

Phytothérapie

Effet d'un extrait terpénique de gingembre sur la prolifération et le stress oxydatif des cellules du carcinome épidermoïde laryngé humain Hep2 et des fibroblastes aortiques sains de *Rattus norvegicus*, *in vitro*

Effect of a ginger terpen extract on the proliferation and oxidative stress of human laryngeal squamous carcinoma cell Hep 2 and healthy aortic fibroblasts of *Rattus norvegicus*, *in vitro*

Amina OTSMANE^{1*}, Houda BENCHEIKH¹, Yasmina BENZAOUZ², Lynda BOUDARENE³, Souhila AOUICHAT-BOUGUERRA¹

¹Equipe de Physiopathologie Cellulaire et Moléculaire. Faculté de Biologie. USTHB-Alger.

²Equipe de Biochimie de la Matrice Extracellulaire. Faculté de Biologie. USTHB-Alger

³Laboratoire d'Analyse Organique et Fonctionnelle. Faculté de Chimie. USTHB-Alger.

Reçu le 06 Mars 2015, Révisé le 31 Mars 2015, Accepté le 16 Mai 2015

*Auteur correspondant : otsmane.amina@yahoo.fr

Résumé Introduction. Le cancer est devenu émergent dans le monde, étant donné le taux de mortalité de plus en plus important. Devant cette augmentation croissante, les pistes de recherche liées au cancer se sont multipliées. **Objectifs.** Une étude *in vitro* est menée sur des cellules du carcinome épidermoïde laryngé humain : Hep 2 et sur des fibroblastes sains de *Rattus norvegicus* afin d'évaluer l'effet d'un extrait terpénique de gingembre sur la prolifération et l'oxydation cellulaire. **Matériel et méthodes.** La culture cellulaire des Hep 2 et des fibroblastes aortiques sains, en présence et en absence de la concentration efficace CE50 de gingembre a permis d'évaluer l'effet de ce dernier sur la prolifération par comptage cellulaire ; d'analyser son effet sur le stress oxydant par dosage du malondialdéhyde (MDA) dans les compartiments intra- et extracellulaires et d'examiner les modifications morphologiques qu'il provoque. **Résultats.** L'extrait terpénique induit une diminution significative de 62% du taux de prolifération des Hep 2 ainsi qu'une augmentation non significative du taux de MDA dans leur compartiment extracellulaire (37%) et une augmentation du taux de MDA dans leur compartiment intracellulaire (37%) et une augmentation du taux de MDA

dans leur compartiment intracellulaire (81%). L'examen morphologique montre des signes d'apoptose des Hep2, sous l'effet de l'extrait terpénique. En revanche, ce dernier induit peu de variations de la prolifération (9%) des fibroblastes aortiques sains ainsi qu'une oncose et une peroxydation lipidique modérée. **Conclusion.** Cette étude révèle que l'extrait terpénique du gingembre possède un effet cytotoxique, antiprolifératif et pro-apoptotique.

Mots Clés : *Cellules du carcinome épidermoïde laryngé humain Hep2, Fibroblastes aortiques, Gingembre, Terpène, Prolifération, Oxydation cellulaire, Apoptose*

Abstract Introduction. Cancer has become increasingly significant with high death rates around the world. Cancer research studies have increased proportionally. **Objectives.** An *in vitro* study was conducted on human laryngeal squamous carcinoma cells Hep 2 and healthy aortic fibroblasts of *Rattus norvegicus*, in order to evaluate the effect of ginger terpenic extract on cell proliferation and oxidation. **Materials and Methods.** Cell culture of Hep 2 and healthy aortic fibroblasts, in the absence and presence of the efficient concentration EC 50 of terpenic extract, allowed to evaluate its effect on proliferation by cell counting; to analyse its effect on oxidative stress by Malondialdehyde (MDA) determination in both intracellular and extracellular compartments and to examine the morphological changes produced. **Results.** The terpenic extract induced a significant decrease (-62%) in Hep2 proliferation rate, a non-significant increase in MDA rate in extracellular compartment (+37%) and an increase in MDA rate in intracellular compartment (+81%). The morphological exam showed signs of Hep2 apoptosis under the effect of terpenic extract. In contrast, it induced little changes in the proliferation (9%) of healthy aortic fibroblasts and a moderate lipid peroxidation. **Conclusion.** This study shows that the terpenic extract from ginger has cytotoxic, anti-proliferative and pro-apoptotic effects.

