		Produit + Mutagène (Dichromate de potassium)	Mutagène seul (Dichromate de potassium)	Inhibition	Potentia- lisation
Fluxarola	Eau	95.0	118.8	20.0	
Bioflavonoid de citron	Éthanol	37.7	80.0	52.9	
Chapparal	Éthanol	71.2	126.9	43.9	
Co-Q10	Éthanol	150.3	146.0		2.9
Échinaforce	Éthanol	193.5	146.0		32.6
Gotu-kola	Éthanol	108.6	126.9	14.5	
Lapacho	Éthanol	43.6	80.0	45.5	
Poudre d'ail	Éthanol	132.2	146.0	9.4	
Pycnogenol	Éthanol	90.2	146.0	38.2	
Reishi	Éthanol	119.9	126.9	5.5	
Spirulina	Éthanol	48.7	80.0	39.1	
Trèfle rouge	Éthanol	50.3	80.0	37.1	

#### 4.4.3.1 Antimutagénéicité per se des produits commerciaux purifiés

Le tableau 7.1 présente les résultats d'antimutagénéicité des produits commerciaux sur l'activité mutagénique per se du dichromate de potassium. Des 22 produits étudiés, 14 inhibent de 35% et plus l'activité mutagénique per se du dichromate de potassium. Ces produits sont le cadmium chloride, le dithiothreitol, le glutathion, la rutine (ces derniers sont hydrosolubles), l'ajmalicine, le BHT, le catéchol, l'épicatéchine, le gossypol, l'indole-3-acétonitryl, le morin, la sempervirine, la vitamine A et la vitamine E (ces derniers sont liposolubles).

Le BHA est le seul qui semble pouvoir potentialiser l'activité mutagénique du dichromate de potassium de 44%.

Les sept autres produits étudiés inhibent tous l'activité mutagénique du dichromate de potassium de moins de 20%.

#### 4.4.3.2 Antimutagénéicité per se des extraits d'épices

Vingt-deux extraits d'épices ont été étudiés pour leur activité antimutagène per se. Ces résultats sont présentés au tableau 7.2. Dix extraits inhibent la mutagénéicité per se du dichromate de potassium de 35% et plus. Ces extraits sont le basilic (eau 1 heure), la camomille (eau 24 heures), l'estragon (eau 24 heures), l'origano doux (eau 1 heure), l'origano fort

(eau 24 heures), la verveine (eau 1 heure), la menthe (éthanol 4 heures), le pollen (éthanol 24 heures), la rhue (éthanol 24 heures) et la sauge (éthanol 4 heures).

Le persil italien (eau 1 heure) ou une substance associée semble potentialiser l'activité mutagénique per se du dichromate de potassium de 18%. Il faudrait répéter l'expérience avec d'autres extraits de persil italien pour confirmer cet effet, ou éliminer la possibilité que le persil puisse avoir été en contact avec des herbicides ou des pesticides qui possèderaient cet effet.

Les 11 autres extraits d'épices inhibent tous la mutagénicité du dichromate de potassium de moins de 35%, mais n'ont pas d'effet potentialisant.

#### 4.4.3.3 Antimutagénicité per se des produits commerciaux thérapeutiques

Le tableau 7.3 présente les résultats d'antimutagénicité per se des 12 produits commerciaux thérapeutiques étudiés. Six d'entre-eux inhibent de 35% et plus l'activité mutagénique du dichromate de potassium. Il s'agit des bioflavonoïdes de citron, du chaparral, du lapacho, du pycnogenol, de la spirulina et du trèfle rouge. Ils sont tous solubilisés dans l'éthanol.

L'échinaforce semble potentialiser l'activité mutagénique du dichromate de potassium de 33%. Il serait bon de pousser les recherches plus à fond pour confirmer cet effet.

Les autres produits commerciaux thérapeutiques étudiés inhibent l'activité mutagénique du dichromate de potassium de 20% et moins, mais ne semblent pas potentialiser la mutagénéité du dichromate de potassium.

#### **4.4.4 Étude de l'antimutagénéité des métabolites de différents produits sur le quercetin**

Les tableaux 8.1 à 8.3 présente les résultats d'antimutagénéité des produits commerciaux purifiés, des extraits d'épices et des produits commerciaux thérapeutiques étudiés une fois digérés par les enzymes hépatiques de la fraction S9. Cette antimutagénéité est évaluée par l'inhibition de la mutagénéité du quercetin. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la mutagénéité du quercetin par l'action des métabolites des produits étudiés.

##### **4.4.4.1 Antimutagénéité des métabolites des produits commerciaux purifiés**

Le tableau 8.1 présente les résultats d'antimutagénéité des 22 produits commerciaux purifiés que nous avons étudiés. Onze de ces produits purifiés semble inhiber l'activité mutagénique du quercetin de plus de 35%. Ces produits sont le

**TABLEAU 8.1: Étude de l'effet de l'ajout de différents produits commerciaux purifiés sur la mutagénicité du quercétin.**

Nom du produit	Famille chimique	Solvant du produit	Unités de B-galactosidase		% de d'inhibition ou de potentialisation de l'activité mutagénique	
			Produit + Mutagène (Quercétin)	Mutagène seul (Quercétin)	Inhibition	Potentia-lisation
Acide phytique	Phytate	Eau	169.5	224.7	24.6	
Cadmium chloride	Minéraux	Eau	32.1	224.7	85.7	
Dithiothréitol	Thiol	Eau	154.9	231.4	33.0	
Glutathion	Aminothiols	Eau	122.1	231.4	47.2	
Hydroquinone	Catéchol	Eau	82.6	224.7	63.3	
N-acétyl-L-cystéine	Aminothiols	Eau	230.4	231.4	0.4	
Rutine	Glucoside	Eau	122.0	231.4	47.3	
Vitamine C	Vitamine et préc.	Eau	174.1	224.7	22.5	
Ajmalicine	Alcaloïde	Éthanol	121.4	236.2	48.6	
Bathophénanthroline	Autres	Éthanol	206.7	221.9	6.8	
BHA	Add. alimentaire	Éthanol	236.3	231.5		2.1
BHT	Add. alimentaire	Éthanol	157.5	231.5	32.0	
Biochanin A	Isoflavone	Éthanol	226.9	105.9		114.2
Catéchol	Catéchol	Éthanol	117.6	231.5	49.2	
Épicatéchine	Catéchine	Éthanol	57.8	105.9	45.4	
Gossypol	Autres	Éthanol	64.1	236.2	72.9	
Indole-3-acetonitryl	Indole	Éthanol	61.8	105.9	41.7	
Morin	Flavonoïde	Éthanol	3.6	221.9	98.4	
Phénidone	Autres	Éthanol	177.4	221.9	20.0	
Sempervirine	Alcaloïde	Éthanol	162.3	236.2	31.3	
Vitamine A	Vitamine et préc.	Éthanol	214.4	236.2	9.3	
Vitamine E	Vitamine et préc.	Éthanol	138.4	231.5	40.2	

**TABLEAU 8.2: Étude de l'effet de l'ajout de différents extraits d'épices sur la mutagénéité du quercétin.**

Nom du produit	Solvant du produit	Unités de B-galactosidase		% de d'inhibition ou de potentialisation de l'activité mutagénique	
		Produit + Mutagène (Quercétin)	Mutagène seul (Quercétin)	Inhibition	Potentialisation
Ail (eau 1 heure)	Eau	N.D.	120.8	-	-
Aneth (eau 1 heure)	Eau	168.2	187.4	10.3	
Basilic (eau 1 heure)	Eau	N.D.	120.8	-	-
Camomille (eau 24 heures)	Eau	197.1	140.7		40.1
Ciboulette à l'ail (eau 1 heure)	Eau	131.7	253.4	48.0	
Coriandre (eau 1 heure)	Eau	76.9	120.8	36.4	
Estragon (eau 24 heures)	Eau	351.4	196.9		78.4
Feuille de céleri rave (eau 1 heure)	Eau	580.0	120.8		380.0
Hibiscus (eau 1 heure)	Eau	155.2	187.4	17.2	
Marjolaine (eau 24 heures)	Eau	151.0	196.9	23.3	
Origano doux (eau 1 heure)	Eau	131.6	253.4	48.1	
Origano Fort (eau 24 heures)	Eau	51.0	196.9	74.1	
Persil (eau 1 heure)	Eau	88.4	253.4	65.1	
Persil Italien (eau 1 heure)	Eau	212.6	253.4	16.1	
Romarin (eau 1 heure)	Eau	218.1	215.1		1.4
Sariette (eau 24 heures)	Eau	130.6	187.4	30.3	
Verveine (eau 1 heure)	Eau	167.3	187.4	10.7	
Menthe (éthanol 4 heures)	Éthanol	66.9	215.1	68.9	
Pollen (éthanol 24 heures)	Éthanol	127.5	140.7	9.4	
Rhue (éthanol 24 heures)	Éthanol	N.D.	140.7	-	-
Sauge (éthanol 4 heures)	Éthanol	509.2	215.1		136.7
Thym (éthanol 4 heures)	Éthanol	-87.5	215.1	140.7	

N.D. : Signifie non déterminé

**TABLEAU 8.3: Étude de l'effet de l'ajout de différents produits commerciaux thérapeutiques sur la mutagénicité du quercétin.**

Nom du produit	Solvant du produit	Unités de B-galactosidase		% de d'inhibition ou de potentialisation de l'activité mutagénique	
		Produit + Mutagène (Quercétin)	Mutagène seul (Quercétin)	Inhibition	Potentialisation
Fluxarola	Eau	248.0	196.9		25.9
Bioflavonoïds de citron	Éthanol	67.7	154.7	56.3	
Chaparral	Éthanol	83.6	293.7	71.5	
Co-Q10	Éthanol	76.1	293.7	74.1	
Échinaforce	Éthanol	117.8	161.1	26.9	
Gotu-kola	Éthanol	101.3	161.1	37.1	
Lapacho	Éthanol	56.8	293.7	80.6	
Poudre d'ail	Éthanol	1.3	154.7	99.2	
Pycnogenol	Éthanol	-18.1	154.7	111.7	
Reishi	Éthanol	101.9	161.1	36.7	
Spirulina	Éthanol	68.0	154.7	56.1	
Trèfle rouge	Éthanol	76.3	293.7	74.0	

cadmium chloride, le glutathion, l'hydroquinone, la rutine (produits hydrosolubles), l'ajmalicine, le catéchol, l'épicatéchine, le gossypol, l'indole-3-acétonitryl, le morin et la vitamine E (produits liposolubles).

