

RESEARCH

Open Access



Le citral présent dans les huiles essentielles de myrte citronné, de citronnelle, de litsée et de mélisse supprime la croissance et l'invasion des cellules cancéreuses du sein.

Takuya Nagata^{1*}, Tadaaki Sato², Shinichiro Hayashi³, Prabodh Satyal⁴, Manabu Watanabe⁵, Brannick Riggs⁴ and Yoshihisa Saida¹

Résumé

Objectif : Bien que les traitements contre le cancer suppriment les récives et prolongent la vie, ils peuvent être accompagnés d'effets secondaires importants ; il existe donc une forte demande pour le développement de traitements efficaces avec moins d'effets secondaires. La thérapie anticancéreuse utilisant des huiles essentielles dérivées de plantes suscite l'attention comme une méthode prometteuse. Cette étude a examiné les effets antitumoraux des composés volatils des huiles essentielles sur les cellules cancéreuses du sein et a identifié quatre huiles essentielles présentant une activité antitumorale.

Méthodes : Des cellules cancéreuses du sein ont été cultivées dans une plaque de 96 puits, puis une des vingt huiles essentielles a été ajoutée goutte à goutte dans le puits central. La plaque a été incubée à 37 °C pendant 48 h et l'effet des composants volatils de chaque huile essentielle sur la capacité de croissance des cellules cancéreuses du sein environnantes a été examiné à l'aide d'un test MTT. La chromatographie en phase gazeuse a été utilisée pour étudier la concentration des composants volatils susceptibles d'affecter les cellules cancéreuses.

Résultats : Parmi les 20 huiles essentielles, la citronnelle, le myrte citronné, la litsée et la mélisse ont montré de forts effets antitumoraux. Ces huiles essentielles ont inhibé la croissance des cellules cancéreuses du sein environnantes, même lorsqu'elles étaient diluées à plus de 500 fois. Le composant volatil du myrte citronné a montré l'effet antitumoral le plus fort, mais s'est avéré le moins cytotoxique pour les cellules mononucléaires normales du sang périphérique (PBMC). Chacune de ces huiles essentielles contenait une grande quantité de citral. La CI50 contre les cellules cancéreuses du sein, lorsque le citral était volatilisé à partir de chaque huile essentielle, était de 1,67 µL/mL pour le géranial et de 1,31 µL/mL pour le néral. Le citral volatilisé seul a montré de forts effets antiprolifératifs et inhibiteurs de l'infiltration.

Conclusion : Les composants volatils de la citronnelle, du myrte citronné, de la litsée et de la mélisse semblent inhiber la prolifération des cellules cancéreuses du sein en raison de leurs niveaux élevés de citral.

Mots-clés : Myrte citronné, Citronnelle, Litsée, Mélisse, Citral, Cancer du sein.

Introduction

Le cancer est la première cause de décès au Japon, avec une personne sur deux développant un cancer au cours de sa vie. Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez les femmes japonaises, touchant une femme sur neuf. L'âge d'apparition du cancer du sein est relativement jeune et se situe entre 40 et 65 ans, de nombreuses mères développant un cancer du sein avant que leurs enfants n'atteignent l'âge adulte [1]. Divers traitements existent pour le cancer du sein, tels que la chirurgie, la thérapie hormonale, les médicaments anticancéreux, et les thérapies ciblées moléculaires.

*Correspondence:

Takuya Nagata
takuya.nagata@med.toho-u.ac.jp

¹ Department of Surgery, Toho University Ohashi Medical Center, Tokyo, Japan

² Department of Narita Pharmaceutical Sciences, International University of Health and Welfare, Chiba, Japan

³ Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toho University, Chiba, Japan

⁴ Aromatic Plant Research Center, Lehi, UT, USA

⁵ Prime Meridian HealthCare, Pleasant Grove, Utah, USA



© L'(es) auteur(s) 2024. Accès libre : Cet article est sous licence Creative Commons Attribution 4.0 International, ce qui permet l'utilisation, le partage, l'adaptation, la distribution et la reproduction dans tout support ou format, à condition de créditer l'auteur(s) original(aux) et la source, de fournir un lien vers la licence Creative Commons, et d'indiquer si des modifications ont été apportées. Les images ou autres matériels tiers inclus dans cet article sont sous la licence Creative Commons de l'article, sauf indication contraire dans une ligne de crédit. Si le matériel n'est pas inclus dans la licence Creative Commons de l'article et que votre utilisation prévue n'est pas autorisée par la réglementation légale ou dépasse l'utilisation permise, vous devrez obtenir l'autorisation directement du détenteur des droits d'auteur. Pour consulter une copie de cette licence, visitez <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. La dérogation de la Dédie au Domaine Public de Creative Commons (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) s'applique aux données mises à disposition dans cet article, sauf indication contraire dans une ligne de crédit des données.

Les traitements incluent les médicaments, la radiothérapie, le diagnostic génomique et les inhibiteurs des points de contrôle immunitaire. Les progrès dans ces méthodes thérapeutiques et le développement de nouveaux médicaments ont prolongé le pronostic de survie des patientes atteintes de cancer du sein [2]. De plus, le diagnostic génomique a permis de sélectionner et d'administrer des médicaments anticancéreux et des thérapies ciblées moléculaires très efficaces ; cependant, les agents anticancéreux entraînent divers effets secondaires, tels que la perte de cheveux, la fatigue, les nausées, la diarrhée, la constipation, les effets cardiovasculaires et la neutropénie fébrile [3]. Ainsi, les traitements par agents anticancéreux peuvent considérablement réduire la qualité de vie des patientes atteintes de cancer du sein en imposant une douleur et un stress accrus. Comme de nombreuses patientes atteintes de cancer du sein ne sont pas satisfaites des traitements actuels par agents anticancéreux, il existe une forte demande pour le développement de nouvelles méthodes de traitement offrant des effets thérapeutiques plus élevés et moins d'effets secondaires.

Les huiles essentielles sont des composés volatils extraits de plantes, qui ont démontré une variété d'effets positifs, tels que des effets antibactériens, antiviraux et antistress. La pandémie mondiale de COVID-19 de ces dernières années a entraîné une augmentation de l'utilisation des huiles essentielles dans le but de soulager les effets négatifs de l'isolement et d'aider à éviter le contact avec le virus. Les huiles essentielles disponibles dans le commerce sont diffusées dans les pièces à l'aide de diffuseurs, ajoutées aux aliments comme arômes, utilisées comme additifs pour le bain, mélangées avec des huiles de support pour le massage, et sont généralement largement utilisées comme matière première pour les produits pharmaceutiques, les aliments, les parfums et les cosmétiques [4, 5].

Les terpènes, principaux composants des huiles essentielles, sont composés de deux ou plusieurs unités d'isoprène (C5) et incluent les monoterpènes (C10), les sesquiterpènes (C15), les diterpènes (C20) et des terpènes avec des unités supérieures (C25). Les dérivés de terpènes avec des groupes fonctionnels, tels que les groupes carbonyle et hydroxyle, sont appelés terpénoïdes. Les aldéhydes monoterpénoïdes néral et géraniol sont des isomères cis-trans, collectivement appelés citral, et il a été rapporté qu'ils possèdent une large gamme de propriétés biologiques (par exemple, antitumorales, anti-inflammatoires, antibactériennes, antifongiques, antivirales, analgésiques et antioxydantes) [6, 7].

À l'échelle mondiale, la prévalence du cancer augmente chaque année, ce qui fait du diagnostic et du traitement du cancer des enjeux très importants. Les composés anticancéreux synthétiques représentent le plus grand segment du marché actuel des traitements contre le cancer, mais plus des deux tiers des médicaments actuellement utilisés en clinique sont soit directement dérivés de produits naturels, soit leurs activités biologiques sont issues de produits naturels [8]. De nombreux terpènes et terpénoïdes présents dans les huiles essentielles présentent des activités antitumorales [9]. Parmi ces composés, des recherches approfondies sur les effets antitumoraux des monoterpènes et des sesquiterpènes, qui ont de faibles poids moléculaires, ont été menées.

Les recherches détaillées sur les effets antitumoraux des monoterpènes et sesquiterpènes, qui ont un faible poids moléculaire et une grande volatilité, devraient conduire au développement d'un nouveau domaine de découverte de médicaments, englobant le traitement du cancer par l'utilisation des parfums.

Dans cette étude, nous avons examiné les effets antitumoraux des composants volatils de vingt huiles essentielles disponibles dans le commerce, réputées pour leurs bienfaits dans la réduction des symptômes désagréables et le maintien de la santé. Parmi celles-ci, nous avons sélectionné les huiles essentielles présentant les effets antitumoraux les plus puissants pour des investigations supplémentaires, y compris les facteurs antitumoraux contenus dans ces huiles. L'objectif de cette recherche était de clarifier les effets antitumoraux des composants volatils des huiles essentielles et de déterminer quel(s) constituant(s) dans les composants testés pourraient être responsables des effets antitumoraux et de renforcement des traitements.