Keywords: *Human laryngeal squamous cell carcinoma Hep 2, Aortic fibroblasts, Ginger, Terpen, Proliferation, Cell oxidation, Apoptosis*

Introduction

Le stress oxydatif qui est le déséquilibre de la balance pro-oxydants/antioxydants, est impliqué dans de nombreux processus, aussi bien physiologiques, tel que le vieillissement [1], que pathologiques, tels que les maladies neuro-dégénératives [2]; l'athérosclérose [3]; l'accident vasculaire cérébral (AVC) [4] et le cancer [5]. Dans le cas de ce dernier, le stress oxydatif est incriminé dans l'installation de différents types de cancers [5], et ce au cours des différentes phases de la cancérogenèse, essentiellement au cours de

l'initiation [6]. Les cellules cancéreuses, issues de la transformation cellulaire de certaines cellules initialement normales, acquièrent de nouveaux caractères, entre autre, l'exacerbation de la prolifération. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le cancer est devenu une des causes majeures de décès dans le monde, avec 8,2 millions de décès en 2012 [7]. En Algérie, le cancer occupe la 2^{ème} position, après la pathologie cardiovasculaire dans la morbidité générale [8]. Face à ces chiffres inquiétants, de nombreuses approches préventives et thérapeutiques sont établies, notamment la chimiothérapie, la

radiothérapie, mais aussi l'usage des composés naturels.

Dans ce cadre, l'intérêt de cette étude est d'évaluer l'influence d'une phytothérapie à base d'extrait terpénique issu du gingembre, sur la prolifération et l'oxydation des cellules du carcinome épidermoïde laryngé humain Hep2, comparées aux fibroblastes aortiques sains de *Rattus norvegicus*.

Matériel et Méthodes

Matériel Biologique et extrait végétal

L'étude est réalisée *in vitro* sur des cellules du carcinome épidermoïde laryngé humain de la lignée Hep 2, comme modèle de cellules cancéreuses. Leur utilisation est faite selon les règles dictées par des responsables d'éthique sur le plan international, entre autre, un représentant de l'institut Pasteur de Paris. Des fibroblastes aortiques de jeunes femelles *Rattus norvegicus*, avec un poids moyen de 200 g, sont utilisés comme modèle de cellules non tumorales. Plusieurs lots de cellules ont été constitués : les lots de cellules cancéreuses et non cancéreuses incubées en présence et en absence de l'extrait terpénique issu du gingembre, dont la dose utilisée correspond à la concentration efficace CE50.

Méthodes

Analyses biologiques

Le gingembre a été traité au laboratoire d'Analyse Organique et Fonctionnelle de la Faculté de Chimie de l'USTHB. Le potentiel antioxydant de l'extrait terpénique est déterminé par la méthode d'hydrodistillation. La concentration efficace CE50 est déterminée par la méthode du DPPH (1,1 Diphényl 2 Pycril Hydrazil) qui repose sur la réaction entre le DPPH qui est un radical libre stable de couleur violette intense et l'extrait terpénique de gingembre. La réaction aboutit à la formation d'un composé réduit le Diphényl Pycril Hydrazine, de couleur jaune et dont l'intensité est inversement proportionnelle à la capacité réductrice du composé à tester [9]. La culture cellulaire des Hep2 et des fibroblastes aortiques sains à leur 6^{ème} passage, en présence et en

absence de l'extrait terpénique est réalisée dans des plaques multi-puits (avec une population initiales de $3,4 \times 10^5$ cellules/puits) dans un milieu complet de Roswell Park Memorial Institute RPMI (Sigma) supplémenté avec 10% de Sérum de veau foetal (SVF), comme source de facteurs mitogènes, (Sigma) ; 1% d'antibiotiques (Gibco) et 1,2% de glutamine (Gibco). Les différents lots de cellules sont mis en culture dans un incubateur à CO₂ (Mettler), dans des conditions bien déterminées (5% CO₂ ; 95% O₂ ; 90% d'humidité et une température de 37°C pendant 72 heures). La culture cellulaire a permis de réaliser différents tests.

Etude de la prolifération

L'effet de l'extrait terpénique sur la prolifération est évalué par comptage cellulaire. Après 72h d'incubation, 48h en présence de SVF et 24 h en absence de SVF, le milieu est éliminé et les cellules sont rincées au PBS 1X (Tampon phosphate salin, Gibco) puis soumises à l'action de la trypsine 0,1% (Merck) afin de détacher les cellules et obtenir une suspension cellulaire. Cent µL de chaque suspension cellulaire sont comptés sur cellule de Mallassez, sous microscope inversé (Zeiss), et ce en présence de bleu de trypan 0,2% (colorant d'exclusion qui permet d'évaluer la viabilité cellulaire en donnant une couleur bleue aux cellules mortes). Le taux de prolifération est exprimé en millions de cellules par mL de milieu, après avoir effectué la moyenne des cellules comptées sur la cellule de Mallassez (Fig. 1).

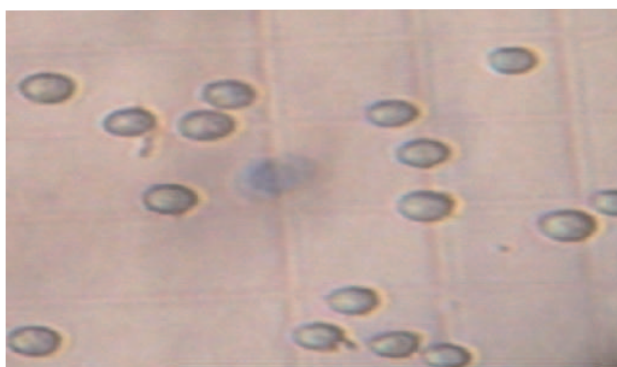


Fig 1. Aspect des cellules Hep 2 non traitées lors du comptage en présence de bleu de trypan, sous microscope inversé.