À titre de rappel, le cadmium chloride fait partie de la famille des minéraux. L'hydroquinone est un catéchol hydrosoluble. La rutine est un glucoside. L'ajmalicine est un alcaloïde, le catéchol est un composé de la famille des catéchol, l'épicatéchine fait partie de la famille des catéchine, l'indole-3-acétonitryl est un indole, le morin est un flavonoïde et la vitamine E fait partie de la famille des vitamines et précurseurs vitaminiques.

Le biochanin A semble potentialiser, par l'action de ses métabolites hépatiques, l'activité mutagène des métabolites du quercetin de 114%. Il faudrait répéter l'expérience pour confirmer cet effet.

Les dix autres produits commerciaux purifiés étudiés inhibent l'activité mutagénique du quercetin de moins de 35% et ne semblent pas potentialiser la mutagénicité du quercetin.

#### 4.4.4.2 Antimutagénicité des métabolites des extraits d'épices

Les résultats d'antimutagénicité des métabolites des 20 extraits d'épices étudiés sont présentés au tableau 8.2. Sept

extraits d'épices semble inhiber de plus de 35% l'activité mutagénique des métabolites du quercetin. Il s'agit de la ciboulette à l'ail (eau 1 heure), la coriandre (eau 1 heure), l'origano doux (eau 1 heure), l'origano fort (eau 24 heures), le persil (eau 1 heure), la menthe (éthanol 4 heures) et le thym (éthanol 4 heures).

Cinq extraits d'épices semblent pouvoir potentialiser l'activité du quercetin par l'action de leurs métabolites. Ces extraits sont la camomille (eau 24 heures), l'estragon (eau 24 heures), les feuilles de céleri rave (eau 1 heure), la sauge (éthanol 4 heures) et le romarin (eau 1 heure). De cette liste, les 4 premiers potentialisent l'activité mutagène du quercetin de plus de 40%. Il faudrait répéter ces expériences et aussi avec des épices d'autres provenances pour éliminer la possibilité de présence de substances chimiques génotoxiques comme certains pesticides à l'intérieur de ces épices.

Les autres extraits d'épices semblent tous inhiber l'activité mutagénique du quercetin de moins de 35%, mais ils ne semblent pas potentialiser cette mutagénicité.

#### **4.4.4.3 Antimutagénicité des métabolites des produits commerciaux thérapeutiques**

Le tableau 8.3 présente les résultats d'antimutagénicité des métabolites des 12 produits commerciaux thérapeutiques

étudiés. Mis à part le fluxarola qui semble potentialiser l'activité mutagénique des métabolites du quercetin de 26% dans nos conditions expérimentales, tous les autres produits étudiés inhibent l'activité mutagène du quercetin. Seul l'échinaforce l'inhibe de moins de 35%. Les autres inhibent tous de plus de 35% l'activité mutagène des métabolites du quercetin. Ces produits sont les bioflavonoïdes de citron, le chaparral, le Co-Q10, le gotu-kola, le lapacho, la poudre d'ail, le pycnogenol, le reishi, la spirulina et le trèfle rouge (tous solubilisés dans l'éthanol).

#### 4.5 RÉSUMÉ DES RÉSULTATS

Les tableaux 9.1 à 9.4 présentent une synthèse des résultats que nous avons obtenus au cours de nos expérimentations et que nous avons décrits précédemment. On y présente la force antioxydante des différents produits que nous avons étudiés, leurs propriétés mutagènes en soi et de leurs métabolites hépatiques, ainsi que leurs propriétés antimutagènes en soi et de leurs métabolites. On y présente également les familles chimiques auxquelles les molécules purifiées appartiennent.

**TABEAU 9.1: Activité antioxydante, mutagénéité et anti-mutagénéité de différents produits commerciaux purifiés hydrosolubles.**

Nom des produits	Famille chimique	Solvant utilisé	Force antioxydante	Mutagénéité		% d'inhibition ou de potentialisation de la mutagénéité de produits mutagènes	
				Per se (sans fraction S9)	Des métabolites (avec fraction S9)	Dichromate de potassium	Quercétin
Vitamine C	Vitamine et préc.	Eau	Fort	-	-	-12.8	-22.5
Hydroquinone	Catéchol	Eau	Fort	-	-	-19.9	-63.3
Rutine	Glucoside	Eau	Fort	-	-	-95.9	-47.3
Acide phytique	Phytate	Eau	Neutre	-	-	-4.2	-24.6
Cadmium	Minéraux	Eau	Oxydant	-	-	-78.5	-85.7
Dithiothreitol	Thiol	Eau	Oxydant	-	-	-37.4	-33.0
Glutathion	Aminothiol	Eau	Oxydant	-	-	-36.6	-47.2
N-acétyl-cystéine	Aminothiol	Eau	Oxydant	-	-	-16.3	-0.4

**TABEAU 9.2: Activité antioxydante, mutagénéité et anti-mutagénéité de différents produits commerciaux purifiés liposolubles.**

Nom des produits	Famille chimique	Solvant utilisé	Force antioxydante	Mutagénéité		% d'inhibition ou de potentialisation de la mutagénéité de produits mutagènes	
				Per se (sans fraction S9)	Des métabolites (avec fraction S9)	Dichromate de potassium	Quercétin
Vitamine E	Vitamine et préc.	Éthanol	Fort	-	N.D.	-103.7	-40.2
BHA	Add. alimentaire	Éthanol	Fort	+	+	44.0	2.1
Catéchol	Catéchol	Éthanol	Fort	-	-	-59.3	-49.2
Épicatéchine	Catéchine	Éthanol	Fort	-	-	-96.2	-45.4
Phénidone	Autres	Éthanol	Fort	-	-	-15.8	-20.0
Morin	Flavonoïde	Éthanol	Fort	+	-	-57.2	-98.4
BHT	Add. alimentaire	Éthanol	Moyen	-	-	-239.9	-32.0
Gossypol	Autres	Éthanol	Moyen-Fort	-	-	-54.6	-72.9
Ajmalicine	Alcaloïde	Éthanol	Neutre	-	-	-48.0	-48.6
Biochanin A	Isoflavone	Éthanol	Neutre	-	-	-7.8	114.2
Indole-3-acétonitryl	Indole	Éthanol	Neutre	-	-	-58.2	-41.7
Sempervirine	Alcaloïde	Éthanol	Neutre	-	-	-105.9	-31.3
Vitamine A	Vitamine et préc.	Éthanol	Neutre	-	-	-67.9	-9.3
Bathophenanthroline	Autres	Éthanol	Oxydant	-	-	-1.0	-6.8

N.D. : Non déterminé

**TABLEAU 9.3: Activité antioxydante, mutagénéité et anti-mutagénéité de différents extraits d'épices.**

Nom des produits	Solvant utilisé	Temps d'extraction en heures	Force antioxydante	Mutagénéité		% d'inhibition ou de potentialisation de la mutagénéité de produits mutagènes	
				Per se (sans fraction S9)	Des métabolites (avec fraction S9)	Dichromate de potassium	Quercétin
Origano doux	Eau	1	Fort	-	-	-39.0	-48.1
Origano fort	Eau	24	Fort	-	-	-34.9	-74.1
Romarin	Eau	1	Fort	-	-	-10.9	1.4
Ail	Eau	1	Moyen	-	-	-22.2	N.D.
Basilic	Eau	1	Moyen	-	-	-50.2	N.D.
Marjolaine	Eau	24	Moyen	-	-	-31.6	-23.3
Ciboulette à l'ail	Eau	1	Neutre	-	-	-17.6	-48.0
Aneth	Eau	1	Neutre	-	-	-28.1	-10.3
Camomille	Eau	24	Neutre	-	-	-35.3	40.1
Coriandre	Eau	1	Neutre	-	-	-24.3	-36.4
Estragon	Eau	24	Neutre	-	-	-113.7	78.4
Feuilles de céleri rave	Eau	1	Neutre	-	-	-19.6	380.0
Persil	Eau	1	Neutre	-	-	-26.1	-65.1
Persil Italien	Eau	1	Neutre	-	-	18.2	-16.1
Sariette	Eau	24	Neutre	-	-	-8.1	-30.3
Verveine	Eau	1	Neutre	-	-	-39.3	-10.7
Hibiscus	Eau	1	N.D.	-	-	-33.0	-17.2
Sauge	Éthanol	4	Fort	+	-	-86.3	136.7
Menthe	Éthanol	4	Fort	-	-	-70.7	-68.9
Thym	Éthanol	4	Moyen	-	-	-24.6	-140.7
Pollen	Éthanol	24	Neutre	-	-	-79.6	-9.4
Rhue	Éthanol	24	Neutre	-	-	-48.7	N.D.

N.D. : Non déterminé

**TABLEAU 9.4: Activité antioxydante, mutagénéité et anti-mutagénéité de différents produits commerciaux thérapeutiques.**

Nom des produits	Solvant utilisé	Force antioxydante	Mutagénéité		% d'inhibition ou de potentialisation de la mutagénéité de produits mutagènes	
			Per se (sans fraction S9)	Des métabolites (avec fraction S9)	Dichromate de potassium	Quercétin
Fluxarola	Eau	Moyen	-	-	-20.0	25.9
Bioflavonoïdes de citron	Éthanol	Moyen	-	-	-52.9	-56.3
Chaparral	Éthanol	Moyen	-	-	-43.9	-71.5
Poudre d'ail	Éthanol	Moyen	-	-	-9.4	-99.2
Pycnogenol	Éthanol	Moyen	-	-	-38.2	-111.7
Spirulina	Éthanol	Moyen	-	-	-39.1	-56.1
Co-Q10	Éthanol	Neutre	-	-	2.9	-74.1
Échinaforce	Éthanol	Neutre	-	-	32.6	-26.9
Gotu-kola	Éthanol	Neutre	-	-	-14.5	-37.1
Lapacho	Éthanol	Neutre	-	-	-45.5	-80.6
Reishi	Éthanol	Neutre	-	-	-5.5	-36.7
Trèfle rouge	Éthanol	Neutre	-	-	-37.1	-74.0

## 5 DISCUSSION

Cette section présente la discussion des résultats obtenus lors des expérimentations. Dans la première des cinq parties que compte cette section, nous discuterons des résultats du développement et de la mise au point de la microtechnique de mesure d'activité antioxydante. La seconde partie portera sur le test Umu et une variation technologique de ce dernier. Dans la troisième partie, nous discuterons des résultats d'activité antioxydante que nous avons obtenus pour les 56 produits étudiés. La quatrième partie portera sur les résultats de mutagénéicité de ces produits et la cinquième partie, sur les résultats d'antimutagénéicité obtenus à l'aide de notre variation technologique du test Umu qui sert à mesurer l'antimutagénéicité. La dernière partie de cette section consistera en une courte discussion sur l'ensemble des résultats obtenus au cours de nos travaux.