Matériaux et méthodes

Huile essentielle et ajustement

Toutes les huiles essentielles, à l'exception du citral, ont été achetées chez **doTERRA** (Pleasant Grove, Utah, États-Unis) (Tableau 1). Ces huiles essentielles ont été majoritairement extraites par un procédé de distillation à la vapeur et leurs constituants ont été évalués par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Le citral a été acheté chez WAKO (Osaka, Japon), puis dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à une concentration de 10^{-2} g/mL et conservé à -20 °C.

Tableau 1 : Les noms communs et scientifiques de chaque huile essentielle

Nom commun	Nom scientifique
Cedar Wood	<i>Cedrus deodara</i> , <i>Juniperus virginiana</i>
Clove	<i>Eugenia caryophyllata</i>
Copaiba	<i>Copaifera</i> spp.
Frankincense	<i>Boswellia carterii</i>
Grapefruit	<i>Citrus x paradisi</i>
Hinoki	<i>Chamaecyparis obtusa</i>
Lavender	<i>Lavandula angustifolia</i>
Lemon	<i>Citrus limon</i>
Lemongrass	<i>Cymbopogon citratus</i> , <i>Cymbopogon flexuosus</i>
Lemon Myrtle	<i>Backhousia citriodora</i>
Lime	<i>Citrus aurantiifolia</i>
Litsea	<i>Litsea cubeba</i>
Melissa	<i>Melissa officinalis</i>
Niaouli	<i>Melaleuca viridiflora</i>
Wild Orange	<i>Citrus sinensis</i>
Oregano	<i>Origanum vulgare</i>
Tangerine	<i>Citrus reticulata</i>
Tea Tree	<i>Melaleuca alternifolia</i>
Thyme	<i>Thymus vulgaris</i>

Lignées cellulaires et conditions de culture

Deux lignées cellulaires de cancer du sein (SKBR3 et MCF7) ont été achetées auprès de l'American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Les deux types de cellules cancéreuses ont été cultivés dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) contenant 5 % de sérum de veau fœtal (GIBCO, Gaithersburg, USA) et 1 % d'Antibiotique–Antimycosique (Streptomycine–Amphotéricine B et Pénicilline) (Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japon) a été ajouté à toutes les cultures. En tant que contrôles, des échantillons de 3 mL de sang périphérique ont été prélevés sur un volontaire en bonne santé, recruté avant cette étude, et ayant fourni un consentement éclairé. Le sang veineux a été recueilli dans des tubes héparinés. Les échantillons ont été traités et les cellules mononucléaires (PBMC) ont été isolées par centrifugation avec Lymphoprep (StemCell Technologies, Vancouver, Canada) (800 × g, 20 minutes), puis cultivées dans un milieu OpTmizer (Life Technologies Japan, Tokyo, Japon).

Essai de prolifération cellulaire

Les effets antitumoraux des différents composants des huiles essentielles ont été quantifiés à l'aide d'un test colorimétrique de viabilité cellulaire (MTT) (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromure). Tout d'abord, les cellules cancéreuses ont été préparées dans des plaques de 96 puits à un ratio de 1×10^4 par 100 μ L. Ensuite, les composants des huiles essentielles ont été administrés aux cellules cultivées à des concentrations de 0,098 à 50 μ g/mL et incubés à 37 °C pendant 48 heures. Par la suite, 10 μ L de Solution I du kit de prolifération cellulaire MTT (Roche Diagnostics, Tokyo, Japon) ont été ajoutés à chaque puits. Après une réaction à 37 °C pendant 4 heures, 100 μ L de solution de visualisation ont été ajoutés à chaque puits et laissés réagir toute la nuit à 37 °C. L'absorbance à 570 nm a ensuite été mesurée à l'aide d'un lecteur de plaques (iMark plate reader ; Bio Rad, Hercules, Californie). La concentration entraînant 50 % d'inhibition (CI50) a été déterminée par ajustement de courbe et utilisée comme critère pour évaluer la cytotoxicité d'un composé.

Pour l'expérience sur les composants volatils, 50 μ L d'huile essentielle non diluée ou diluée 500 fois ont été administrés aux deux puits centraux, puis laissés réagir à 37 °C pendant 48 heures. Le test MTT a été réalisé pour évaluer l'activité antitumorale des composants volatils de chaque huile essentielle.

Observations morphologiques et évaluation de la réponse apoptotique

Les effets antitumoraux des composants des huiles essentielles ou des composants volatils des huiles essentielles sur les lignées cellulaires de cancer du sein ont été évalués en observant les cellules individuelles à l'aide d'un microscope à fluorescence. Toutes les cellules cancéreuses du sein ayant réagi aux huiles essentielles ont été doublement colorées avec du calcein-acétoxyméthyl (AM) et de l'iodure de propidium (PI) à partir du kit de double coloration cellulaire (Dojindo

Laboratoires, Tokyo, Japon). Ce processus a coloré les cellules vivantes en vert et les noyaux des cellules mortes en rouge. Les cellules cancéreuses du sein colorées ont été observées au microscope à fluorescence (Olympus CKX-53, Tokyo, Japon) et les changements ont été photographiés (Olympus DP28, Tokyo, Japon).

Analyse de la concentration des composants volatils

Un total de 0,1 mL de DMEM a été administré dans chaque puits d'une plaque de 96 puits et des pièges MonoTrap RCC18 (GL Sciences, Tokyo, Japon) ont été ajoutés à des intervalles réguliers (proche : 1,0 cm, intermédiaire : 2,0 cm, et distant : 3,0 cm) du centre. De plus, 50 μ L d'huile essentielle diluée à 0,02 mg/mL ont été administrés dans deux puits au centre de la plaque. Chaque plaque a été laissée à 37 °C pendant 48 heures. Après l'incubation, les pièges MonoTrap ont été transférés dans un récipient en verre contenant 2 mL d'hexane, puis scellés. La concentration de citral (géralial et néral, les deux isomères géométriques collectivement appelés citral) dans chaque solution d'hexane a été mesurée à l'Université Internationale de Santé et Bien-être, en utilisant le GC-MS-QP2010 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japon). Une colonne capillaire DB-5MS (30 m x 0,25 mm I.D. ; colonne non polaire de 0,25 μ m ; Agilent Technologies, Tokyo, Japon) a été utilisée pour l'analyse. L'hélium (99,99995 % ; 1,82 mL/min) a été utilisé comme gaz porteur. Les températures de la ligne d'injection et de la source ont été fixées à 250 °C. Les températures du four de la colonne ont été réglées à 40 °C pendant 2 minutes, puis augmentées à 200 °C à un taux de 5 °C/min et maintenues à 200 °C pendant 2 minutes.

L'analyse des composants a été réalisée pour chaque huile essentielle en utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) au Aromatic Plant Research Center (Lehi, Utah, États-Unis). Les composants présents dans l'huile essentielle à une concentration de 0,1 % ou plus ont été étudiés plus en détail.

Essais de migration et d'invasion cellulaires

Les essais de migration et d'invasion cellulaires ont été réalisés en utilisant les kits CytoSelect 24-well cell migration and invasion assay (8 μ m, format colorimétrique) (CELL BIOLABS, INC. San Diego, CA, USA). Dans l'essai de migration cellulaire, les cellules cancéreuses du sein SKBR3 ont été placées dans du DMEM sans sérum dans la chambre supérieure à une concentration de 1×10^5 cellules par puits. Le puits inférieur contenait du DMEM avec 10 % de FBS. Les cellules SKBR3 ont été autorisées à migrer pendant 24 heures. Ensuite, le milieu a été aspiré de l'intérieur de l'insert, et l'intérieur des inserts a été tamponné pour enlever les cellules non migratoires. L'insert a été coloré avec la solution de coloration cellulaire pendant 10 minutes à température ambiante, et les cellules migratoires ont été comptées avec un microscope optique. Ensuite, 200 μ L de solution d'extraction ont été ajoutés à l'insert et incubés pendant 10 minutes ; après l'incubation, 100 μ L d'échantillon ont été transférés dans une plaque à microtitration de 96 puits et l'absorbance à 560 nm a été mesurée dans la plaque lecteur.

L'essai d'invasion cellulaire a été réalisé de manière similaire à l'essai de migration cellulaire, à l'exception du fait que le filtre à membrane avait été préalablement recouvert d'une couche uniforme de solution de matrice de membrane basale séchée. Cette couche de membrane basale sert de barrière pour distinguer les cellules invasives des cellules non invasives.

Analyse statistique

Toutes les données sont exprimées sous forme de moyennes \pm écart-type. Une analyse de variance à un facteur (ANOVA) suivie des tests de comparaisons multiples post hoc de Bonferroni ont été utilisées. Le seuil de signification a été fixé à 5 %. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism version 9.4.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, Californie).

Résultats

Effet antitumoral de chaque composant volatil des huiles essentielles

Les noms communs et scientifiques de chaque huile essentielle analysée dans cette étude sont listés dans le Tableau 1.