Evaluation de la peroxydation lipidique

L'effet de l'extrait terpénique sur le stress oxydant

des cellules cancéreuses Hep2 est déterminé par le dosage du malondialdéhyde (MDA), produit final compartiments intracellulaires et extracellulaires des cellules Hep 2 et fibroblastes, incubées en présence et en absence de l'extrait terpénique. Ce dosage est une mesure indirecte du stress oxydatif qui consiste à évaluer le taux de MDA réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBA). Après 72h d'incubation, les milieux contenus dans les flasks, correspondant aux compartiments extracellulaires, sont récupérés directement, alors que les compartiments intracellulaires correspondant aux tapis cellulaires sont récupérés par grattage en présence de RPMI. Les cellules sont lysées à l'aide du tampon de lyse à pH 6,6 constitué de Tris HCl à 0,1 M et de Triton à 1%. Après centrifugation à 4400 x g pendant 30 min à 4°C, l'acide trichloracétique (TCA) est ajouté afin de précipiter les protéines, suivi du TBA aboutissant à la formation de substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) (Fig. 2).

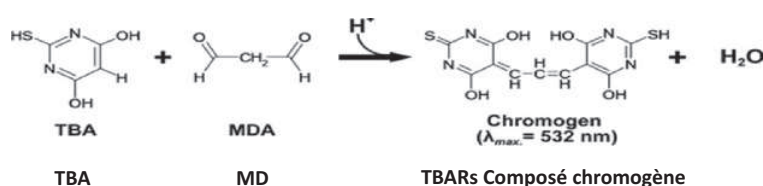


Fig. 2. Principe de l'action du TBA avec le MDA

Cette opération est suivie d'une homogénéisation, d'une ébullition pendant 15min et d'un refroidissement dans de la glace pendant 5min puis d'une 2^{ème} centrifugation à 4400 x g pendant 30 min à 4°C. Une lecture de la densité optique, proportionnelle à la couleur rose des TBARS est effectuée par spectrophotométrie à 532 nm. Les quantités de MDA sont évaluées à partir d'une courbe étalon réalisée à partir d'une solution mère de MDA à 25 µM.

Etude morphologique

Après 72 h d'incubation, les milieux des cellules Hep2 incubées en présence et en absence de l'extrait terpénique sont éliminés et les tapis cellulaires sont mis en contact avec une quantité suffisante de fixateur, le Bouin aqueux, pendant 30 min suivi d'un rinçage au PBS 1 X, afin d'en éliminer l'excès, puis colorés avec le May-Grunwald-Giemsa (MGG). L'observation est réalisée sous microscope inversé.

Effets de l'extrait terpénique sur les fibroblastes aortiques sains

La CE50 de l'extrait terpénique de gingembre est administrée à des cultures de fibroblastes aortiques sains de *Rattus norvegicus*, incubés pendant 72h, en présence de SVF et 24h en absence de SVF, afin d'analyser l'effet de l'extrait sur la prolifération et l'oxydation cellulaire des cellules saines, en comparaison avec les cellules cancéreuses.

Analyse statistique

Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± erreur standard. La comparaison de deux moyennes est réalisée par le test de Student. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

Résultats

Etude de la prolifération

L'extrait terpénique induit une diminution ($P < 0,0001$) du taux de prolifération des Hep2 ($1,771 \pm 0,175 \times 10^6$ cellules en absence de l'extrait terpénique vs $0,68 \pm 0,175 \times 10^6$ cellules en présence de l'extrait terpénique) (Fig. 3).

Taux de prolifération (10^6 cellules)

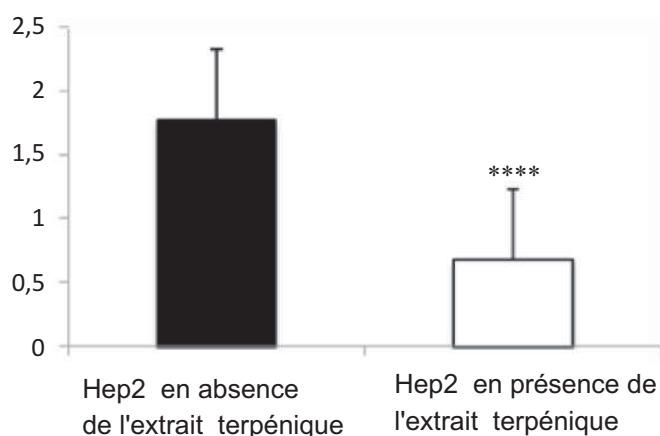


Fig. 3. Taux de prolifération des Hep2, en absence et en présence de l'extrait terpénique après une incubation de 72 h (10^6 cellules/mL).