### **5.1 MICROTECHNIQUE D'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE**

Nous avons développé une microtechnique simple qui permet de mesurer et de sélectionner rapidement et simultanément le pouvoir antioxydant de plusieurs substances. Cette microtechnique permet une première sélection rapide de plusieurs substances pour leur pouvoir antioxydant et de façon simultanée. Il faut naturellement que les produits analysés soient solubles dans l'eau ou dans l'éthanol et qu'ils ne soient pas colorés intrinsèquement dans les tons de rouge. La différence entre la valeur d'activité antioxydante de la plus

grande concentration des contrôles positifs utilisés (313  $\mu\text{g/ml}$ ) et celle des contrôles négatifs est suffisamment grande pour nous permettre de sélectionner des produits qui possèdent une activité antioxydante. Nous discuterons 1) de la courbe standard; 2) de l'importance de la pureté du SDS; 3) des contrôles positifs et négatifs; 4) de la formule de transformation des D.O. en pourcentage d'activité antioxydante; 5) de l'expression des concentrations; 6) de ses limitations; 7) de sa rapidité; 8) de sa simplicité et 9) de ses avantages.

#### 5.1.1 Courbe standard du malonaldéhyde

La courbe standard des D.O. en fonction de la concentration de malonaldéhyde montre que cette relation est linéaire pour des D.O. allant de 0.000 jusqu'à 1.200. Cela confère à notre microtechnique une grande versatilité au niveau des mesures spectrophotométriques. Les D.O. situées à l'extérieur de ces bornes doivent être rejetées.

#### 5.1.2 Pureté du SDS

La différence d'activité antioxydante pour un même produit en présence de SDS de puretés différentes (figures 4 et 5) est probablement dû à une émulsification plus complète des liposomes d'acide linoléique effectué dans le SDS pur à 99% que dans du SDS purifié à 60%. L'émulsification plus ou moins complète diminuerait sensiblement l'oxydation résiduelle des acides gras par le fer lors de la réaction de coloration à 80°C

et serait responsable des différences obtenues. Il est donc recommandable de travailler toujours avec du SDS purifié à plus de 99%, ce que nous avons fait au cours de toutes nos expériences.

### **5.1.3 Contrôles positifs et négatifs**

Les courbes d'activité antioxydante moyennes des contrôles positifs et négatifs représentées aux figures 6 et 7 montrent un écart significatif entre ces contrôles. En effet, l'écart entre l'activité antioxydante des contrôles positifs et celle des contrôles négatifs est suffisamment grand pour permettre la mesure de l'activité antioxydante de produits inconnus et ainsi classifier ces derniers par rapport à l'activité antioxydante de ces contrôles. Les différences de valeurs de p atteignent un maximum à la concentration de 313  $\mu\text{g/ml}$  dans nos conditions expérimentales entre les contrôles positifs et négatifs hydrosolubles ( $p < 0.001$ ) et liposolubles ( $p < 0.001$ ) à la concentration de 313  $\mu\text{g/ml}$ .

### **5.1.4 Transformation des D.O. en pourcentage d'activité antioxydante**

La méthode de calcul du pourcentage d'activité antioxydante à partir des D.O., a l'avantage de tenir compte des variantes journalières entre les contrôles positifs et négatifs ce qui élimine une partie de ces variations. La formule de calcul tient compte également de l'écart type des

contrôles négatifs à l'intérieur d'un plateau de 96 puits ce qui contribue aussi à éliminer une partie du bruit de fond. C'est pour cette dernière raison que les contrôles négatifs peuvent présenter une valeur d'activité antioxydante supérieure à zéro. Une activité supérieure à 0% indiquerait que les contrôles négatifs ont une certaine activité antioxydante. Dans les faits, ceci serait plutôt causé par notre méthode de calcul parce que l'addition de l'écart type de la moyenne des contrôles négatifs à cette même moyenne semble augmenter la valeur d'activité antioxydante. Cette façon de calculer permet cependant de comparer l'activité antioxydante des différentes substances étudiées entre elles et par rapport à des points de repères connus soit: la vitamine C notre contrôle positif hydrosoluble ou la vitamine E notre contrôle positif liposoluble, car elle tient également compte de leurs valeurs dans le calcul.

#### 5.1.5 Expression des concentrations

Les concentrations sont exprimées en microgrammes de produits à analyser par millilitre de solution réactionnelle totale, avant l'ajout de la solution d'arrêt. Cette manière d'exprimer nos concentrations permet de tenir compte de la grosseur des molécules. Une grosse molécule qui possède plusieurs sites antioxydants, peut ainsi être comparée à une petite molécule n'ayant qu'un ou quelques sites antioxydants. Cette façon de travailler va dans le sens de nos objectifs de

développer une technologie simple, qui nous permettra de sélectionner rapidement des composés antioxydants et de comparer les activités antioxydantes des différents produits étudiés. Il est toujours possible de travailler en molarité et même de transformer les concentrations exprimées en  $\mu\text{g/ml}$  par des concentrations exprimées en moles/litre ou en millimoles/litre, lorsque cette méthode de quantification convient mieux.

#### 5.1.6 Limitations de la microtechnique

La microtechnique comporte deux limitations majeures: l'impossibilité d'étudier les produits insolubles dans l'eau ou dans l'éthanol. On ne peut donc pas étudier l'activité antioxydante des produits insolubles dans l'eau ou l'éthanol parce que le milieu réactionnel est aqueux. Les solvants organiques comme le chloroforme n'y sont pas miscibles, alors que l'éthanol possède une bonne affinité avec les milieux aqueux. Par exemple, on ne peut pas analyser l'activité antioxydante du  $\beta$ -carotène et de la réserpine car ils sont solubles surtout dans le chloroforme, mais pas dans l'eau ou l'éthanol. La solubilité des produits est aussi un problème pour toutes les techniques de mesure décrites dans notre avant-propos . Pour étudier un composé *in vitro* il faut toujours être en mesure de le solubiliser pour l'incorporer au milieu réactionnel. Souvent cette mesure nécessite de procéder à des expériences *in vivo* parce que le système digestif de l'animal

peut assimiler le composé. On pourrait aussi essayer de reproduire cette digestion *in vitro* à l'aide d'un modèle utilisant des enzymes digestives.

Nous avons déjà mentionné comme contrainte technique que les produits dont la coloration naturelle se situe dans les tons de rouge et de brun qui interfèrent dans la mesure spectrophotométrique du malonaldéhyde. Toutes les techniques qui utilisent les densités optiques et dont la coloration des produits étudiés absorbe dans le même spectre rencontrent ces difficultés. Le brun interfère moins que le rouge. Souvent, nous avons noté que la dilution du produit peut aider à diminuer l'impact de la coloration sur la mesure spectrophotométrique et la mesure devient possible.

#### 5.1.7 Rapidité de la microtechnique

La microtechnique est rapide parce qu'elle se fait en plaque de 96 puits. Un technicien peut facilement mesurer l'activité antioxydante de 6 à 10 plateaux de 96 puits par jour (figure 1). Dans chaque plateau on peut analyser 6 produits différents en plus des contrôles positifs et négatifs. Ainsi, mesure-t-on simultanément une grande quantité de produits ou de fractions purifiées pour leur activité antioxydante. En comparaison avec des techniques comme la peroxydation non-enzymatique des microsomes de foie de rat (ARUOMA Et al., 1990; LAUGHTON et al., 1991; QUINLAN et al., 1988; WILLS, 1969a;

WILLS, 1969b) où les mesures sont effectuées une par une, notre microtechnique présente les avantages de temps et de nombre d'échantillons qu'elle permet d'analyser simultanément. La technique rend possible la comparaison visuellement les résultats d'activité antioxydante entre les produits en analysant les couleurs des puits de la microplaque et leurs concentrations respectives.

#### 5.1.8 Simplicité de la microtechnique

La technique est simple car il n'y a pas de transvasements d'éprouvettes, ni d'extraction du chromogène à l'aide du butane-1-ol (HALLIWELL et al., 1987; HALLIWELL et GUTTERIDGE, 1981; LAUGHTON et al., 1989; QUINLAN et al., 1988), car la solution de coloration contenant du SDS clarifie le milieu réactionnel et nous permet d'y prendre les mesures de D.O. directement à l'aide d'un spectrophotomètre automatique adapté à la lecture colorimétrique des microplaques de 96 puits.

#### 5.1.9 Avantages de la microtechnique

En plus de sa rapidité et de sa simplicité, notre microtechnique nécessite peu de matériels. Comme elle est réalisée avec des microquantités de produits chimiques, elle se prête bien à l'étude de fractions purifiées par HPLC ou autres, à titre d'exemple. Mentionnons comme autre avantage non négligeable le fait que la microtechnique utilise des liposomes d'acide linoléique plutôt que des microsomes de foie de rat. On

évite ainsi le sacrifice inutile d'animaux de laboratoire et la tâche ardue de préparer les microsomes de foie. La présence des contrôles positifs et négatifs à l'intérieur de chaque microplaque nous apparaît comme un autre atout non négligeable parce qu'il nous donne l'assurance visuelle du bon déroulement des expérimentations. La visualisation des résultats est également immédiate à la vue de la microplaque suite à la réaction de coloration, même si l'utilisation d'un spectrophotomètre est essentielle pour le calcul des activités antioxydantes. À *fortiori* on pourrait sélectionner visuellement les produits antioxydants forts.

La microtechnique que nous avons développée et mise au point au cours de nos travaux, est tout à fait conforme à nos objectifs pour sa rapidité et la possibilité d'analyser plusieurs produits simultanément. Nous avons donc utilisé cette microtechnique et la manière d'exprimer les résultats que nous avons décrite, pour l'étude des propriétés antioxydantes des produits que nous avons analysés au cours de nos travaux.