La Figure 1 présente les résultats du test MTT, qui montre les cellules cancéreuses ayant arrêté de proliférer dans les zones teintées en jaune, et celles qui proliféraient activement dans les zones teintées en bleu marine. Le DMSO a été utilisé comme contrôle et n'a pas modifié la capacité proliférative des cellules.

Les cellules cancéreuses du sein. Quatre huiles essentielles ont teinté toute la plaque en jaune : la citronnelle, le myrte citronné, la litsée et la mélisse. Les huiles essentielles de thym et d'origan ont montré des effets relativement forts d'inhibition de la croissance tumorale. Les huiles essentielles d'agrumes, telles que le citron, l'orange, le pamplemousse, le citron vert et la mandarine, ont inhibé la croissance des cellules cancéreuses uniquement dans les puits situés à proximité de ces huiles essentielles. Les huiles essentielles d'encens, de clou de girofle, de niaouli, d'arbre à thé, de hinoki, de lavande, de copaïba et de bois de cèdre ont également seulement inhibé la prolifération des cellules cancéreuses avoisinantes. Sur la base de ces résultats, la citronnelle, le myrte citronné, la litsée et la mélisse ont été sélectionnées pour des études complémentaires.

Effet antitumoral de chaque huile essentielle

Le test MTT a examiné les effets inhibiteurs de la croissance tumorale de ces quatre huiles essentielles lorsqu'elles agissent directement sur les cellules cancéreuses du sein. La CI50 pour les cellules SKBR3 était la plus faible, soit 18,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour le myrte citronné, et la plus élevée, soit 29,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour l'huile essentielle de mélisse (Fig. 2). Les valeurs de CI50 pour les cellules MCF7 ont également montré la plus faible à 12,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour le myrte citronné. Ainsi, nous avons conclu que les quatre huiles essentielles ont inhibé la prolifération des cellules cancéreuses du sein, et que le myrte citronné avait la plus forte activité lorsqu'il était appliqué directement sur les cellules cancéreuses.

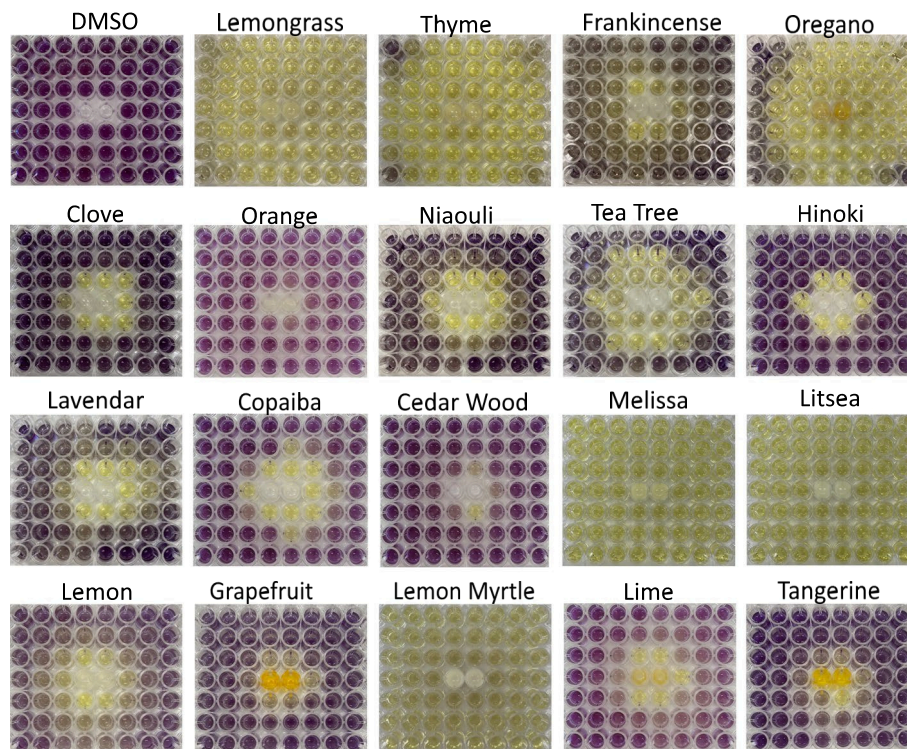


Fig. 1 Effet antitumoral de chaque composant volatil des huiles essentielles. Deux types de cellules cancéreuses du sein (SKBR3 et MCF7) ont été incubées dans des plaques de 96 puits, et chaque huile essentielle a été transférée dans les deux puits centraux. Après 48 heures, le test MTT a été réalisé, et les résultats de la plaque sont présentés.

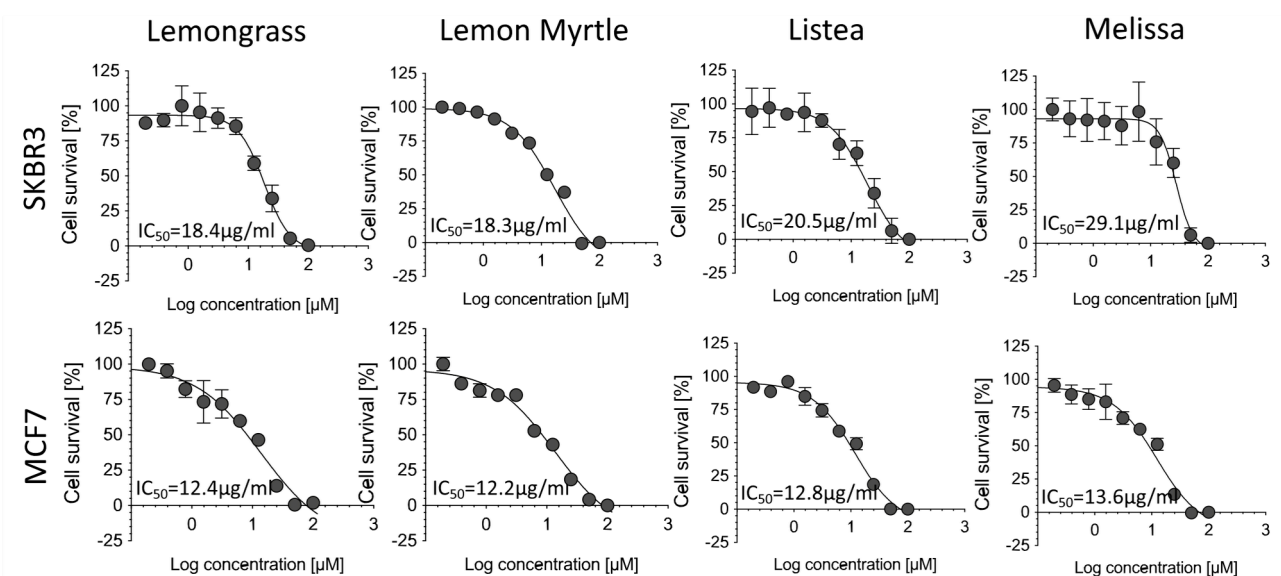


Fig. 2 Effet antitumoral de chaque huile essentielle. Chaque type de cellules cancéreuses du sein (SKBR3 et MCF7) a été incubé avec différentes doses des quatre huiles essentielles pendant 48 heures. Le test MTT a été réalisé et la CI50 a été analysée. Chaque barre représente la moyenne ± écart-type des expériences réalisées en triplicat.

Modifications de la morphologie cellulaire dues aux composants volatils des huiles essentielles

Les changements cellulaires induits par les composants volatils des quatre huiles essentielles ont également été comparés. Les cellules cancéreuses dans les puits proches de l'huile essentielle diluée 500 fois (groupe proximal)

et les cellules cancéreuses dans les puits les plus éloignés de cette huile essentielle (groupe distal) ont été colorées avec du calcein-AM et de l'iodure de propidium (PI), puis analysées à l'aide d'un microscope à fluorescence (Fig. 3). Dans les deux lignées cellulaires, de nombreux noyaux de cellules mortes colorés en rouge ont été observés dans le groupe proximal, tandis que...