**** $P < 0,0001$: Hep2 en présence de l'extrait terpénique vs Hep2 en absence de l'extrait terpénique.

Etude de la peroxydation lipidique

Dans le compartiment extracellulaire des Hep2, l'extrait terpénique du gingembre induit une augmentation non significative du taux de MDA ($0,112 \pm 0,009$ µmol MDA/ 10^6 cellules pour les

Hep2 en absence de l'extrait terpénique vs $0,177 \pm 0,026 \mu\text{mol MDA}/10^6$ cellules pour les Hep2 en présence de l'extrait terpénique) (Fig. 4).

Taux de MDA ($\mu\text{mol}/10^6$ cellules)

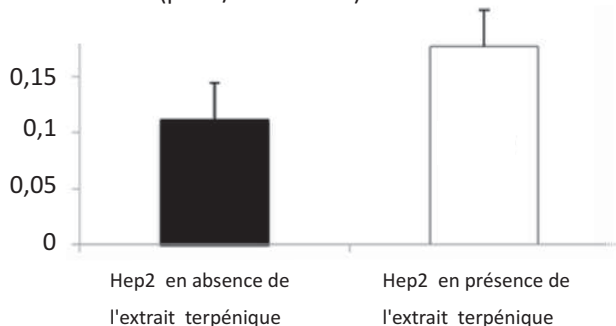


Fig. 4. Taux de MDA dans le compartiment extracellulaire des Hep2 en absence et en présence de l'extrait terpénique de gingembre après une incubation de 72h ($\mu\text{mole}/10^6$ cellules)

En revanche, une augmentation hautement significative du taux de MDA est provoquée par l'extrait terpénique dans le compartiment intracellulaire des Hep2 ($0,156 \pm 0,01 \mu\text{mol MDA}/10^6$ cellules pour les Hep 2 en absence de l'extrait terpénique vs $0,822 \pm 0,063 \mu\text{mol MDA}/10^6$ cellules pour les Hep 2 en présence de l'extrait terpénique) (Fig. 5).

Taux de MDA ($\mu\text{mol}/10^6$ cellules)

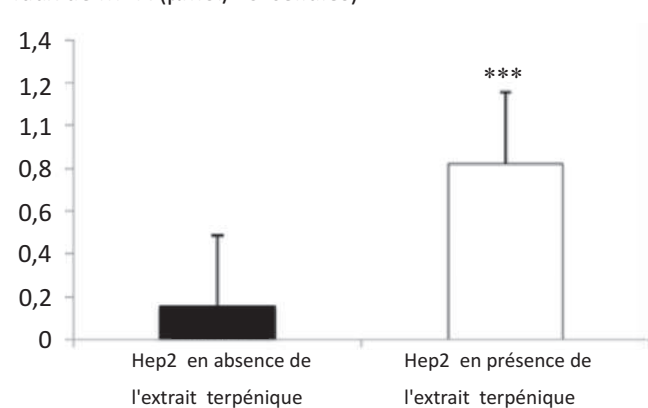


Fig. 5. Taux de MDA dans le compartiment intracellulaire des Hep2 en absence et en présence de l'extrait terpénique de gingembre après une incubation de 72 h ($\mu\text{mole}/10^6$ cellules)

*** $P < 0,001$: Hep2 en présence de l'extrait terpénique vs Hep2 en absence de l'extrait terpénique

Etude morphologique

L'analyse de l'aspect cellulaire des Hep2, incubées en présence de l'extrait terpénique, montre que ce dernier induit des modifications morphologiques, en relation avec le processus apoptotique qui se

manifeste par la condensation de la chromatine contre l'enveloppe nucléaire (ce qui donne l'aspect dense à la région périnucléaire), l'oncose ou la vacuolisation cytoplasmique, la fragmentation du noyau, le bourgeonnement et l'irrégularité membranaire ainsi que l'hypertrophie cellulaire (Fig. 6). Ces modifications morphologiques sont associées à une diminution de la densité cellulaire en comparaison avec les Hep2 incubées en absence de l'extrait terpénique qui se caractérisent par une densité cellulaire élevée, une forme variable, un cytoplasme dense et une division cellulaire active (Fig. 7).