## 5.2 LE TEST Umu

Le test Umu a été développé par Oda et al., 1985. Nous l'avons mis au point dans nos laboratoires pour évaluer le pouvoir mutagène de différents composés à étudier pour cette propriété biologique. Le test Umu se compare avantageusement au test de Ames (MARON et AMES, 1983) pour sa sensibilité dans la

détection des substances mutagènes, selon les conclusions de l'étude comparative de McDaniels et al., 1990. Par contre, le test Umu est beaucoup plus rapide et moins dispendieux que le test de Ames pour l'analyse de la mutagénéité. L'utilisation de différentes souches bactériennes comme dans le test de Ames, permet d'identifier le type de mutations qu'un produit mutagène provoque (MARON et AMES, 1983). Le test Umu ne permet pas cette évaluation. L'étude du type de mutations provoquées par les produits à étudier n'entraîne pas dans les objectifs que nous nous étions fixés. Cependant, le test Umu se prête mieux à nos objectifs de détection des propriétés mutagéniques des produits étudiés et nous avons opté pour ce test.

#### **5.2.1 Mesure de l'activité antimutagène**

Nous avons mis au point une variation technologique du test Umu pour étudier l'antimutagénéité des produits en utilisant leur capacité d'inhiber des substances mutagènes connues. Nous n'avons pas vu dans la littérature qu'un chercheur avait utilisé un test de mutagénéité bactérien pour étudier l'antimutagénéité d'un produit sauf une fois. Wong et al., 1992, ont en effet utilisé le test de Ames pour évaluer l'inhibition de la mutagénéité du benzo[a]pyrène (B[a]P) pour l'étude de deux extraits de plantes médicinales chinoises. Il faudra naturellement confirmer sur des modèles animaux en leur induisant un cancer expérimental. Ces études sont longues et dispendieuses en temps et en frais d'animalerie. Ainsi, les

chercheurs ont-ils tendance à rechercher comme nous l'avons fait, des tests indicateurs de ces propriétés. Les tests bactériens étant plus rapides et moins coûteux que les tests sur des animaux, ils se prêtent bien à des études préliminaires en ce sens. Il faudra toujours confirmer par des études comparatives la diminution de la mutagénécité dans un modèle animal.

### 5.3 ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE DES PRODUITS SÉLECTIONNÉS

Nous avons étudié les propriétés antioxydantes de 56 produits différents au cours de nos travaux. Nos résultats montrent que 14 d'entre eux possèdent des propriétés antioxydantes fortes et 12 autres de force moyenne. Mais il n'est pas étonnant de trouver autant de produits possédant des activités antioxydantes importantes car nous les avons sélectionnés pour ces propriétés au cours de nos lectures, ou pour d'autres propriétés biologiques bénéfiques pour les cellules en voie de cancérisation.

Des 56 produits sélectionnés et étudiés pour leurs propriétés antioxydantes, 21 étaient des molécules purifiées d'origine commerciale. Le travail avec des molécules purifiées nous permet de comparer leurs propriétés à l'intérieur d'une même famille de composés chimiques. Ainsi, nos résultats semblent montrer que les catéchols possèdent des activités antioxydantes fortes. L'hydroquinone et le catéchol, deux

produits de cette famille des catéchols, manifestent tous deux une activité antioxydante puissante. L'un d'eux est hydrosoluble, l'hydroquinone, tandis que le catéchol est liposoluble. Ceci suggère que la solubilité de différentes molécules semblables influence peu l'activité antioxydante de celle-ci.

Le BHA et le BHT, deux additifs alimentaires synthétiques très utilisés en alimentation parce qu'ils sont des antioxydants. Même s'ils sont chimiquement semblables, on observe qu'ils sont légèrement différents pour leur activité antioxydante.

Les thiols (aminothiol et thiol) que nous avons étudiés semblent tous posséder des propriétés oxydantes et font également partie de la même famille chimique. DE Flora et al. 1991, rapportaient que les thiols comme le glutathion, le N-acétylcystéine et le dithiothreitol possédaient des activités de prévention du cancer, notamment en diminuant les dommages à l'ADN causé par les rayons-X ou le 2-acétylaminofluorène. Une molécule peut aussi contribuer à la prévention du cancer par des propriétés autres qu'antioxydantes. Ceci suggère premièrement que les propriétés antioxydantes ne sont qu'un mécanisme parmi d'autres qui permettraient de prévenir la cancérisation et, deuxièmement,

que le mécanisme par lequel les thiols agiraient pour diminuer les dommages à l'ADN, pourrait être autre que l'antioxydation.

La rutine, un glucoside, et le morin, un flavonoïde, sont également des antioxydants forts. Laughton et al. 1991, ont obtenu des résultats similaires aux nôtres pour ces deux produits. Leurs résultats montrent que ces deux produits sont des antioxydants puissants, ce que nos résultats confirment. Dans leurs expériences, le gossypol se présentait comme un antioxydant fort, alors qu'il exprime une activité antioxydante moyenne à 78.3  $\mu\text{g/ml}$  dans nos conditions de travail. Il est possible que sa coloration rouge relativement forte à 313  $\mu\text{g/ml}$  ait interféré au cours des lectures spectrophotométriques. Ainsi, nous ne pouvons pas nous prononcer fermement sur l'activité antioxydante de ce produit.

Malgré les indices qui suggèrent que nos résultats semblent aller dans le sens de ceux déjà publiés par d'autres chercheurs, il conviendrait de confirmer ces résultats par d'autres techniques de mesure d'activité antioxydante. Des études comparatives entre la microtechnique que nous avons développée et d'autres techniques déjà bien établies permettraient de valider davantage nos résultats et de donner une meilleure assise à cette microtechnique nouvelle.

Les résultats que nous avons obtenus montrent qu'aucun des 12 produits commerciaux thérapeutiques étudiés ne semble posséder de propriétés antioxydantes fortes. Cependant, comme leur activité antioxydante semble supérieure lorsqu'ils sont mis en solution dans l'éthanol plutôt que dans l'eau distillée dans 92% des cas (11 produits sur 12), on peut penser que ce sont des molécules lipophiles présentes dans ces composés qui possèdent des propriétés antioxydantes. Ainsi, les prochaines expériences devront utiliser l'éthanol pour solubiliser ces produits, sauf dans le cas du fluxarola qui donne un meilleur résultat d'activité antioxydante en solution aqueuse.

Dans l'organisme les produits sont pour la plupart digérés avant d'être absorbés. La solubilité des produits étudiés dans un solvant ou un autre n'est pas primordiale dans un contexte biologique *in vivo*. Cette préoccupation n'est importante que pour les étudier *in vitro*. De plus, le fait qu'un produit ne possède pas de propriétés antioxydantes, ne l'empêche aucunement de posséder d'autres propriétés biologiques importantes pour aider les différents systèmes d'un organisme ou d'une cellule.

Nous avons étudié 21 épices que nous avons extraites par infusion dans l'eau ou dans l'éthanol, de quatre façons chacune, pour un total 79 extractions. Les résultats obtenus semblent indiquer que les extractions aqueuses donnent de

meilleurs résultats de mesure puisque 16 épices sur 21 (76%) possèdent une activité antioxydante plus forte par rapport aux extractions éthyliques.

Les mesures d'activité dans les extractions aqueuses de courte durée donnent de meilleurs résultats d'activité antioxydante 11 fois sur 13 (85% des cas). En effet, des 16 extractions aqueuses d'une période d'une heure, trois présentaient une forte activité antioxydante, quatre une activité moyenne et neuf étaient neutres. En comparaison, des 18 extraits aqueux de 24 heures, un était fortement antioxydant, deux de force moyenne et 15 étaient neutres. Ces résultats suggèrent que, d'une façon générale, les extractions aqueuses de courte durée sont préférables pour recueillir et conserver les propriétés antioxydantes des micronutriments contenus dans les épices. Les extraits aqueux infusés pour une plus longue période, perdent leurs propriétés antioxydantes, peut-être par détérioration chimique ou par oxydation à long terme. Si ceci se confirme, il serait préférable, en alimentation, d'ajouter les épices à la fin de la cuisson, autant pour maintenir leurs saveurs que pour conserver leurs propriétés biologiques.

Nous avons procédé à des extractions aqueuses et éthyliques dans le but de récupérer plus de micronutriments possédant des propriétés biologiques antioxydantes et autres.

Les extractions par infusion ont été faites dans le but de simplifier au maximum la sélection des meilleures épices pour l'étude de leurs propriétés biologiques. Il semble donc qu'il serait plus avantageux de purifier spécifiquement les micronutriments actifs contenus dans les différents extraits à partir d'infusions. Il serait à vérifier si les extractions éthyliques à chaud donnent de meilleurs rendement qu'à 20 °C.

Les concentrations que nous avons utilisées pour étudier l'activité antioxydante des différents extraits d'épices étaient environ 20 fois plus grandes que celles des contrôles positifs, vitamine C et vitamine E qui étaient purifiés. Les concentrations plus grandes se justifieraient parce que les filtrats d'épices recueillis sont des extraits bruts sans aucune purification, alors que nos contrôles positifs étaient purifiés. Une fois purifié, les micronutriments qui possèdent des propriétés antioxydantes présents dans ces extraits pourraient vraisemblablement être égales ou supérieures aux contrôles positifs sur la base de concentrations identiques. Nous n'avons fait qu'une première sélection des épices. Il convient de pousser plus loin l'étude et les purifications dans le futur.

#### 5.4 ÉTUDE DE LA MUTAGÉNÉCITÉ DES PRODUITS SÉLECTIONNÉS

Nous avons utilisé le test Umu pour étudier la mutagénéicité per se et la mutagénéicité des métabolites

hépatiques des 56 produits sélectionnés. Les résultats obtenus montrent que 95% (53/56) de ces produits ne sont pas mutagène, ni per se, ni par l'intermédiaire de leurs métabolites hépatiques. Cela suggère que de façon générale les micronutriments que nous avons étudiés ne causeront pas de mutations aux gènes des cellules d'un organisme qui les ingérerait même une fois métabolisés par les cytochromes P-450 du foie. Ces produits ne seraient donc pas susceptibles de causer le cancer. Seuls trois produits étudiés dans ce test sembleraient posséder des propriétés mutagéniques sur les 56 produits étudiés; ce sont le BHA, le morin et l'extrait éthylique de sauge. Le BHA est un additif alimentaire synthétique. Nakamura et al., 1991, et Hirose et al., 1991, rapportent que le BHA favorise la carcinogénèse des cellules gastro-intestinales et de la vessie, alors qu'il inhibe celle du foie et du sein. Les résultats positifs que nous avons obtenus dans les études de mutagénéicité per se et des métabolites hépatiques se voient donc confirmés par la littérature. Il faut mentionner que nos concentrations étaient grandes. Il se pourrait que pour des concentrations plus près de la physiologie et de la consommation normale donnent des résultats différents. En effet, la consommation moyenne de BHT et de BHA est d'environ 10 ppm / jour. Il serait bon de reconfirmer ces résultats en les répétant et également en utilisant d'autres méthodes pour évaluer cet effet potentiellement nocif du BHA. Si ce produit est réellement

mutagène, il devrait être simplement retiré du marché à cause de sa grande utilisation dans la bioalimentation comme préservatif. On ignore si l'augmentation foudroyante de plusieurs cancers, seins, tube digestif, ovaires, prostate, vessie, etc., au cours des dernières décennies ne sont pas redevables à ce genre de produits synthétiques. Le morin et la sauge paraissent posséder une activité mutagénique dans nos conditions expérimentales. Le morin est un flavonoïde naturel retrouvé dans les écorces de certains arbres.