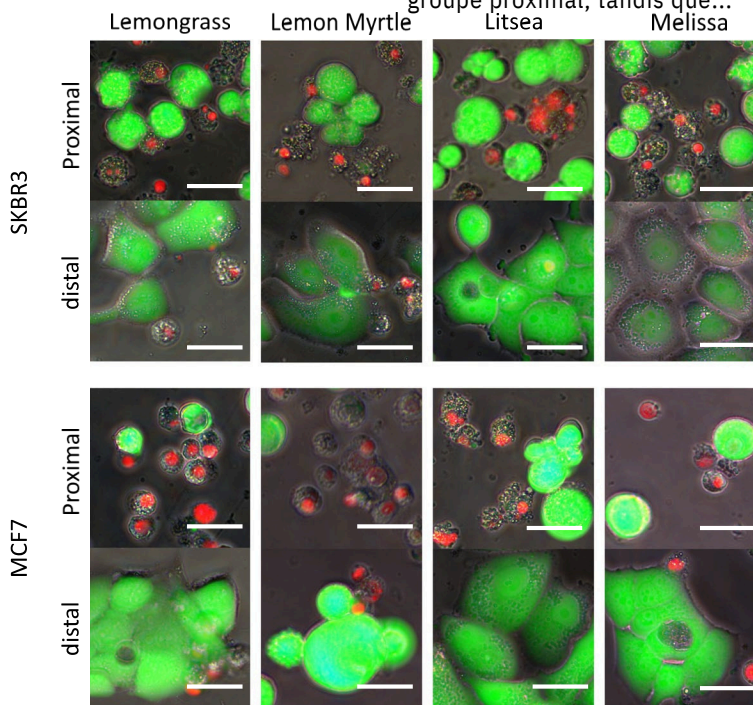


Fig. 3 Modifications morphologiques des cellules cancéreuses du sein dues aux composants volatils des huiles essentielles. Deux types de cellules cancéreuses du sein (SKBR3 et MCF7) ont été incubées avec quatre huiles essentielles diluées 500 fois pendant 48 heures. Les modifications morphologiques des cellules cancéreuses ont été analysées par microscopie à fluorescence (grossissement 400x) après coloration au Calcein-AM (Cal) et à l'iodure de propidium (PI). Les modes en contraste de phase (PC) et les modes fusionnés (Mer) sont également présentés. La barre blanche représente 20 µm.

de nombreuses cellules viables colorées en vert ont été observées dans le groupe distal. Le ratio des cellules mortes par rapport aux cellules vivantes dans le groupe proximal était légèrement plus faible pour l'huile essentielle de mélisse, mais aucune différence claire n'a été observée pour la citronnelle, le myrte citronné ou la litsée. Bien que le nombre de cellules mortes soit plus faible que dans le groupe proximal, certaines cellules cancéreuses dans le groupe distal ont également montré des signes de mort cellulaire. Le ratio des cellules mortes et des cellules viables dans le groupe distal était presque identique pour chaque huile essentielle.

Effet antitumoral des composants volatils de chaque huile essentielle

Le test MTT a été utilisé avec chacune des quatre huiles essentielles diluées 500 fois, et les changements dans les effets inhibiteurs de la croissance cellulaire en fonction de la distance depuis le centre ont été comparés (Fig. 4a). Le myrte citronné a le plus fortement supprimé la prolifération des cellules cancéreuses du sein.

Le myrte citronné a le plus fortement supprimé la prolifération des cellules, tandis que la mélisse a montré l'effet le plus faible. Un lecteur de plaques a été utilisé pour mesurer l'absorbance de chaque puits, et le taux de survie cellulaire (%) des trois groupes a été comparé en fonction de leur distance par rapport à l'huile essentielle : groupe proximal (0,8–1,0 cm), groupe intermédiaire (1,6–2,0 cm), et groupe distal (2,4–3,0 cm) (Fig. 4b). Dans le groupe proximal, les deux lignées cellulaires ont été significativement supprimées par le myrte citronné ($p < 0,05$), tandis que la citronnelle et la litsée affichaient des taux de croissance similaires, et la mélisse avait l'effet le plus faible sur les taux de prolifération des cellules cancéreuses du sein. Le myrte citronné a également significativement réduit le taux de prolifération des cellules SKBR3 dans le groupe intermédiaire, mais aucune différence claire n'a été observée chez les cellules MCF7. Aucune différence n'a été observée dans les effets inhibiteurs de croissance de chaque huile essentielle sur les cellules SKBR3 et MCF7 dans le groupe distal.

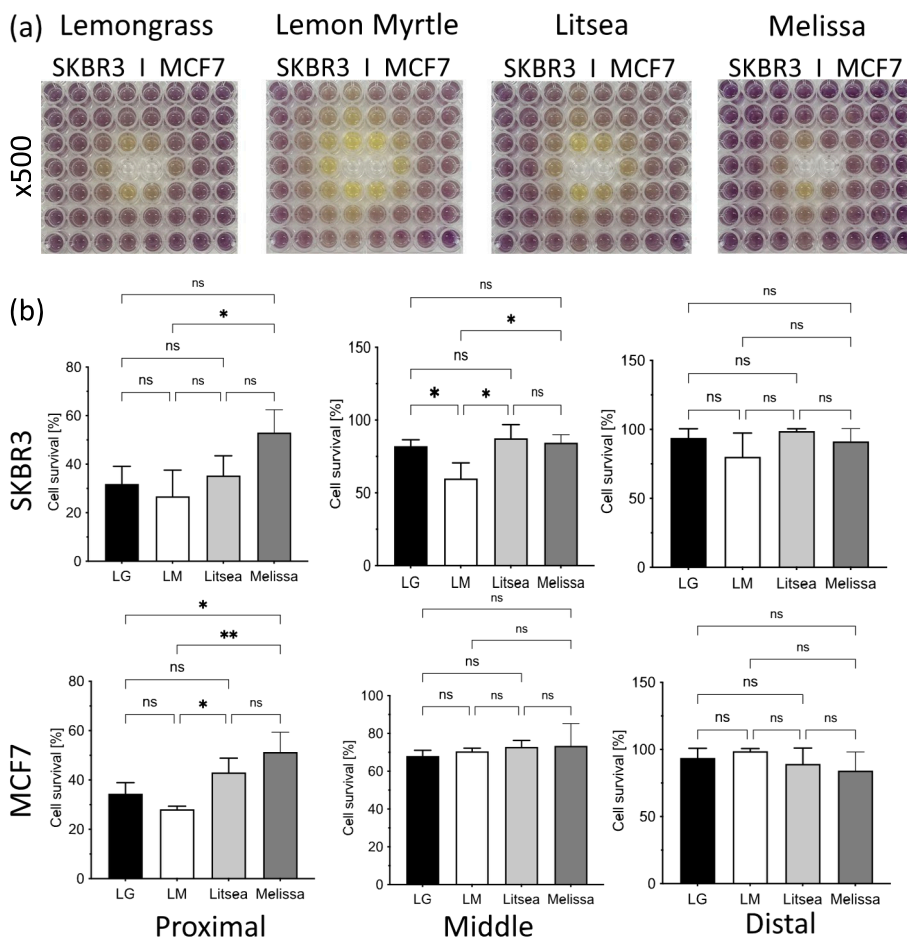


Fig. 4 Effet antitumoral des composants volatils de chaque huile essentielle.

a Deux types de cellules cancéreuses du sein (SKBR3 et MCF7) ont été incubés dans une plaque de 96 puits, et quatre types d'huiles essentielles ont été transférés dans les deux puits centraux (LG : citronnelle, LM : myrte citronné, litsée et mélisse). Après 48 heures, le test MTT a été réalisé et les résultats de la plaque sont présentés.

b La moyenne des intensités de chaque groupe (proximal, intermédiaire et distal) est présentée dans le graphique en barres. Chaque barre représente la moyenne ± écart-type des expériences réalisées en triplicat (ns : non significatif, * : $p < 0,05$ et ** : $p < 0,01$).

Effet des composants volatils de chaque huile essentielle sur les cellules normales

Le test MTT a également été utilisé pour comparer les effets des composants volatils de ces huiles essentielles sur les cellules mononucléaires du sang périphérique humain (PBMC) normales (Fig. 5). Dans le groupe proximal, le myrte citronné n'a pas supprimé la prolifération cellulaire de manière plus significative que les autres huiles essentielles. Aucune différence significative n'a été observée entre les huiles essentielles dans les groupes intermédiaire et proximal, et la cytotoxicité envers les PBMC était très faible. Ces résultats indiquent que le myrte citronné n'affecte pas les cellules normales, bien que les deux lignées cellulaires de cancer du sein étudiées aient présenté des effets cytostatiques forts à la même dose.

Étude comparative des constituants de chaque huile essentielle

Pour clarifier pourquoi le myrte citronné a montré les effets antitumoraux les plus puissants, la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) a été utilisée pour analyser les composants de chaque huile essentielle. Les composants dont la teneur dans l'huile essentielle est de 0,1 % ou plus sont listés dans le Tableau 2.

Le géraniol était le composant le plus abondant dans les quatre huiles essentielles, suivi par le néral. Les niveaux totaux de citral étaient de 70,04 % dans la citronnelle, 83,77 % dans le myrte citronné, 78,52 % dans la litsée, et 40,34 % dans la mélisse. La teneur en citral était la plus élevée dans le myrte citronné, ce qui était cohérent avec les résultats des effets antitumoraux (Fig. 4).

Ainsi, nous avons donc déterminé que le citral était le principal inhibiteur de la croissance tumorale dans ces huiles essentielles.

Comparaison des concentrations de citral dans les composants volatils des huiles essentielles

Le taux d'adsorption du citral par le MonoTrap RCC18 placé dans chaque puits a été quantifié à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse (Fig. 6). Dans le groupe proximal, les concentrations moyennes de géraniol et de néral étaient respectivement de 5,0 µL/mL et 3,5 µL/mL. Les concentrations étaient significativement plus élevées dans le myrte citronné que dans les autres huiles essentielles. Aucune différence significative dans les concentrations de citral n'a été trouvée dans les groupes intermédiaire et distal des huiles essentielles. Les concentrations de citral (CI50) auxquelles chaque huile essentielle a montré une cytotoxicité sur les cellules cancéreuses du sein étaient de 1,67 µL/mL pour le géraniol et 1,31 µL/mL pour le néral (Figs. 4 et 6).