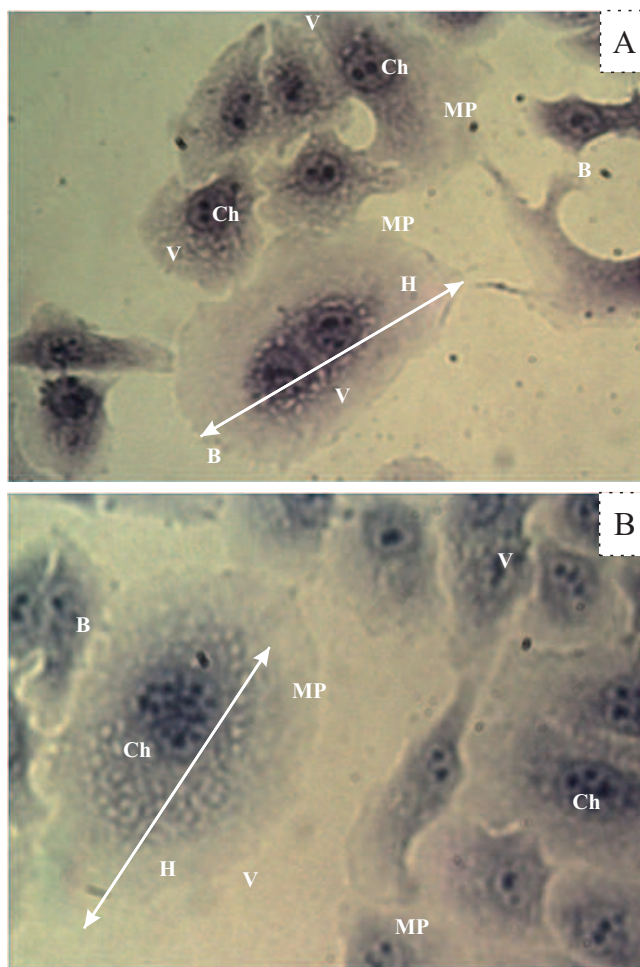


Fig. 6 (A, B). Aspect cellulaire des Hep2 incubées en présence d'extrait terpénique du gingembre CE50= $582,26 \text{ mg. L}^{-1}$

Ch : condensation de la chromatine d'où l'aspect dense de la membrane nucléaire, H : hypertrophie cellulaire, MP : irrégularité de la membrane, V : vacuolisation (oncose), B : Bourgeonnement membranaire). Incubation pendant 72 h, fixation au Bouin aqueux, coloration au MGG. Observation sous microscope inversé Gx192.

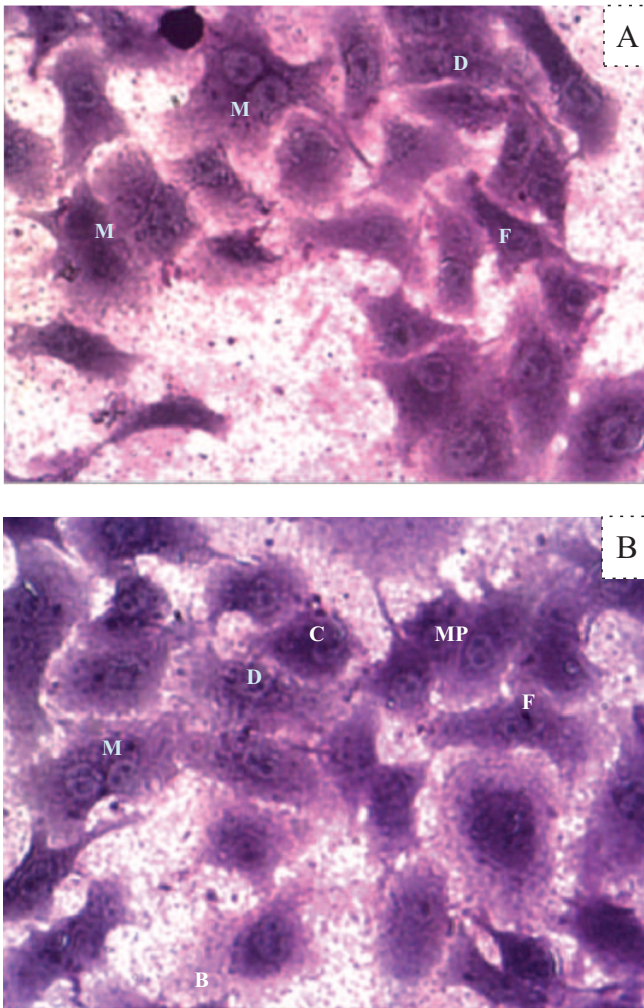


Fig.7 (A, B). Aspect cellulaire des Hep2 incubées en absence de l'extrait terpénique, dans du milieu complet
M: division cellulaire active, D: densité cellulaire élevée, C: cytoplasme dense, F: forme variable.
 Incubation pendant 72 h, fixation au Bouin aqueux, coloration au MGG, observation sous microscope inversé Gx168.

Effets de l'extrait terpénique sur les fibroblastes aortiques sains

Etude de la prolifération

L'extrait terpénique induit peu de variations du taux de prolifération des fibroblastes aortiques sains incubés en présence de l'extrait terpénique ($0,43 \pm 0,021 \times 10^6$ cellules) comparés aux témoins incubés en absence de l'extrait terpénique ($0,475 \pm 0,006 \times 10^6$ cellules) (Fig. 8).