L'utilisation du quercétin comme contrôle mutagène positif a déjà été rapportés par Oda et al., 1985. Le quercétin est un flavonoïde naturel. Évidemment il nous faudrait confirmer le résultat de mutagénéité du morin. Nous ignorons si les flavonoïdes possèdent plus de propriétés mutagènes que d'autres groupes de substances. Il faudra étudier un plus grand nombre d'échantillons de différents flavonoïdes pour vérifier si cet effet est inhérent au morin ou causé par l'apport de pesticides ou d'herbicide au cours de la culture.

On s'explique mal la génotoxicité de ces produits d'origine naturelle. Plus de recherches seraient nécessaires pour confirmer ces résultats. Il faudra sûrement éliminer la possibilité que les pesticides et/ou les herbicides soient responsables de cet effet indésirable.

Les concentrations utilisées lors des expérimentations semblent suffisamment élevées par rapport à celles nécessaires pour détecter un produit mutagène. À titre d'exemple, différents composés déjà étudiés pour leurs activités mutagéniques à l'aide du test Umu comme la mitomycin C (OHTA et al., 1984), le 2-nitrofluorène (OHTA et al., 1984), le quercétin (OHTA et al., 1984), l'aflatoxine B<sub>1</sub> (ODA et al., 1985), la bléomicine (ODA et al., 1985) et bien d'autres, sont mutagènes à des concentrations souvent inférieures à 200 µg/ml. Or, nous avons utilisé, lors de nos expérimentations sur la mutagénicité, des concentrations allant jusqu'à 313 µg/ml pour les produits commerciaux purifiés et thérapeutiques et des concentrations allant jusqu'à 3360 µg/ml pour les extraits bruts d'épices. Alors, si les résultats de mutagénicité des produits étudiés sont négatifs à de telles concentrations, on peut penser qu'ils ne sont vraisemblablement pas mutagènes. Il existe tout de même des produits qui sont mutagènes seulement à des concentrations plus élevées comme le dichromate de potassium que nous avons utilisé comme contrôle mutagène et comme l'un des mutagènes à inhiber dans nos études sur l'antimutagénicité. Il n'est donc pas impossible qu'un des produits étudiés soit mutagène à des concentrations plus élevées et qu'ils ne semblent pas l'être aux concentrations que nous avons utilisées.

### 5.5 ÉTUDE DE L'ANTIMUTAGÉNÉCITÉ DES PRODUITS SÉLECTIONNÉS

Nous avons utilisé une variation technologique du test Umu pour étudier l'activité antimutagène per se et des métabolites hépatiques des 56 produits sélectionnés. La moitié de ces produits (50%) inhibent de 35% et plus la mutagénéicité de produits mutagènes.

Le test Umu est un outil très utilisé pour l'étude des propriétés antimutagènes de différents produits. Wong et al., 1993, ont réalisé des expériences similaires aux nôtre, en se servant du test de Ames pour mesurer la diminution de la génotoxicité du benzo[a]pyrène (B[a]P) par l'ajout d'extraits de plantes médicinales chinoises. Leurs résultats montrent aussi une certaine diminution de l'effet génotoxique du B[a]P par l'action de leurs extraits de plantes. Le B[a]P est mutagène par l'intermédiaire de ses métabolites hépatiques. Il a donc besoin de la fraction S9, qui contient le cytochrome P-450IA-1, pour exprimer son effet mutagène. Les résultats de leurs recherches montrent que leurs extraits de plantes médicinales se liaient aux enzymes de la fraction S9. Ils ont ainsi attribué l'effet de diminution de la mutagénéicité du B[a]P à l'effet chélateur de la fraction S9 par les extraits.

Nos résultats indiquent clairement que 18 (32%) des 56 produits étudiés inhibent de 35% et plus la mutagénéicité per se et des métabolites hépatiques une fois transformés par le

cytochrome P-450. Ainsi, nos résultats suggèrent que la chélation des enzymes de la fraction S9, comme l'ont observé Wong et al. 1993, ne semble pas avoir joué avec nos produits. Nous avons observé une diminution de la mutagénéicité sans l'utilisation des enzymes hépatiques de la fraction S9. Ceci renforce la validité de notre test d'inhibition de la mutagénéicité tout en permettant d'éliminer l'effet de chélation de Wong et al., 1993.

La majorité des produits que nous avons étudiés soit 45/56 ou 80% ont un effet d'inhibition de la mutagénéicité une fois métabolisés par les enzymes cytochromes P-450 sur la mutagénéicité du quercetin, même si cet effet est faible dans certains cas. Des études plus poussées permettraient de réellement élucider ce phénomène de chélation. Il conviendrait par exemple d'analyser plus en détail l'interaction possible entre les produits que nous avons étudiés et le cytochrome P-450 comme l'ont fait Wong et al. 1993, pour leurs extraits de plantes médicinales. Ou encore vérifier si l'effet antimutagénique des produits est réalisable dans un modèle animal.

## 5.6 DISCUSSION SUR L'ENSEMBLE DES RÉSULTATS OBTENUS

Différentes molécules ou parties de molécules de micronutriments, plantes ou épices possèdent effectivement des propriétés antioxydantes et antimutagéniques. Nos résultats

suggèrent que les meilleurs antioxydants ne sont pas obligatoirement les produits qui inhibent le plus la mutagénéicité des produits mutagènes. Par exemple, la vitamine C qui se comporte comme un antioxydant fort, a peu d'action sur la mutagénéicité. Par contre, le chlorure de cadmium qui s'est montré plutôt oxydant dans nos études, inhibe de plus de 75% l'activité mutagénique du dichromate de potassium et du quercetin. Ceci renforce l'idée que les propriétés antioxydantes et les propriétés antimutagènes d'un même produit ne se situent pas nécessairement sur le même site de la molécule. Nos résultats suggèrent également que le mécanisme d'action d'une substance mutagène comme le dichromate de potassium ou le quercetin ne passe pas non plus nécessairement par l'oxydation du bagage génétique de la cellule ou du moins pas entièrement.

Nos résultats suggèrent aussi qu'une même molécule agirait à différents niveaux du métabolisme cellulaire pour l'aider à lutter contre la cancérisation. Ainsi, un produit pourrait diminuer l'hyperoxydation cellulaire, alors qu'un autre agirait sur l'inhibition de l'effet toxique d'un agent agressant pour la cellule. Il se pourrait aussi qu'une partie d'une molécule agisse comme antioxydant et qu'une autre partie de cette même molécule inhibe la mutagénéicité, comme le suggèrent les résultats de nos expériences effectuées avec des molécules purifiées. Cette façon de penser expliquerait que des molécules

comme la rutine, le catéchol et l'épicatéchine qui possèdent des propriétés antioxydantes fortes soient aussi capables de diminuer la mutagénéicité par eux-mêmes aussi bien que par l'action de leurs métabolites. Si l'on considère qu'un produit oxydant comme le glutathion peut également diminuer la mutagénéicité, on peut penser que ce n'est effectivement pas la même partie de la molécule qui est responsable de l'activité oxydante et de l'antimutagénéicité. Du moins avec les connaissances que nous avons aujourd'hui sur les effets encore non étudiés des propriétés biologiques sur le maintien de l'homéostasie cellulaire et organique.

Les extraits d'épices que nous avons étudiés pour leurs propriétés biologiques étaient des filtrats qui contenaient une foule de micronutriments. Il nous est impossible, dans le cadre de nos études, d'attribuer à l'un ou à l'autre de ces micronutriments les propriétés antioxydantes ou antimutagéniques sans les purifier. Il serait donc fort possible que des molécules différentes soient responsables de l'activité antioxydante de l'origano doux, par exemple, et de ses propriétés antimutagéniques. Pour le savoir, il faudrait purifier les différentes fractions de cet extrait. Nos objectifs ne visaient pas à purifier ces molécules, mais plutôt à sélectionner les épices qui possèdent certaines de ces propriétés biologiques pour les étudier plus spécifiquement ultérieurement.

En résumé, tout notre travail a porté sur le développement de méthodologies qui nous ont permis d'étudier certaines propriétés biologiques des micronutriments. Les résultats obtenus renforcent les hypothèses que plusieurs micronutriments possèdent effectivement des propriétés biologiques favorables et même réparatrices pour les cellules en voie de cancérisation. Les recherches scientifiques confirment de plus en plus que nous sommes ce que nous mangeons et que notre alimentation et notre mode de vie jouent un rôle important dans l'éclosion des maladies. L'augmentation de plusieurs types de cancers n'est peut-être pas étrangère à notre alimentation. Alors mangeons mieux et nous vivrons mieux.

## 6 CONCLUSION

Notre travail nous a permis d'identifier les meilleurs micronutriments alimentaires possédant des propriétés antioxydantes et antimutagènes, sans provoquer de génotoxicité. Nos résultats montrent que 14% des 56 produits étudiés pour les propriétés biologiques que nous avons analysés se sont avérés posséder toutes ces qualités. Ils sont en effet, à la fois fortement antioxydants, sans mutagénéicité et capable de diminuer la mutagénéicité tant en soi qu'une fois métabolisés par le cytochrome P-450.