Effets antitumoraux du citral

Nous avons étudié l'effet antitumoral du citral in vitro. Lorsque le citral a été directement appliqué sur les cellules cancéreuses du sein, la CI50 était de 7,9 µM pour les cellules SKBR3 et de 7,5 µM pour les cellules MCF7 (Fig. 7a). Lorsque les composants volatils du citral ont agi sur les cellules cancéreuses du sein, la prolifération cellulaire dans les groupes proximal jusqu'à partiellement distal a été supprimée à une dilution de 500 fois (Fig. 7b). L'intensité a diminué à 9,0 % dans le groupe proximal, 15,2 % dans le groupe intermédiaire, et 67,1 % dans le groupe distal, montrant ainsi un effet antitumoral plus fort que...

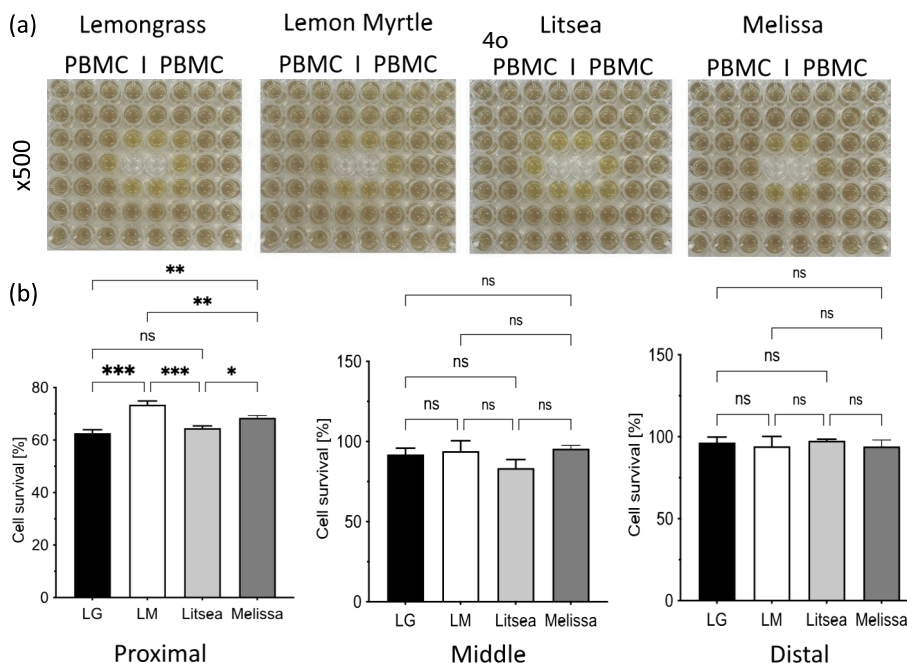


Fig. 5 Effect of volatile components of each essential oil on healthy cells. **a** PBMCs were incubated in a 96-well plate, and four types of essential oils were transferred into the two center wells (LG: lemongrass, LM: lemon myrtle, litsea, and melissa). After 48 h, the MTT assay was performed, and the results for the plate are shown. **b** The average of the intensities of each group (proximal, middle, and distal) are shown in the bar graph. Each bar represents the mean ± SD of triplicate experiments (ns: not significant, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.005$)

Tableau 2 : Composants et concentrations (%) dans chaque huile essentielle

		Lemon grass	Lemon Myrtle	Litsea	Melissa	Chemical Class
1	Geranial	40.23	44	39.47	23.18	Monoterpene Aldehyde
2	beta-Caryophyllene	1.54	0.16	1.02	17.61	Sesquiterpene Hydrocarbon
3	Neral	29.81	39.77	29.05	17.16	Monoterpene Aldehyde
4	Limonene	0.33	/	14.37	0.53	Monoterpene Hydrocarbon
5	Germacrene D	0.24	0.02	0.01	9.63	Sesquiterpene Hydrocarbon
6	Geraniol	8	2.08	0.63	2.99	Monoterpene Alcohol
7	Geranyl acetate	5.35	/	0.03	2.23	Monoterpene Ester
8	trans-Isocitral	1.33	3.9	1.96	0.86	Monoterpene Aldehyde
9	Citronellal	0.25	0.24	0.62	3.38	Monoterpene Aldehyde
10	trans-beta-Ocimene	0.19	0.08	0.01	2.7	Monoterpene Hydrocarbon
11	cis-Isocitral	0.25	2.27	1	/	Monoterpene Aldehyde
12	6-M ethyl-5-hepten-2- one	1.67	1.62	0.82	2.06	Aliphatic Ketone
13	Sabinene	/	/	1.81	/	Monoterpene Hydrocarbon
14	Myrcene	0.08	0.29	1.51	0.16	Monoterpene Hydrocarbon
15	alpha-Pinene	0.23	/	1.46	/	Monoterpene Hydrocarbon
16	delta-Cadinene	0.38	0.04	0.04	1.44	Sesquiterpene Hydrocarbon
17	2-Nonanone	1.38	/	/	/	Aliphatic Ketone
18	gamma-Cadinene	1.29	/	/	0.5	Sesquiterpene hydrocarbon
19	alpha-Humulene`	0.18	0.02	0.1	1.28	Sesquiterpene Hydrocarbon
20	Nerol	/	1.29	0.33	1.05	Monoterpene Alcohol
21	Linalool	1.14	0.68	0.98	1	Monoterpene Alcohol
22	Camphene	1.12	/	0.27	/	Monoterpene Hydrocarbon
23	1,8-Cineole	0.1	/	1.09	/	Monoterpene Ether
24	beta-Pinene	0.02	/	1.08	/	Monoterpene Hydrocarbon
25	Caryophyllene oxide	0.56	/	0.13	1.04	Sesquiterpene Ether

dans le myrte citronné. Lorsque les cellules mononucléaires du sang périphérique normal (PBMC) ont réagi avec le citral, l'intensité était de 60,3 % dans le groupe proximal, 57,1 % dans le groupe intermédiaire et 83,9 % dans le groupe distal. Les tests de migration et d'invasion cellulaire ont été réalisés sur les cellules cancéreuses du sein SKBR3 exposées aux composants volatils du citral dilué 500 fois (Fig. 7c). La capacité de la lignée cellulaire SKBR3 à migrer et à envahir a été significativement réduite par les composants volatils du citral ($p < 0,01$). Ainsi, le citral volatilisé a un fort effet antitumoral.

Discussion

Diagnostic et traitement du cancer du sein

L'aromathérapie pour la prévention et le traitement du cancer a été pratiquée comme une thérapie alternative utilisant des huiles essentielles dérivées de plantes [10]. Par exemple, il a été montré que l'encens induit l'apoptose dans les cellules cancéreuses du sein et que la lavande induit l'apoptose dans les cellules cancéreuses de l'estomac, de la peau et du sein [11, 12]. Le carvacrol est un monoterpène extrait, par exemple, de *Thymus vulgaris* (thym) et *Origanum vulgare* (origan), et tue plusieurs types de cellules cancéreuses, comme celles du sein, de l'estomac, du côlon et du foie, en arrêtant le cycle cellulaire [13, 14].

Dans la présente étude, la citronnelle, le myrte citronné, la litsée et la mélisse ont montré les effets antitumoraux les plus puissants (Fig. 1) sur les cellules cancéreuses du sein. Contrairement à d'autres études qui ont montré que chaque huile essentielle agit directement sur les cellules cancéreuses, cette étude compare les effets antitumoraux des composants volatils de chaque huile essentielle. Aucun rapport antérieur ne s'est concentré sur les composants volatils de chaque huile essentielle pour les comparer. Cette méthode a une grande valeur en tant qu'étude de base pour le potentiel de traitement du cancer avec des huiles essentielles.