Etude de la peroxydation lipidique

Une diminution du taux de MDA ($P < 0,001$) est notée dans le compartiment extracellulaire des fibroblastes incubés en présence de l'extrait terpénique ($0,592 \pm 0,282 \mu\text{mol MDA}/10^6$ cellules) par rapport aux témoins correspondants ($0,127 \pm 0,025 \mu\text{mol MDA}/10^6$ cellules) (Fig. 9).

Taux de prolifération (10^6 cellules)

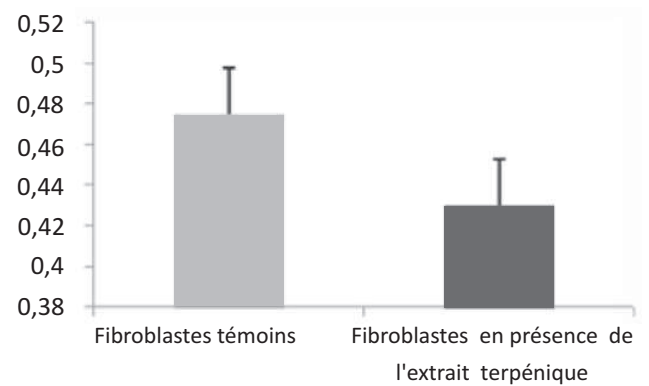


Fig. 8. Evaluation du taux de prolifération des fibroblastes en présence et en absence de l'extrait terpénique du gingembre incubés pendant 72 h (10^6 cellules)

Taux de MDA ($\mu\text{mol}/10^6$ cellules)

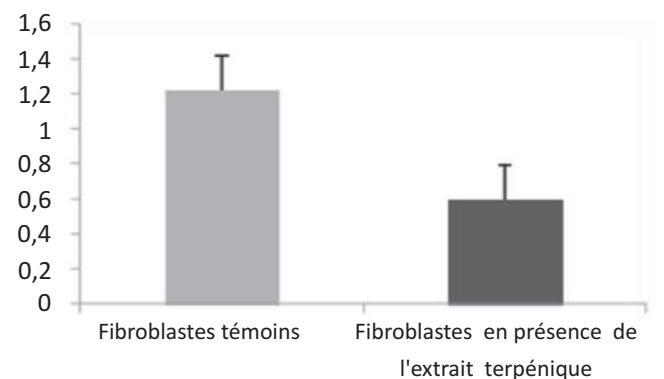


Fig. 9. Evaluation du taux de MDA dans le compartiment extracellulaire des fibroblastes en présence et en absence de l'extrait terpénique de gingembre incubés pendant 72 h ($\mu\text{mole}/10^6$ cellules)

*** $P < 0,001$: fibroblastes traités par l'extrait terpénique du gingembre vs fibroblastes témoins

En revanche, une augmentation significative du taux de MDA est notée dans le compartiment intracellulaire des fibroblastes incubés en présence de l'extrait terpénique ($1,955 \pm 0,6 \mu\text{mol MDA}/10^6$ cellules) par rapport aux témoins correspondants ($0,128 \pm 0,025 \mu\text{mol MDA}/10^6$ cellules) (Fig. 10).

Etude morphologique

L'incubation des fibroblastes en présence de l'extrait terpénique induit peu de modifications morphologiques sauf la présence de quelques vacuoles oncotiques, comparativement aux fibroblastes témoins incubés en absence de l'extrait terpénique (Fig. 11).

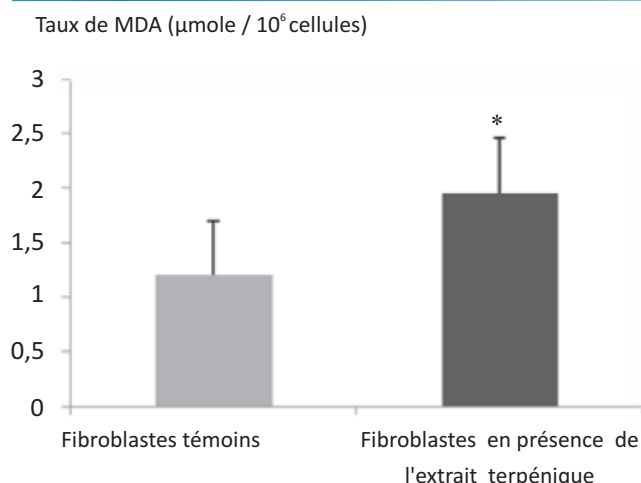


Fig. 10. Evaluation du taux de MDA dans le compartiment intracellulaire des fibroblastes en présence et en absence de l'extrait terpénique de gingembre incubés pendant 72 h ($\mu\text{mole}/10^6 \text{cellules}$)

* $P < 0,05$: fibroblastes traités par l'extrait terpénique du gingembre vs fibroblastes témoins