Au cours de ce travail, nous avons développé deux technologies de dépistage nouvelles, soit; 1) une microtechnique de dépistage des propriétés antioxydantes en plaques de 96 puits. Cette microtechnique permet de déterminer rapidement si un produit possède des propriétés antioxydante forte, moyenne, ou s'il est neutre (ni antioxydant, ni oxydant). Elle permet également de déterminer si un produit est oxydant. 2) Une modification du test Umu qui permet non seulement d'étudier a) les propriétés mutagènes en soi des différents composés, ou encore b) la mutagénéicité de leurs métabolites une fois métabolisés par les enzymes hépatiques comme le cytochrome P-450, mais également c) d'avoir une idée de leurs propriétés inhibitrices sur des mutagènes connues.

### 6.1 MICROTECHNIQUE DE MESURE DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE

Nous avons développé une microtechnique de mesure de l'activité antioxydante qui s'applique à l'étude de différents produits hydrosolubles et liposolubles. Cette microtechnique permet à un seul technicien d'étudier rapidement l'activité antioxydante de plus de 25 produits par jour, chacun à 4 concentrations et en triplicata. La technique offre l'avantage d'étudier plusieurs produits simultanément et de comparer leurs résultats aux contrôles positifs et négatifs présents dans la même microplaque de 96 puits. La sélection des produits possédant des propriétés antioxydantes est accélérée par cette microtechnique. Les résultats sont facilement comparables à des contrôles positifs microgrammes par microgrammes; c'est-à-dire en équivalant de vitamine C ou de vitamine E utilisés comme contrôles positifs hydrosolubles et liposolubles respectivement. Les résultats d'activité antioxydante sont facilement mesurables par spectrophotométrie et même visuellement (voir figure 1) en permettant l'évaluation de tous les paramètres techniques par simple estimation visuelle des résultats d'une plaque. La technique permet également de savoir rapidement si un produit possède des propriétés antioxydantes, oxydantes ou neutres.

L'expression des résultats par superposition des courbes d'activité antioxydante nous permet de voir la tendance de l'activité antioxydante d'un produit par rapport à celle d'un

contrôle positif en tenant compte des dilutions et directement sur une même plaque.

La formule de transformation mathématique des D.O. en pourcentage d'activité antioxydante permet d'éliminer une grande partie des variations journalières, parce qu'elle tient compte des valeurs des contrôles positifs et négatifs et des variations des contrôles négatifs à l'intérieur d'une même plaque.

La force antioxydante d'une substance est rapidement obtenue en rapportant son activité antioxydante en pourcentage pour une concentration donnée, sur un étalon de détermination de la force antioxydante (figure 2).

## **6.2 ÉTUDE DE LA MUTAGÉNÉCITÉ ET DE L'ANTIMUTAGÉNÉCITÉ**

Le test Umu se compare avantageusement au test de Ames au niveau de sa sensibilité dans la détection des substances mutagènes (McDANIELS et al., 1990). Par contre, le test Umu est beaucoup plus rapide et moins dispendieux que le test de Ames. Nous avons donc utilisé le test Umu pour étudier les propriétés mutagéniques de différents produits, car il rencontrait nos objectifs de sélection simple, rapide et sensible des produits mutagènes.

Nous avons utilisé une variation technologique du test Umu pour mesurer l'antimutagénécité des produits par inhibition de la mutagénécité de substances mutagènes connues. Cette technique donne une idée de l'antimutagénécité d'une substance et nécessite confirmation sur des modèles animaux. Les études sur des animaux de laboratoire étant longues et coûteuses, une corrélation de ce type de techniques utilisant des bactéries avec les résultats sur des animaux avantagerait les techniques bactériennes d'antimutagénécité qui sont beaucoup plus simples et moins coûteuses. Pour en arriver là, des études de recherches supplémentaires sont absolument nécessaires.

### 6.3 SYNTHÈSE DES RÉSULTATS OBTENUS SUR LES PRODUITS ÉTUDIÉS

Nos résultats semblent indiquer que ce ne sont pas nécessairement les produits possédant des propriétés antioxydantes fortes, qui inhibent le plus la mutagénécité.

Il semble également que les sites moléculaires responsables de l'activité antioxydante soient différents de ceux possédant des propriétés antimutagènes pour une même molécule purifiée. De plus, l'activité mutagénique du dichromate de potassium et du quercetin ne semble pas s'exercer à travers un mécanisme d'oxydation du bagage génétique cellulaire parce que certains composés oxydant sont capables d'inhiber leurs mutagénécités et que tous les produits qui

possèdent des propriétés antioxydantes n'ont pas nécessairement d'effets inhibitrices sur leurs mutagénéités.

Les extractions aqueuses d'épices par infusion de courte durée (une heure) semblent, de façon générale, être supérieures que celles de longue durée (24 heures), pour récupérer et prévenir les propriétés antioxydantes des composés que nous avons étudiés.

Nos résultats suggèrent que les propriétés antioxydantes et antimutagènes appartiennent soit à différentes parties d'une même molécule, soit à des molécules différentes dans les mélanges complexes comme les extraits d'épices. Il semble donc y avoir des effets synergiques entre les différents composés d'un micronutriments complexe où certaines molécules diminuent les dommages cellulaires par ses propriétés antioxydantes et d'autres inhibent la mutagénéité.

### **6.3.1 Produits possédant des propriétés antioxydantes, sans toutefois être mutagènes.**

Selon les résultats que nous avons obtenus au cours de nos expériences la vitamine C, l'hydroquinone, la rutine, la vitamine E, le catéchol, l'épicatéchine, le phénidone, le gossypol, l'origano doux, l'origano fort, le romarin et la menthe possèdent tous des propriétés antioxydantes fortes. De tels produits seraient susceptibles, par l'intermédiaire de ces

propriétés antioxydantes, de diminuer les dommages oxydatifs de cellules et d'inhiber ainsi leur vieillissement prématuré en leur permettant de stabiliser leur métabolisme; cela pourrait vraisemblablement diminuer ou ralentir leurs risques de cancérisation.

### **6.3.2 Produits possédant des propriétés antimutagènes, et qui ne sont pas mutagènes**

La rutine, le cadmium, le glutathion, la vitamine E, le catéchol, l'épicatéchine, le morin, le gossypol, l'ajmalicine, l'indole-3-acétonitryl, l'origano doux, l'origano fort, la menthe, les bioflavonoïdes de citron, le chaparral, le pycnogenol, la spirulina, le lapacho et le trèfle rouge sont autant de produits qui, dans nos expériences, diminuent la mutagénéicité de composés mutagènes. Ils exercent cette action antimutagène à la fois par eux-mêmes et par l'action de leurs métabolites hépatiques. Des produits possédant de telles propriétés seraient possiblement aptes à protéger un organisme biologique contre des agents mutagènes ou cancérigènes en diminuant les effets toxiques que ces derniers ont sur les cellules des organismes vivants. Les produits sélectionnés seraient possiblement actifs par eux-mêmes dans l'organisme et le demeureraient même une fois digérés par les cytochromes P-450 du foie. Ceci étendrait leur action bénéfique à l'ensemble de l'organisme de même que leur temps d'action.

On peut retrouver la rutine en assez grande quantité, soit environ 3% en poids sec, dans le sarrasin. Tandis que, le morin peut être récupéré, entre autre, de l'écorce de certains arbres d'Amérique du Sud. On peut également extraire l'ajmalicine des racines de la Rauvolfia serpentina.

### 6.3.3 Produits possédant à la fois des propriétés antioxydantes et antimutagènes, sans toutefois être mutagènes

La rutine, la vitamine E, le catéchol, l'épicatéchine, le gossypol, l'origano doux, l'origano fort et la menthe possèdent des propriétés biologiques bénéfiques à plusieurs niveaux. Ils possèdent, selon nos données, des propriétés antioxydantes et des propriétés antimutagènes et ne sont pas mutagène. Ainsi, il est vraisemblable que ces produits soient capables de protéger les cellules autant contre les dommages oxydatifs que contre des composés mutagènes ou cancérigènes. Ce sont certainement les produits les plus intéressants à réétudier plus attentivement pour confirmer les propriétés biologiques que nous avons observées. Il faudrait vérifier quels sont leurs impacts dans d'autres modèles d'études comme sur des cellules cancéreuses in vitro et in vivo.

### 6.4 SYNERGIE DES DIFFÉRENTES PROPRIÉTÉS

En plus de sélectionner et d'étudier des produits pour leurs propriétés antioxydants, non-mutagènes et antimutagènes, nous avons prévu étudier ces propriétés en synergies, en les

mélangeant ensemble: antioxydant-antioxydant, antioxydant-antimutagène, produit thérapeutique-épices, produit commercial-épices, etc... Malheureusement, nous n'avons pas été en mesure de nous acquitter de cette tâche. Les études de synergie restent un champ à exploiter dans l'avenir.

Nous avons tout de même obtenu quelques indices qui nous permettent de penser qu'il existe une certaine synergie entre différentes parties d'une même molécule et entre différentes molécules d'un mélange complexe comme les extraits d'épices. Cela est suggéré parce que les propriétés antioxydantes et antimutagéniques semblent être présentes sur différents sites d'une même molécule purifiée, qu'il semble très probable que ce ne soit pas la ou les-mêmes molécules d'un mélange complexe qui possèdent ces propriétés; alors il est fort possible que ces propriétés interviennent simultanément, produisant ainsi une certaine synergie.

## 6.5 AVENIR

Peut-être qu'un jour il nous sera possible de préparer des plats, des recettes ou des suppléments alimentaires enrichis en composés antioxydants, antimutagènes, immunostimulants, cytotoxiques pour les cellules cancéreuses, capables de potentialiser les systèmes de réparation cellulaire ou inhibiteurs du développement des métastases. De tels mélanges de micronutriments pourraient être utilisés soit dans la

prévention du cancer chez les personnes génétiquement à risque, soit en traitement chez celles qui ont déjà développé un cancer. Et pourquoi pas.

Plusieurs des produits que nous avons sélectionnés et étudiés ont déjà été prescrits pour prévenir ou traiter le cancer. Mais, jusqu'ici, peu d'études ont été réalisées pour confirmer scientifiquement ceux qui seraient les plus utiles dans ce domaine d'avenir.

L'étude que nous avons réalisée ici représente un premier pas dans cette direction. Elle ne concerne que cinq propriétés biologiques étudiées. Il va falloir étendre l'étude des propriétés biologiques à celles qui sont stabilisatrices de l'ADN des cellules cancéreuses, stimulantes du système immunitaire, capables d'agir au niveau des enzymes sécrétées par les cellules cancéreuses et qui favorisent les métastases, etc. Voilà de l'ouvrage pour les chercheurs de demain.