Myrte citronné

Le myrte citronné (*Backhousia citriodora*), un arbuste de la famille des Myrtacées, est une espèce originaire des forêts tropicales de la région côtière du Queensland, en Australie [15]. Il dégage une riche odeur de citron, contient du citral et est utilisé comme épice traditionnelle en Australie. Des études antérieures ont montré que le myrte citronné possède des effets antioxydants et anti-inflammatoires élevés, grâce à sa capacité à inhiber la production de médiateurs inflammatoires tels que le monoxyde d'azote (NO) [16-18]. De plus, il a été découvert que le myrte citronné agit directement sur les cellules cancéreuses du côlon, de l'estomac et de la vessie en induisant l'apoptose via la caspase-3 [19]. Dans cette étude, le

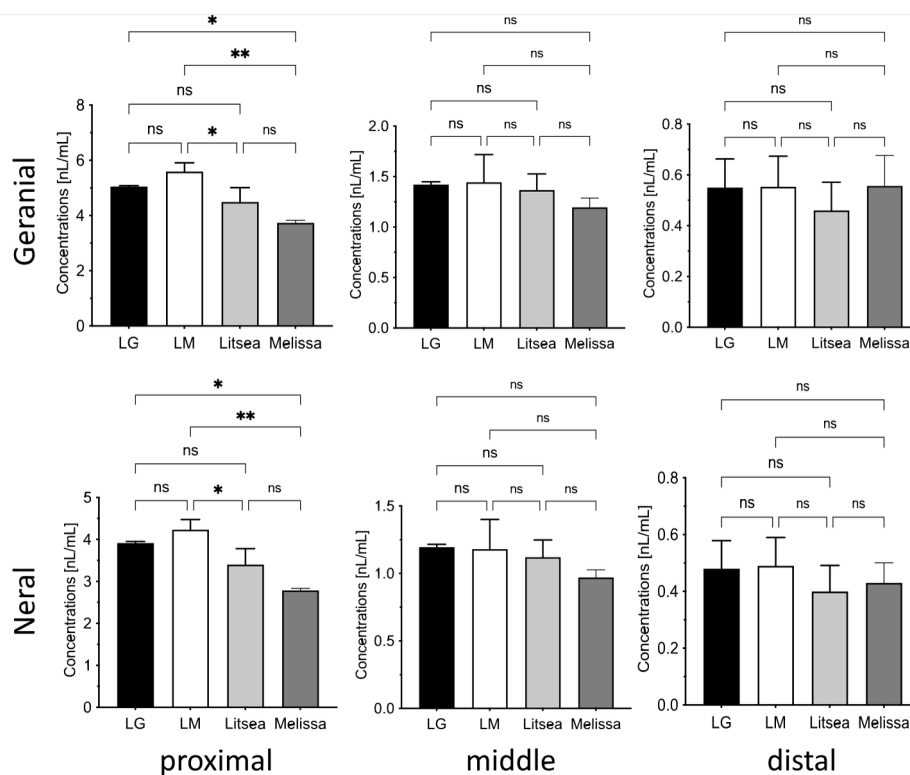


Fig. 6 Concentrations de citral dans les composants volatils des huiles essentielles. La distance par rapport à l'huile essentielle [groupe proximal (0,8–1,0 cm), groupe intermédiaire (1,6–2,0 cm), et groupe distal (2,4–3,0 cm)] et la concentration des composants volatils (géranial, néral) dans chaque huile (LG : citronnelle, LM : myrte citronné, litsée et mélisse) ont été comparées par analyse GC-MS. Chaque barre représente la moyenne \pm écart-type des expériences réalisées en triplicat (ns : non significatif, * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,005$).

composant volatil de l'huile essentielle de myrte citronné a montré une forte cytotoxicité contre les cellules cancéreuses du sein, mais n'a pas présenté de toxicité sur les globules blancs normaux. L'effet anticancéreux du myrte citronné était le plus puissant des quatre huiles essentielles testées, ce qui pourrait être dû à sa concentration élevée en citral (un mélange d'isomères de néral et de géranial). Le citral est un monoterpène connu pour être un composé à faible poids moléculaire et à haute volatilité. Ces résultats suggèrent que le myrte citronné pourrait être bénéfique en tant que traitement contre le cancer en raison de ses effets antitumoraux.

Lemongrass

La citronnelle (*Cymbopogon* spp.) est une plante vivace de la famille des graminées, largement utilisée dans les pays tropicaux, en particulier en Asie du Sud-Est. Le genre *Cymbopogon* comprend environ 180 espèces, telles que *Cymbopogon citratus* et *Cymbopogon flexuosus*. L'huile essentielle de citronnelle contient de nombreux composés bioactifs, dont le citral, le citronellol, le citronellal, le limonène, le linalool et le nérol [20]. Il a été rapporté que l'huile essentielle de citronnelle présente des activités antibactériennes, anti-inflammatoires, anticancéreuses, antimutagènes et antidiabétiques [21]. En particulier,

L'huile essentielle de Cymbopogon citratus a été rapportée pour exercer une activité cytotoxique puissante contre diverses lignées de cellules cancéreuses [22, 23].

Mélisse

La mélisse (*Melissa officinalis* L.) est une plante vivace de la famille des Labiacées, également connue sous le nom de mélisse citronnelle [24]. Elle pousse généralement dans la région méditerranéenne et en Asie occidentale, et est intensivement cultivée en Europe. La mélisse possède divers effets médicaux, tels que des effets hypoglycémiques, hépatoprotecteurs, antibactériens, antidépresseurs, hypnotiques, sédatifs et antioxydants [25]. Il a également été rapporté que la mélisse exerce des effets cytotoxiques sur les cellules tumorales du poumon, du sein, de l'ovaire, du pancréas, du côlon et du cerveau [26, 27]. L'acide rosmarinique contenu dans la mélisse est rapporté comme ayant un fort effet antitumoral [28].

Litsée

La litsée (*Litsea cubeba*) est un arbre ou arbuste à feuilles persistantes de 3 à 10 m de hauteur, largement distribué en Asie du Sud-Est, dans le sud de la Chine, au Japon et à Taïwan. Elle est utilisée comme médecine traditionnelle pour traiter diverses affections [29]. La litsée présente une cytotoxicité contre les cellules cancéreuses du poumon, du sein, de l'estomac, de l'utérus, de l'ovaire et du foie [30, 31], et renforce la cytotoxicité

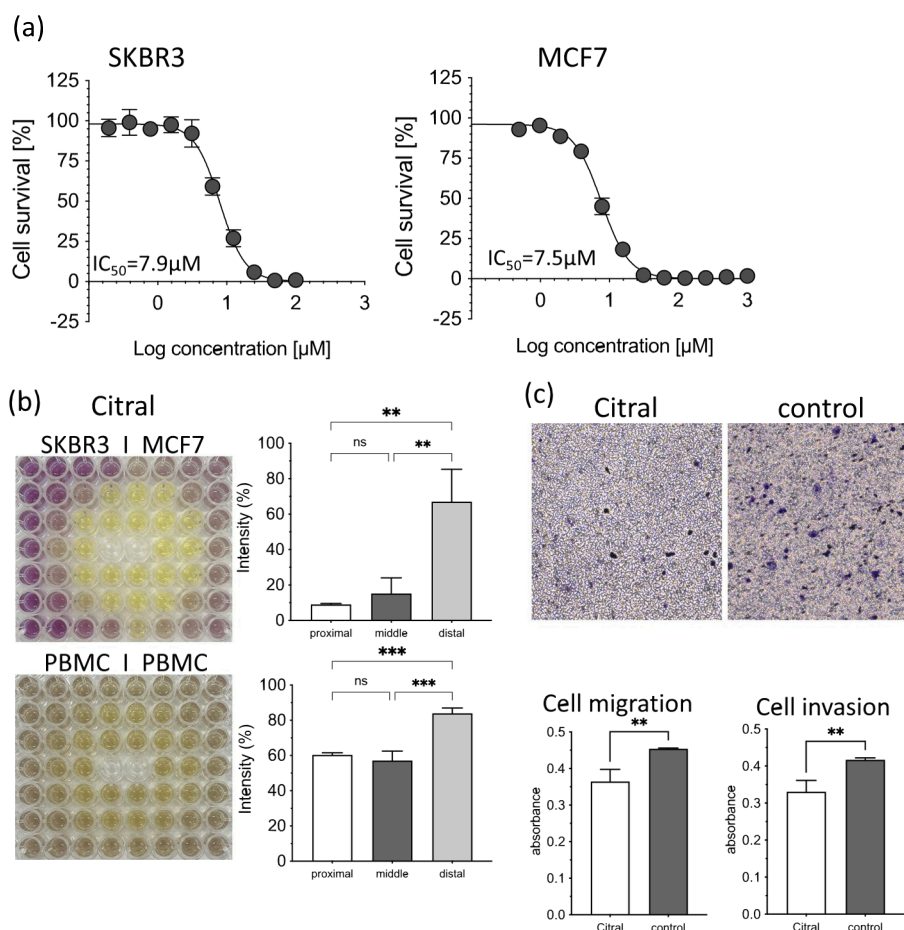


Fig. 7 Effets antitumoraux du citral.

a Chaque type de cellules cancéreuses du sein (SKBR3 et MCF7) a été incubé avec des doses variables de citral pendant 48 h. Le test MTT a été réalisé et la CI_{50} a été déterminée. Chaque barre représente la moyenne \pm écart-type des expériences réalisées en triplicat.

b Les cellules cancéreuses (SKBR et MCF7) ou les PBMC ont été incubées dans une plaque de 96 puits, et du citral dilué 500 fois a été transféré dans les deux puits centraux. Après 48 h, le test MTT a été réalisé, et les résultats de la plaque sont présentés. La moyenne des intensités de chaque groupe (proximal, intermédiaire et distal) est présentée dans le graphique en barres. Chaque barre représente la moyenne \pm écart-type des expériences réalisées en triplicat (ns : non significatif, * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$ et *** : $p < 0,005$).

c Les essais de migration et d'invasion cellulaire ont été réalisés sur des cellules cancéreuses du sein SKBR3 exposées aux composants volatils du citral dilué 500 fois. Les résultats de l'essai d'invasion sont présentés. Les absorbances moyennes sont présentées dans le graphique en barres.

de l'oxaliplatine [32]. Seal et al. ont rapporté que les composants volatils de l'huile essentielle de litsée inactivent la protéine kinase Akt dans les cellules cancéreuses du poumon, induisent l'apoptose via la dépoliarisation du potentiel de la membrane mitochondriale et arrêtent le cycle cellulaire en phase G1/S, inhibant ainsi la croissance des cellules cancéreuses [33]. Étant donné que les composants volatils de l'huile essentielle de litsée peuvent être directement délivrés au tissu pulmonaire par inhalation, il est prévu qu'une nouvelle méthode de traitement soit mise en place.