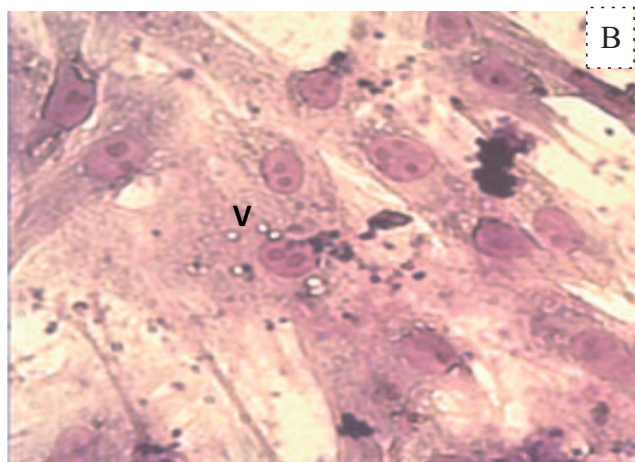
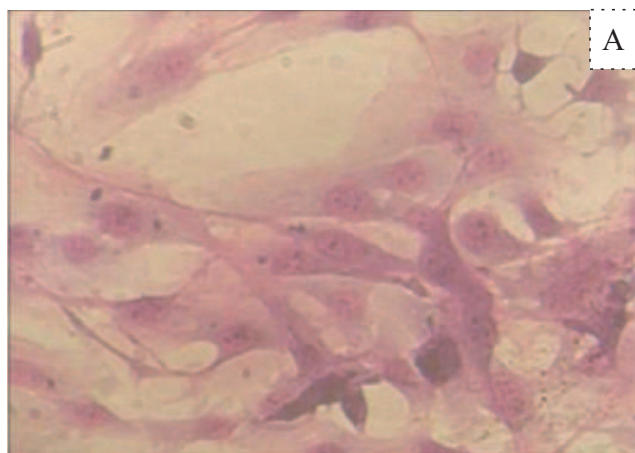


Fig. 11. Aspect cellulaire des fibroblastes incubés dans du milieu complet

A : en absence de l'extrait terpénique $G \times 180$, B : en présence de l'extrait terpénique $G \times 192$. V : légère oncoses. Incubation pendant 72 h, fixation au Bouin Aqueux, coloration au MGG, observation sous microscope inversé.

Discussion

L'administration de l'extrait terpénique du gingembre aux cultures de Hep2 induit une diminution du taux de prolifération, et ce en accord avec d'autres études qui ont montré un effet antiprolifératif des terpènes. En effet, Greay *et al.* [10] révèlent que le monoterpène Perillyl alcohol possède un effet antiprolifératif sur plusieurs lignées tumorales *in vitro*, traduit par l'inhibition de la protéine G monomérique Ras, l'arrêt du cycle cellulaire en G1 et l'induction de l'apoptose, d'une manière dose et temps dépendante. Yuri *et al.* [11] observent également que ce même terpène induit l'arrêt du cycle cellulaire en G1, en inhibant la cycline D1 et la cycline E et en surexprimant la P21. Noori *et al.* [12] montrent que le sesquiterpène Tehranolide diminue significativement la prolifération des cellules du cancer du sein humain (MCF-7) via l'induction de l'apoptose médiée par les espèces réactives de l'oxygène (ROS), le maintien des cellules en phase G1 et l'altération de la voie PI3K/Akt induisant ainsi la suractivation de P27 inhibiteur du complexe cycline E/CDK2 d'une part, et en diminuant l'expression des protéines cycline D1 et CDK4, d'autre part. Tao *et al.* [13] suggèrent que la combinaison de l'élémane (monoterpène) avec le cisplatine (médicament anticancéreux) a un effet antiprolifératif remarquable sur les Hep2 *in vitro* et *in vivo*.

L'augmentation du taux de MDA dans le compartiment extracellulaire des Hep2, en présence de l'extrait terpénique suggère que ce dernier induit l'altération de la membrane cellulaire avec modification de sa perméabilité et de sa sélectivité [14]. Par ailleurs, l'augmentation du taux de MDA dans le compartiment intracellulaire des Hep2, sous l'effet de l'extrait terpénique, peut être expliquée par l'oxydation des lipides cellulaires due à la production excessive des ROS, en réponse au traitement terpénique. Certains auteurs suggèrent que le traitement des cellules cancéreuses MCF-7 par le sesquiterpène Tehranolide peut induire une augmentation de la production de ROS intracellulaires [12].