## 7 REMERCIEMENTS

L'aboutissement d'un tel projet de recherche a été possible par la participation directe et indirecte de nombreux intéressés. Naturellement, il serait trop long de les nommer tous et je risquerais fort d'en oublier. Alors, je vous remercie tous profondément et je suis certain que vous vous reconnaissez.

Toutefois, je tiens à remercier tout particulièrement certaines personnes qui m'ont aidé, supporté et conseillé dans ce projet de maîtrise:

Mes directeurs, Monique Lacroix et Gilles Lamoureux, premièrement pour avoir crû en moi dès le début, pour m'avoir guidé dans l'accomplissement de ce projet et pour tout ce que j'ai pu apprendre sous leur tutelle. Connaissant leur profond dévouement à l'enseignement, je suis certain qu'ils auraient aimés m'en apprendre encore davantage. Sachez que ce que j'apprends, je mets toujours longtemps à l'oublier et donc que votre enseignement va me suivre pour une très grande partie de ma vie.

J'aimerais également remercier particulièrement Monique Lacroix pour l'aide financière qu'elle m'a accordée dans les moments plus difficiles.

Mes tantes en or, Danielle et Lylas, pour leur support moral quasiment héroïque et toutes leurs attentions à mon égard.

Mes parents, mon frère et ma soeur pour leur soutien moral et financier, mais surtout pour être ma famille.

Tout spécialement à mon amour, Isabelle, des remerciements tout aussi amoureux. Et que l'avenir nous sourit.

Que l'avenir vous sourit à tous.

Merci à tous!

**8 BIBLIOGRAPHIE**

- ALDRIDGE, W.N.. 1957. Liver and brain mitochondria. *Biochem. J.* 67: 423-31.
- APPEL, M.J., G. ROVERTS et R.A. WOUTERSEN. 1991. Inhibitory effects of micronutrients on pancreatic carcinogenesis in azaserine-treated rats. *Carcinogenesis* 12(11): 2157-2161.
- ARUOMA, O.I., P.J. EVANS, H. KAUR, L. SUTCLIFFE et HALLIWELL B.. 1990. An evaluation of the antioxidant and potential pro-oxidant properties of food additives and of trolox C, vitamin E and probucol. *Free Radical Research Communication.* 10(3): 143-57.
- ARUOMA, O.I., B. HALLIWELL et M. DIZDAROGLU. 1989. Iron ion-dependent modification of bases in DNA by the superoxide radical-generating system hypoxanthine/xanthine oxidase. *The Journal of Biological Chemistry* 264(22): 13024-28.
- BABA, M., H. IISHI, R. YAMAMOTO et M. TATSUTA. 1991. Inhibition by retinoic acid of hepatocarcinogenesis induced by N-nitrosomorpholine and of expression of myc oncogene protein in Sprague-Dawley rats. *International Journal of Cancer* 49(3): 467-470.
- BASHIR, A., M. HAMBURGER, M.P. GUPTA, P. SOLIZ et K. HOSTELLMANN. 1990. Antifungal biphenyls from *MONNINA SILVATICA* (POLYGALACEAE). *Proceedings of the International Meeting of Group Polyphenols* 15: 185.
- BATZRI, S. et KORN. E.D.. 1973. Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochimica et Biophysica Acta* 298: 1015-19.
- BELJANSKY, M.. 1979. Oncotest: a DNA assay system for the screening of carcinogenic substances. *IRCS Medical Science* 7: 476.
- BELJANSKI, M. et M.S. BELJANSKI. 1984. Three alcaloïdes as selective destroyers of the proliferative capacity of cancer cells. *IRCS Medical Science* 12: 587-588.
- BELJANSKY, M., M. PLAWECKI, P. BOURGAREL et M.S. BELJANSKY. 1980. Short chain RNA fragments as promoters of leukocyte and platelet genesis in animals depleted by anti-cancer drugs. *Proc. Sec. Int. Symposium on The Role of RNA in Development and Reproduction.* April 25-30: 79-113.

BRANDES, L.J., W.A. BEECROFT et G.R. HOGG. 1991. Stimulation of in vivo tumor growth and phorbol ester-induced inflammation by N,N-diethyl-2-(4-(phenylmethyl)phenoxy)ethanamine HCl, a potent ligand for intracellular histamine receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 179(3): 1297-1304.

CHAE, Y.H., S.L. COFFING, V.M. COOK, D.K. HO, J.M. CASSADY et W.M. BAIRD. 1991. Effects of biochanin A on metabolism, DNA binding and mutagenicity of benzo[a]pyrene in mammalian cell cultures. *Carcinogenesis* 12(11): 2001-2006.

CHANG, R.L., M.T. HANG, A.W. WOOD, C.Q. WONG, H.L. NEWMARK, H. YAGI, J.M. SAYER, D.M. JERINA et A.H. CONNEY. 1985. Effect of ellagic acid and hydroxylated flavonoids on the tumorigenicity of benzo[a]pyrene and ( $\pm$ )-7B,8 $\alpha$ -dihydroxy-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene on mouse skin and in the newborn mouse. *Carcinogenesis* 6(8): 1127-33.

CHEN, A.Y., C. YU, M. POTMESIL, M.E. WALL, M.C. WANI et L.F. LIU. 1991. Camptothecin overcomes MDR1-mediated resistance in human KB carcinoma cells. *Cancer Research* 51(22): 6039-6044.

CHEN, Q., H. SHI et C.-T. HO. 1992. Effects of rosemary extracts and major constituents on lipid oxidation and soybean lipoxygenase activity. *JAACS* 69(10): 999-1002.

COLACCHIO, T.A., V.A. MEMOLI et L. HILDEBRANDT. 1989. Antioxidants vs carotenoid. Inhibitors or promoters of experimental colorectal cancers. *Archives of Surgery* 124(2): 217-21.

CUNNINGHAM, M.L. et H.B. MATTHEWS. 1991. Relationship of hepatocarcinogenicity and hepatocellular proliferation induced by mutagenic noncarcinogens vs carcinogens .2. 1-nitropropane vs 2-nitropropane. *Toxicology and Applied Pharmacology* 110(3): 505-513.

DARMON, N., Y. FERNANDEZ, M.T. CANAL et S. MITJAVILA. 1990a. Activite antiradicalaire de flavonoides vis-à-vis de l'anion superoxyde et du radical hydroxyle. *Proceedings of the International Meeting of Group Polyphenols* 15: 158-61.

DARMON, N., Y. FERNANDEZ, C. CAMBOM-GROS et S. MITJAVILA. 1990b. Quantification of the scavenger capacity of different flavonoids with regard to the superoxide ion. Food Add. Contam. 7(SUPPLEMENT NO.1): S60-S63

DARNELL, J.E., H. LODISH et D. BALTIMORE. 1988. CANCER in La cellule: biologie moléculaire. ed. DECARIE (Montréal) : 1035-1080.

DE FLORA, S., A. IZZOTTI, F. D'AGOSTINI et C.F. CESARONE. 1991. Antioxidant activity and other mechanisms of thiols involved in chemoprevention of mutation and cancer. American Journal of Medicine 91(S3C): S122-S130.

DEBRAVO, M.G., R.J. DEANTUENO, J. TOLEDO, M.E. DETOMAS, O.F. MERCURI et C. QUINTANS. 1991. Effects of an eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid concentrate on a human lung carcinoma grown in nude mice. Lipids 26(11): 866-870.

DEIGHTON, N., S.M. GLIDEWELL, S.G. DEANS et B.A. GOODMAN. 1993. Identification by EPR spectroscopy of carvacrol and thymol as the major sources of free radicals in the oxidation of plant essential oils. J. Sci. Food Agric. 63: 221-225.

GROSS, L.. 15 October 1988. Inhibition of development of tumors or leukemia in mice and rats after reduction of food intake. Possible implications for humans. Cancer 62(8): 1463-5.

HALLIWELL, B., J.M.C. GUTTERIDGE et O.I. ARUOMA. 1987. The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. Analytical Biochemistry 165: 215-19.

HALLIWELL, B. et J.M.C. GUTTERIDGE. 1981. Formation of a thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts. FEBS Letters 128(2): 347-52.

HIROSE, M., K. OZAKI, K. TAKABA, S. FUKUSHIMA, T. SHIRAI et N. ITO. 1991. Modifying effects of the naturally occurring antioxidants gamma-oryzanol, phytic acid, tannic acid and normal-tritriacontane-16,18-dione in a rat wide-spectrum organ carcinogenesis model. Carcinogenesis 12(10): 1917-1921.

HUGHES, D.B. et D.G. HOOVER. 1991. Bifidobacteria: their potential for use in American dairy products. Food Technology April: 74-83.

IP, C., S.F. CHIN, J.A. SCIMECA et M.W. PARIZA. 1991. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Research* 51(22): 6118-6124.

KNEKT, P., R. JARVINEN, R. SEPPANEN, A. RISSANEN, A. AROMAA, O.P. HEINONEN, D. ALBANES, M. HEINONEN, E. PUKKALA et L. TEPPPO. 1991. Dietary antioxidants and the risk of lung cancer. *American Journal of Epidemiology* 134(5): 471-9.

LACROIX, M.L., B. LATREILLE, M.R. VAN CALSTEREN, M. JOBIN et M. GAGNON. 1990. Effet de l'irradiation sur le contenu en composés phénoliques en relation avec le développement de la couleur et de l'activité antimicrobienne durant le mûrissement des mangues. *Proceedings of International Meeting of Group Polyphenols* 14: 171-74.

LACROIX, M.. 1986. Détoxification et amélioration de la qualité nutritionnelle de la protéine de colza, par des traitements chimiques enzymatiques et de fermentation. Thèse de doctorat. Université Laval (Québec) : 13-20.

LAUGHTON, M.J., P.J. EVANS, M.A. MORONEY, J.R.S. HOULT et B. HALLIWELL. 1991. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives - relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochemical Pharmacology* 42(9): 1673-1681.

LAUGHTON, M.J., B. HALLIWELL, EVANS P.J. et J.R.S. HOULT. 1989. Antioxidant and pro-oxidant actions of the plants phenolics quercetin, gossypol and myricetin. *Biochemical Pharmacology* 38(17): 2859-65.

LE GOFF, L. et M. BELJANSKI. 1982. Agonist and/or antagonist effects of plant hormones and an anticancer alcaloïde on plant DNA structure and activity. *IRCS Medical Science* 10: 689-690.