Citral

Le citral (3,7-diméthyl-2,6-octadién-1-al) est un composant aldéhyde présent dans les huiles essentielles extraites d'agrumes, de citronnelle et de gingembre [34]. Le citral induit l'apoptose dans les cellules cancéreuses de l'estomac, du côlon, du sein, de l'utérus, de l'ovaire et de la prostate [35-38]. Le citral régule également à la baisse l'activité de l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) et la signalisation Wnt, supprimant ainsi la formation de sphéroïdes, l'une des

Les mécanismes d'acquisition de la résistance aux médicaments [39, 40]. Cravotto et al. ont rapporté que l'administration orale de citral chez les souris et les rats entraînait son absorption rapide dans le tractus gastro-intestinal [41]. Bien que la majeure partie du citral appliqué sur la peau soit volatilisée et perdue, le citral restant était absorbé dans l'organisme. Le citral dans le sang était rapidement métabolisé et excrété dans l'urine. Des transporteurs lipidiques nanostructurés encapsulant le citral (NLC-Citral) ont été développés pour prévenir la perte de citral par volatilisation et favoriser son absorption dans les cellules tumorales, ce qui a permis de supprimer la prolifération des cellules cancéreuses du sein et les métastases in vivo et in vitro [42, 43].

Les valeurs de dose létale (DL50) orale ou cutanée de citral chez les rats dépassaient 1000 mg/kg, avec une toxicité aiguë du citral rapportée comme étant faible chez les rongeurs [41]. Dans cette étude, chaque composant volatil des quatre huiles essentielles n'a montré presque aucune cytotoxicité sur les cellules normales (PBMC) dans les groupes intermédiaire et distal (Fig. 5).

Le myrte citronné, qui avait la plus forte teneur en citral, était significativement moins cytotoxique que les trois autres huiles essentielles ; cependant, lorsque le citral seul a été testé avec les PBMC, il a montré des effets cytotoxiques relativement forts sur les cellules dans le groupe intermédiaire, équivalents à ceux du groupe proximal (Fig. 7b). Ainsi, le myrte citronné riche en citral pourrait contenir un composant qui réduit la cytotoxicité du citral sur les cellules normales. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour identifier ce composant. Les résultats de cette étude indiquent que les huiles essentielles contenant une grande quantité de citral, comme le myrte citronné, pourraient être prometteuses pour les futurs traitements contre le cancer grâce à leurs composants volatils.

Cette étude a révélé que les composants volatils des huiles essentielles contenant une grande quantité de citral, comme la citronnelle, le myrte citronné et la litsée, présentent tous une forte activité antitumorale. De plus, il a été démontré que plus la concentration de citral dans la fraction volatile est élevée, plus l'activité antitumorale est forte. Ces huiles essentielles, ainsi que la litsée, sont considérées comme importantes pour de nouveaux traitements par inhalation de composants volatils.

Conclusion

Les composants volatils des huiles essentielles de citronnelle, de myrte citronné, de litsée et de mélisse ont montré une forte activité antitumorale, le myrte citronné affichant l'activité la plus puissante. De plus, ces quatre huiles essentielles ont présenté une faible cytotoxicité envers les PBMC normaux. Toutes ces huiles essentielles contenaient une grande quantité de citral, qui est supposé induire la mort des cellules cancéreuses du sein à l'état volatilisé. Lorsque le citral a été testé indépendamment sur des cellules cancéreuses du sein, il a montré un fort effet antitumoral, réduisant la prolifération, la migration et l'invasion des cellules. Sur la base de ces résultats, les quatre huiles essentielles pourraient être utilisées pour induire la mort des cellules cancéreuses du sein via la volatilisation du citral, suggérant ainsi la possibilité de son utilisation comme ingrédient efficace pour le traitement du cancer.

Acknowledgements The authors would like to thank MARUZEN-YUSHODO Co., Ltd. For English language editing.

Authors' contributions

T.N. and Y.S. designed the experiments. T.N. and M.W. characterized the citral. T.N., S.H. and B.R. performed the experiments. T.S. and P.S. performed data analysis. T.N. and T.S. wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by the Japan Society for the Promotion of Sciences (JSPS), Japan, Kakenhi (21K08652).

Availability of data and materials

The datasets generated and/or analyzed during the current study available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The ethics committee of the Toho University Ohashi medical center approved the study protocol (H20026_H20025). The written informed consents were obtained from each participant.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Received: 8 July 2023 Accepted: 22 May 2024

Published online: 03 June 2024

References

1. Cancer statistics and graph database. Center for the cancer control and information services. 2021. Available from: http://www.ganjo.jp/public/statistics/backnumber/2021_jp.html.
2. Shimoi T, Nagai S, Yoshinami T, Takahashi M, Arioka H, et al. The Japanese breast cancer society clinical practice guidelines for systemic treatment of breast cancer, 2018 edition. *Breast Cancer*. 2020;27:322–31.
3. Rosenkaimer S, Sieburg T, Winter L, Mavratzas A, Hoffman WK, et al. Adverse cardiovascular effects of anti-tumor therapies in patients with breast cancer: A single-center cross-sectional analysis. *Anticancer Res*. 2022;42:3075–84.
4. Christianson DW. Structural and chemical biology of terpenoid cyclases. *Chem Rev*. 2017;117:11570–648.
5. Salakhutdinov NF, Volcho KP, Yarovaya OI. Monoterpenes as a renewable source of biologically active compounds. *Pure Appl Chem*. 2017;89:1105–17.
6. Viktorová J, Stupák M, R'ehor'ová K, Dobiasová S, Hoang L, Hajšlová J, Thanh TV, Tri LV, Tuan NV, Ruml T. Lemongrass essential oil does not modulate cancer cells multidrug resistance by citral - Its dominant and strongly antimicrobial compound. *Foods*. 2020;9:585.
7. Jeong LH, Sang JH, Joong KD, Hee NY, Yeon YD, Hong JT. Inhibitory effect of citral on NO production by suppression of iNOS expression and NF-kappa B activation in RAW264.7 cells. *Arch Pharm Res*. 2008;31:342–9.
8. Sobral MV, Xavier AL, Lima TC, De Sousa DP. Antitumor activity of monoterpenes found in essential oils. *Sci World J*. 2014;2014: 953451.
9. Zielínska-Blajet M, Pietrusiak P, Feder-Kubis J. Selected monocyclic monoterpenes and their derivatives as effective anticancer therapeutic agents. *Int J Mol Sci*. 2021;22(9):4763. <https://doi.org/10.3390/ijms22094763>.
10. Bayala B, Bassole I, Scifo R, Gnoula C, Morel L, Lobaccaro JM, Simper J. Anticancer activity of essential oils and their chemical components - a review. *Am J Cancer Res*. 2014;4(6):591–607.
11. Chen Y, Zhou C, Ge Z, Liu Y, Liu Y, Feng W, Li S, Chen G, Wei T. Composition and potential anticancer activities of essential oils obtained from myrrh and frankincense. *Oncol Lett*. 2013;6(4):1140–6.
12. Boukhatem MN, Sudha T, Darwish NHE, Chader H, Belkadi A, Rajabi M, Houche A, Benkebailli F, Oudjida F, Mousa SA. A new eucalyptol-rich Lavender (*Lavandula stoechas* L.) essential oil: emerging potential for therapy against inflammation and cancer. *Molecules*. 2020;25(16):3671. <https://doi.org/10.3390/molecules25163671>.
13. Jaafari A, Tilaoui M, Mouse HA. Comparative study of the antitumor effect of natural monoterpenes: relationship to cell cycle analysis. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2012;22(3):534–40.
14. Yin QH, Yan FX, Zu XY, Wu YH, Wu XP, Liao MC, Deng SW, Yin LL, Zhuang YZ. Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. *Cytotechnology*. 2012;64(1):43–51.
15. Shin S-Y, Kim J-H, Kho K-H, Lee M. Anti-inflammatory and anti-oxidative activities of lemon myrtle (*Backhousia citriodora*) leaf extract. *Toxicol Rep*. 2020;7:277–81.