L'hypertrophie cellulaire des Hep2, incubées en présence de l'extrait terpénique peut être considérée comme une adaptation des cellules

cancéreuses au stress oxydant causé par l'extrait terpénique, alors que l'irrégularité membranaire serait due à la modification de la structure membranaire. Ces résultats sont en accord avec l'étude de *Catală* [14] qui montre que l'attaque oxydative des lipides membranaires fait perdre la structure mosaïque fluide de la membrane ainsi que sa fonction de barrière sélective. D'autre part, des changements morphologiques associés à l'apoptose sont observés sur les cultures cellulaires de MCF-7 traitées par le sesquiterpène Tehranolide, notamment la condensation de la chromatine, le changement de la surface cellulaire, la formation des corps apoptotiques et la fragmentation de l'ADN, de manière dose et temps dépendante [12]. Ce même terpène induit l'apoptose, non pas *via* la voie des récepteurs de la mort (voie extrinsèque), mais par la voie mitochondriale (voie intrinsèque), médiée par les ROS produites en excès dans les MCF-7 traitées, la mitochondrie étant une source essentielle des ROS, mais aussi leur cible. En effet, les ROS sont impliquées dans l'apoptose de différentes manières, soit en induisant directement ou indirectement la libération du cytochrome C *via* l'ouverture des pores de transition de perméabilité (PTP), ou en modulant l'expression des protéines de la famille Bcl-2 en surexprimant la protéine pro-apoptotique Bax et en réprimant la protéine anti-apoptotique Bcl-2, ou encore en activant les caspases 3 et 9 impliquées dans la voie apoptotique caspase-dépendante [12].

L'administration de l'extrait terpénique au milieu des fibroblastes aortiques induit une légère peroxydation lipidique qui n'altère pas les membranes cellulaires, alors que sur le plan morphologique, il n'induit pas de modifications sauf une légère oncose dans le cytoplasme qui peut être liée à la dose du traitement. Plusieurs études ont montré que l'action des terpènes est dose et temps dépendante [10,12-13]. Il a été noté que les terpènes n'exercent pas leur effet antiprolifératif sur les cellules saines, cela s'observe dans l'étude de *Rabi et al.* [15] qui indique que le monoterpène D-limonène n'est pas toxique sur les cellules normales de l'épithélium prostatique, tout en étant toxique sur les cellules tumorales de la prostate.

Conclusion

L'extrait terpénique, analysé dans cette étude, possède *in vitro* un effet cytotoxique, antiprolifératif et pro apoptotique dans les cellules du carcinome épidermoïde laryngé humain Hep2, alors que dans les fibroblastes aortiques sains de *Rattus norvegicus*, il induit une légère oncose et une peroxydation lipidique modérée n'altérant pas les membranes cellulaires. Les résultats obtenus en ce qui concerne le rôle crucial des extraits végétaux dans la thérapie anticancéreuse laisse espérer un élargissement du spectre d'utilisation des éléments naturels dans l'alimentation ou comme additifs alimentaires dans la prévention antioxydante de différentes pathologies notamment le cancer.

Conflits d'intérêts

Aucun conflit d'intérêt en relation avec cette étude.

Références

1. Barouki R. Stress oxydant et vieillissement. *Médecine Sciences* 2006; 22: 266-72.
2. Moreira PI., Nunomura A., Nakamura M., Takeda A., Shenk JC., Aliev G. *et al.* Nucleic acid oxidation in Alzheimer disease. *Free Radical Biol Medicine* 2008; 44:1493-05.
3. Madamanchi NR., Tchivilev I., Runge MS. Genetic Markers of Oxidative Stress and Coronary Atherosclerosis. *Cur Atheroscler Rep* 2006; 8:177-83.
4. Moro MA., Almeida A., Bolaños JP., Lizasoain I. Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. *Free Radical Biol Medicine* 2005; 39: 1291-304.
5. Kryston TB., Georgiev AB., Pissis P., Georgakilasag AB. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Res* 2011; 711:193-101.
6. Reuter S., Gupta SC., Chaturvedi MM., Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biol Medicine* 2010; 49:1603-16.
7. World Cancer Report 2014, IARC.

8. Djedi H., Bouzid K. Les cancers en Algérie. *Médecine Plus* 2012; 22:25-8.
9. Gaikwad P., Barik A., Priyadarsini KI., Rao BSM. Antioxidant activities of phenols in different solvents using DPPH assay. *Res Chem Intermed* 2010; 36:1065-72.
10. Greay SJ., Ireland DJ., Kissick HT., Levy A., Beilharz MW., Riley TV., Carson CF. Induction of necrosis and cell cycle arrest in murine cancer cell lines by *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and terpinen-4-ol. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 65:877-88.
11. Yuri T., Danbara N., Tsujita-Kyutoku M., Kiyozuka Y., Senzaki H., Shikata N. *et al.* Perillyl alcohol inhibits human breast cancer cell growth in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 84:251–60.
12. Noori S., Hassan ZM. Tehranolide inhibits proliferation of MCF-7 human breast cancer cells by inducing G0/G1 arrest and apoptosis. *Free Radical Biol Medicine* 2012; 2:1987-99.
13. Tao L., Zhou L., Zheng L., Yao M. Elemene displays anti-cancer ability on laryngeal cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 58:24-34.
14. Catalá A. Lipid peroxidation modifies the picture of membranes from the “Fluid Mosaic Model” to the “Lipid Whisker Model”. *Biochimie* 2011; 94:101-9.
15. Rabi T., Bishayee A. Terpenoids and breast cancer chemoprevention. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 115:223-39.