LECOMTE J.. 1991. Recherche au coeur de la cellule. Cancer et sida, la victoire? *COBRA sept.*: 1-13.

LIGHT, H.C., J.J. HUBERT, P.D. JOSEPHY, S.S. MATTANO et W.W. WEBER. 1987. Benzidine activation in the Ames test: roles of hepatic N-acetyltransferase and other cytosolic and microsomal factors. *Carcinogenesis* 8(1): 139-43.

LOK, E., EA. NERA, F. IVERSON, F. SCOTT, Y. SO et D.B. CLAYSON. 1988. Dietary restriction, cell proliferation and carcinogenesis: a preliminary study. *Cancer Letters* 38(3): 249-55.

LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR et R.L. RANDALL. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* 193: 265-75.

MARON, D.M. et B.N. AMES. 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research* 113: 173-215.

MASQUELIER, M.S., S. MICHAUD, G. LAPARRA et M.C. DUMON. 1979. PYCNOGENOLS. Un nouvel essor thérapeutique des dérivés catéchiques. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux* 118: 95-108.

MCDANIELS, A.E., A.L. REYES, L.J. WYMER, C.C. RANKIN et G.N.J. STELMA. 1990. Comparison of the Salmonella (Ames) test, Umu tests, and the SOS Chromotests for detecting genotoxins. *Environmental & Molecular Mutagenesis* 16(3): 204-15.

MILLER, J.H.. 1972. Experiments in molecular genetics in Cold Spring Harbor Laboratory. ed. Cold Spring Harbor (NY)

MITJAVILA, S., N. DARMON, M.H. SEGUELAS, FERNANDEZ et A. PERIQUET. 1990. Importance relative de la capacité chelante et de l'activité antiradicalaire de flavonoïdes dans l'inhibition de la peroxydation membranaire. *Proceedings of the International Meeting of Group Polyphenols* 14: 189.

MORENO, F.S., M.B.S.L. RIZZI, M.L.Z. DAGLI et M.V.C. PENTEADO. 1991. Inhibitory effects of beta-carotene on preneoplastic lesions induced in Wistar rats by the resistant hepatocyte model. *Carcinogenesis* 12(10): 1817-1822.

NARISAWA, T., M. TAKAHASHI, H. KOTANAGI, H. KUSAKA, Y. YAMAZAKI, H. KOYAMA, Y. FUKAURA, Y. NISHIZAWA, M. KOTSUGAI, Y. ISODA, J. HIRANO et N. TANIDA. 1991. Inhibitory effect of dietary perilla oil rich in the n-3 polyunsaturated fatty acid  $\alpha$ -linolenic acid on colon carcinogenesis in rats. *Japanese Journal of Cancer Research* 82(10): 1089-1096.

ODA, Y., S.I. NAKAMURA, I. OKI, T. KATO et H. SHINAGAWA. 1985. Evaluation of the system (Umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutation Research* 147: 219-29.

OHTA, T., N. NAKAMURA, M. MORIYA, Y. SHIRASU et T. KADA. 1984. The SOS-function-inducing activity of chemical mutagens in *Escherichia coli*. *Mutation Research* 131: 101-109.

OTAKE, S., M. MAKIMURA, T. KUROKI, Y. NISHIHARA et M. HIRASAWA. 1991. Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. *Caries Research* 25(6): 438-443.

QUINLAN, G.J., B. HALLIWELL, C.P. MOORHOUSE et J.M.C. GUTTERIDGE. 1988. Action of lead(II) and aluminium(III) ions on iron-stimulated lipid peroxidation in liposomes, erythrocytes and rat liver microsomal fractions. *Biochimica and Biophysica Acta*. 962: 196-200.

RUSTING, R.. 1993. Les causes du vieillissement. Pour la science 184: 54-62.

SAHU, S.C. et M.C. WASHINGTON. 1991. Effects of antioxidants on quercetin-induced nuclear DNA damage and lipid peroxidation. *Cancer Letters* 60(3): 259-264.

SCHULLER, H.M.. 1991. The signal transduction model of carcinogenesis. *Biochemical Pharmacology* 42(8): 1511-1523.

SINGLETERY, K.W. et J.M. NELSHOPPEN. 1991a. Inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene(DMBA)-induced mammary tumorigenesis and of in vivo formation of mammary DMBA-DNA adducts by rosemary extract. *Cancer Letters* 60(2): 169-175.

SINGLETERY, K.W. et J.M. NELSHOPPEN. 1991b. Selective in vivo inhibition of rat mammary 7,12-dimethylbenz[a]anthracene DNA adduct formation by dietary butylated hydroxytoluene. *Carcinogenesis* 12(10): 1967-1969.

SINHA, D.K., R.L. GEBHARD et J.E. PAZIK. 1988. Inhibition of mammary carcinogenesis in rats by dietary restriction. *Cancer Letters* 40(2): 133-41.

STAHELIN, H.B., K.F. GEY, M. EICHHOLZER, E. LUDIN, F. BERNASCONI, J. THURNEYSEN et G. BRUBACHER. 1991. Plasma antioxidant vitamins and subsequent cancer mortality in the 12-year follow-up of the prospective Basel Study. *American Journal of Epidemiology* 133(8): 766-75.

STARVIC, B. et T.I. MATULA. 1988. Biological significance of flavonoids in foods: A Review of some recent issues and problems. Proceedings of the International Meeting of Group Polyphenols 14: 95-104.

SZMURLO, A., M. MARCZAK, L. RUDNICKA, S. MAJEWSKI, B. MAKIELA, A. SKIENDZIELEWSKA, M. SKOPINSKA, A. KORNHAUSER et S. JABLONSKA. 1991. Beta-carotene in prevention of cutaneous carcinogenesis. Acta Dermato-Venereologica 71(6): 528-530.

THOMPSON, H.J.. 1991. Effect of deficiencies of selenium and vitamin-E alone or in combination on the induction of mammary carcinogenesis by 1-methyl-1-nitrosourea. Carcinogenesis 12(11): 2175-2179.

TOYOTA, S.D., M. HAMBURGER, M. SORDAT et B. HOSTETTMANN. 1990. Nouvelles xanthones biologiquement actives de GARCINIA LIVINSTONEI (GUTTIFERAE). Proceedings of the International Meeting of Group Polyphenols 15: 175-78.

TRESKES, M., U. HOLWERDA, I. KLEIN, H.M. PINEDO et W.J.F. VANDERVIJGH. 1991. The chemical reactivity of the modulating agent WR2721 (Ethiofos) and its main metabolites with the antitumor agents cisplatin and carboplatin. Biochemical Pharmacology 42(11): 2125-2130.

TRIZNA, Z., S.P. SCHANTZ et T.C. HSU. 1991. Effects of N-acetyl-L-cysteine and ascorbic acid on mutagen-induced chromosomal sensitivity in patients with head and neck cancers. American Journal of Surgery 162(4): 294-298.

TYRREL, D.A., T.D. HEATH, C.M. COLLEY et B.E. RYMAN. 1976. New aspects of liposomes. Biochimica et Biophysica Acta 457: 259-302.

VALANT-VETSCHERA, K.M. et E. WOLLENWEBER. 1990. Flavonoid aglycones with potential biological activity of the genus Achillea L. (compositae). Proceedings of the International Meeting of Group Polyphenols 15: 192.

WAALKES, M.P., B.A. DIWAN, C.M. WEGHORST, R.M. BARE, J.M. WARD et J.M. RICE. 1991. Anticarcinogenic effects of cadmium in B6C3F1 mouse liver and lung. Toxicology and Applied Pharmacology 110(2): 327-335.

WATTENBERG, L.W.. 1985. Chemoprevention of cancer. Cancer Res. 45: 1-8.

WHONG, W.Z., Y.F. WEN, J. STEWART et T.M. ONG. 1986. Validation of the SOS/Umu test with mutagenic complex mixtures. *Mutation Research* 175: 139-44.

WILBUR, K.M., F. BERNHEIM et O.W. SHAPIRO. 1949. The thiobarbituric acid reagent as a test for the oxidation of unsaturated fatty acids by various agents. *Arch. Biochem. Biophys.* 24(305-13)

WILLS, E.D.. 1969a. Lipid peroxide formation in microsomes. *Biochem. J.* 113: 315-24.

WILLS, E.D.. 1969b. Lipid peroxide formation in microsomes. The role of non-haem iron. *Biochem J.* 113: 325-32.

WILLS, E.D.. 1969c. Lipid peroxide formation in microsomes. Relationship of hydroxylation to lipid peroxide formation. *Biochem. J.* 113: 333-41.

WILLS, E.D. et A.E. WILKINSON. 1967. The effect of irradiation on lipid peroxide formation in subcellular fractions. *Radiation Research* 31: 732-47.

WONG, B.Y.Y., B.H.S. LAU, T. YAMASAKI et R.W. TEEL. 1993. Modulation of cytochrome P-450IA1-mediated mutagenicity, DNA binding and metabolism of benzo[a]pyrene by Chinese medicinal herbs. *Cancer Letters* 68: 75-82.

YOSHIDA, T., H. OHBAYASHI, K. ISHIHARA, W. OHWASHI, K. HABA, Y. OKANO, T. SHINGU et T. OKUDA. 1991. Tannins and related polyphenols of melastomataceous plants .1. hydrolyzable tannins from *Tibouchina-Semidecandra* Cogn. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 39(9): 2233-2240.

ZHANG, J.R. et A. SEVANIAN. 1991. Effect of vitamin-E on arachidonic acid peroxidation and its binding to Chinese hamster V79 cell DNA. *Biochimica et Biophysica Acta* 1085(2): 159-166.

ZHANG, L.X., R.V. COONEY et J.S. BERTRAM. 1991. Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells - Relationship to their cancer chemopreventive action. *Carcinogenesis* 12(11): 2109-2114.

**ANNEXE A**

Vous trouverez ci-joint annexé à mon mémoire, une copie d'un article accepté pour publication, tiré du mémoire que vous avez entre les mains.

Il s'agit d'une revue de littérature qui traite des micronutriments alimentaires et de leurs rôles dans le contrôle naturel de la cancérisation cellulaire. Cet article sera publié dans le volume no. 13 de l'année en cours du journal Microbiologie-Aliments-Nutrition.

J'espère le tout à votre entière satisfaction et veuillez agréé monsieur, madame, mes salutations distinguées.

Stéphan Lessard

Étudiant à la maîtrise