16. Kang E-J, Lee J-K, Park H-R, Kim H, Kim H-S, Park J. Antioxidant and anti-inflammatory activities of phenolic compounds extracted from lemon myrtle (*Backhousia citriodora*) leaves at various extraction conditions. *Food Sci Biotechnol*. 2020;20(10):1425–32. <https://doi.org/10.1007/s10068-020-00795-7>.
17. Emmanuel Janaka Rochana Rupesinghe, Andrew Jones, Ross Andrew Shalliker, Sercan Pravadali-Cekic. A rapid screening analysis of antioxidant compounds in native Australian food plants using multiplexed detection with active flow technology columns. *Molecules*. 2016;21,118. <https://doi.org/10.3390/molecules21010118>.
18. Guo Yu, Sakulnarmrat K, Konczak I. Anti-inflammatory potential of native Australian herbs polyphenols. *Toxicol Rep*. 2014;1:385–90.
19. Sakulnarmrat K, Fenech M, Thomas P, Konczak I. Cytoprotective and pro-apoptotic activities of native Australian herbs polyphenolic-rich extracts. *Food Chem*. 2013;136(1):9–17.
20. Viktorová J, Stupák M, Řehořová K, Dobiasová S, Hoang L, Hajšlová J, Thanh TV, Tri LV, Tuan NV, Ruml T. Lemongrass essential oil does not modulate cancer cells multidrug resistance by Citral-Its dominant and strongly antimicrobial compound. *Foods*. 2020;9(5):585. <https://doi.org/10.3390/foods9050585>.
21. Mukarram M, Choudhary S, Khan MA, Poltronieri P, Khan MMA, Ali J, Kurjak D, Shahid M. Lemongrass essential oil components with antimicrobial and anticancer activities. *Antioxidants (Basel)*. 2021;11(1):20. <https://doi.org/10.3390/antiox11010020>.
22. Van HTK, Quy NM, Ha DTV, et al. Chemical composition and cytotoxic activity of the essential oils of *Cymbopogon citratus* L. grown in Phu Tho province. *Vietnam Journal of Biotechnology*. 2018;14(4):683–7.
23. Trang DT, Hoang TKV, Nguyen TTM, Van Cuong P, Dang NH, Dang HD, Nguyen Quang T, Dat NT. Essential oils of Lemongrass (*Cymbopogon citratus* stapf) induces apoptosis and cell cycle arrest in A549 lung cancer cells. *Biomed Res Int*. 2020;2020:5924856. <https://doi.org/10.1155/2020/5924856>.
24. Miraj S, Rafieian-Kopaei, Kiani S. *Melissa officinalis* L: A review study with an antioxidant prospective. *J Evid Based Complementary Altern Med*. 2017;22(3):385–394. <https://doi.org/10.1177/2156587216663433>.
25. Araj-Khodaie M, Noorbala AA, Yarani R, Emadi F, Emaratkar E, Faghilzadeh S, Parsian Z, Alijaniha F, Kamalinejad M, Naseri M. A comparative study of *Melissa officinalis* leaves and stems ethanolic extracts in terms of antioxidant, cytotoxic, and antiproliferative potential. *BMC Complement Med Ther*. 2020;20(1):207. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-03003-5>.
26. Ramanauskienė K, Raudonis R, Majiene D. Rosemarinic acid and *Melissa officinalis* extracts differently affect glioblastoma cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:1564257. <https://doi.org/10.1155/2016/1564257>.
27. Mouhid L, Gómez de Cedrón M, Vargas T, García-Carrascosa E, Herranz N, García-Risco M, Reglero G, Fornari T, Ramírez de Molina A. Identification of antitumor agents against human pancreatic cancer from Asteraceae and Lamiaceae plant extracts. *BMC Complement Altern Med*. 2018;18(1):254. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2322-6>.
28. Encalada MA, Hoyos KM, Rehecho S, Berasategi I, de Ciriano MG, Ansorena D, Astiasarán I, Navarro-Blasco I, Cavero RY, Calvo ML. Antiproliferative effect of *Melissa officinalis* on human cancer cell line. *Plant Foods Hum Nutr*. 2011;66(4):328–34. <https://doi.org/10.1007/s11130-011-0256-y>.
29. Kong DG, Zhao Y, Li GH, Chen BJ, Wang XN, Zhou HL, Lou HX, Ren DM, Shen T. The genus *Litsea* in traditional Chinese medicine: an ethnomedical, phytochemical and pharmacological review. *J Ethnopharmacol*. 2015;164:256–64. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.02.020>.
30. Su YC, Hsu KP, Wang EI, Ho CL. Compositions and in vitro anticancer activities of the leaf and fruit oils of *Litsea cubeba* from Taiwan. *Nat Prod Commun*. 2013;8(4):531–2.
31. Zhang W, Hu JF, Lv WW, Zhao QC, Shi GB. Antibacterial, antifungal and cytotoxic isoquinolinealkaloids from *Litsea cubeba*. *Molecules*. 2012;Nov 1;17(11):12950–60. <https://doi.org/10.3390/molecules171112950>.
32. Yu BB, Dong SY, Yu ML, Jiang GJ, Ji J, Tong XH. Total flavonoids of *Litsea Coreana* enhance the cytotoxicity of oxaliplatin by Increasing Gap junction intercellular communication. *Biol Pharm Bull*. 2014;37(8):1315–22. <https://doi.org/10.1248/bpb.b14-00193>.
33. Seal S, Chatterjee P, Bhattacharya S, Pal D, Dasgupta S, Kundu R, Mukherjee S, Bhattacharya S, Bhuyan M, Bhattacharyya PR, Baishya G, Barua NC, Baruah PK, Rao PG, Bhattacharya. Vapor of volatile oils from *Litsea cubeba* seed induces apoptosis and causes cycle arrest in lung cancer cells. *PLoS One*. 2012;7(10):e47014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047014>.
34. Nigjeh SE, Yeap SK, Nordin N, Rahman H, Rosli R. In vivo antitumor effects of Citral on 4T1 breast cancer cells via induction of apoptosis and downregulation of aldehyde dehydrogenase activity. *Molecules*. 2019;24(18):3241. <https://doi.org/10.3390/molecules24183241>.
35. Balusamy SR, Ramani S, Natarajan S, Kim YJ, Perumalsamy H. Integrated transcriptome and in vitro analysis revealed anti-proliferative effect of citral in humn stomach cancer through apoptosis. *Sci Rep*. 2019;9(1):4883. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41406-8>.
36. Balusamy SR, Perumalsamy H, Veerappan K, Huq MA, Rajeshkumar S, Lakshmi T, Kim YJ. Citral induced apoptosis through modulation of key genes involved in fatty acid biosynthesis in human prostate cancer cells: In silico and in vitro study. *Biomed Res Int*. 2020;6040727. <https://doi.org/10.1155/2020/6040727>.
37. Liu Y, Whelan RJ, Pattnaik BR, Ludwig K, Subudhi E, Rowland H, Claussen N, Zucker N, Uppal S, Kushner DM, Felder M, Patankar MS, Kapur A. Terpenoids from *Zingiber officinale* (Ginger) induce apoptosis in endometrial cancer cells through the activation of p53. *PLoS ONE*. 2012;7(12):e53178. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053178>.
38. Sheikh BY, Sarker MMR, Kamarudin MNA, Mohan G. Antiproliferative and apoptosis inducing effects of citral via p53 and ROS-induced mitochondrial-mediated apoptosis in human colorectal HCT115 and HT29 cell lines. *Biomed Pharmacother*. 2017;96:834–46. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.038>.
39. Nigjeh SE, Yeap SK, Nordin N, Kamalideghan B, Ky H, Rosli R. Citral induced apoptosis in MDA-MB-231 spheroid cells. *BMC Complement Altern Med*. 2018;18(1):56. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2115-y>.
40. Thomas ML, de Antueno R, Coyle KM, Sultan M, Cruickshank BM, Giacomantonio MA, Giacomantonio CA, Duncan R, Marcato P. Citral reduces breast tumor growth by inhibiting the cancer stem cell marker ALDH1A3. *Mol Oncol*. 2016;Nov;10(9):1485–96. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2016.08.004>.
41. Cravotto G, Binello A, Baranelli E, Carraro P, Trotta F. Cyclodextrins as food additives and in food processing. *Curr Nutr Food Sci*. 2006;2(4):343–50.
42. Nordin N, Yeap SK, Rahman HS, Zamberi NR, Mohamad NE, Abu N, Masarudin MJ, Abdullah R, Alitheen NB. Antitumor and anti-metastatic effects of Citral-loaded nanostructured lipid carrier in 4T1-induced breast cancer mouse model. *Molecules*. 2020;25(11):2670. <https://doi.org/10.3390/molecules25112670>.
43. Nordin N, Yeap SK, Rahman HS, Zamberi NR, Abu N, Mohamad NE, How CW, Masarudin MJ, Abdullah R, Alitheen NB. In vitro cytotoxicity and anticancer effects of citral nanostructured lipid carrier on MDA MBA-231 human breast cancer cells. *Sci Rep*. 2019;9(1):1614. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38214-x>.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.