

TLEMCEN N° D'ORDRE



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE de TLEMCEN

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie



MEMOIRE

Présenté par

Mlle BRAHAMI Nassima

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Immunologie

Thème

Effets de la Thymoquinone sur l'induction d'apoptose et le stress oxydatif dans le cancer colorectal

Soutenu le 09 juillet 2017, devant le jury composé de :

Président Pr. Mourad ARIBI Professeur Université de Tlemcen

Encadreur **Dr. Sana TABET-HELAL Maître de conférences B Université de Tlemcen**

Examineur Dr. Ilhem BENYELLES Maître assistant Hospitalo-universitaire Université de Tlemcen



TLEMCEN N° D'ORDRE

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE de TLEMCEN

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie



MEMOIRE

Présenté par

Mlle BRAHAMI Nassima

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Immunologie

Thème

Effets de la Thymoquinone sur l'induction d'apoptose et le stress oxydatif dans le cancer colorectal

Soutenu le 09 juillet 2017, devant le jury composé de :

Président	Dr. Mourad ARIBI	Professeur	Université de Tlemcen
Encadreur	Dr. Sana TABET-HELAL	Maître de conférences B	Université de Tlemcen
Examineur	Dr. Ilhem BENYELLES	Maître assistant H-U	Université de Tlemcen

09 Juillet 2017

Résumé

Abstract

Ce mémoire de Master a été réalisé au sein du laboratoire Biologie Moléculaire Appliquée & Immunologie (BIOMOLIM)- Université Abou Bekr BELKAID-Tlemcen.

J'adresse tout d'abord mes vifs remerciements au Pr. Mourad ARIBI, directeur du laboratoire BIOMOLIM, qui m'a accueilli dans son laboratoire, qui m'a soutenu et conseillé durant mon Master et mes travaux de mémoire.

Je tiens à remercier très chaleureusement mon encadreur Dr. Sana TABET-HELAL, maître de conférences de classe B au département de Biologie- Université Abou Bekr BELKAID-Tlemcen, de nous avoir bien encadrées durant ces cinq derniers mois, pour ses efforts à veiller sur le bon déroulement des étapes de notre travail, pour sa bonté et sa disponibilité, son aide précieuse ainsi que sa contribution à la concrétisation de ce mémoire. Merci pour tout...

Je remercie également tous les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail et de me consacrer du temps.

Je remercie tous les membres du laboratoire BIOMOLIM, à savoir l'équipe de formation pour leur soutien, ainsi que tous les doctorants qui nous ont encouragés, en particulier Mr Zoheir DAHMANI et Mme Sara DAHOU.

Pour finir, je remercie ma chère amie et binôme Fatima Zohra BOUCHENAFa ainsi que tous mes collègues de la promotion de Master Immunologie, pour leur soutien et la bonne ambiance de travail durant ces deux années de master.

Je dédie ce mémoire

A mes chers parents, pour leur amour inestimable, leur confiance, leur soutien, leurs sacrifices et toutes les valeurs qu'ils m'ont inculqué.

A ma chère sœur et son mari pour leur présence permanente et leur soutien moral et leur disponibilité.

A mon cher frère et sa femme pour leurs encouragements.

A ma chère amie et binôme Fatima Zohra BOUCHENAFI pour les moments inoubliables qu'on a passé ensemble durant la préparation de notre projet.

A mes adorables neveux Younes, Karim et Nassim.

A tous mes camarades de la promotion de Master Immunologie.

A toute ma famille.

A tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à me remonter le moral et me soutenir dans les moments difficiles.

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux et le fruit de votre soutien infallible.

Merci d'être toujours là pour moi.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
ملخص	v
Avant-propos	vi
Tables des matières	viii
Liste des figures	x
Liste des abréviations	xi
Introduction générale	1
Chapitre 1. Revue de la littérature	3
1.1. Généralités sur le cancer	3
1.1.1. Définition	3
1.1.2. Immunité naturelle innée et adaptative et cancer	3
1.1.3. Immunoediting	3
1.2. Cancer colorectal	5
1.2.1. Origine et développement	5
1.2.2. Instabilités génomiques dans le cancer colorectal	5
1.3. Thymoquinone « <i>Nigella sativa</i> »	5
1.3.1. Propriétés chimiques	5
1.3.2. Phytochimie de la graine	6
1.3.3. Propriétés pharmacologiques de la TQ	7
1.3.3.1. Propriétés immunostimulantes	7
1.3.3.2. Propriétés antioxydantes	7
1.3.3.3. Propriétés antitumorales de la TQ	8
1.3.4. TQ et cycle cellulaire	8
1.3.5. Activité de la TQ sur la réponse immunitaire	8
1.3.6. Effets chimiopréventifs de la TQ	9
1.3.7. Effets pro-apoptotiques de la TQ	9
1.3.8. Cibles moléculaires de la TQ	9
1.4. Apoptose et cancer	11
1.4.1. Rôles et facteurs déclenchant l'apoptose	11
1.4.2. Modifications morphologiques	11
1.5. P53 et cancer	12
1.5.1. P53 : le cœur de lésions d'ADN	12
1.5.2. Fonctions normales de p53	12

1.5.3. P53 et apoptose	13
1.5.4. Cancers humains et mutations de p53	13
1.6. Stress oxydatif	14
1.6.1. Définition	14
1.6.2. Relation entre production des radicaux libres à l'origine du stress oxydatif, inflammation et cancer	16
Objectifs des travaux	18
Chapitre 2. Matériels & méthodes	19
2.1. Introduction	19
2.2. Préparation de la TQ	19
2.3. Dissociation de la biopsie du cancer colorectal	19
2.4. Culture des cellules cancéreuses	20
2.5. Etude de l'apoptose en présence de la TQ	21
2.5.1. Culture des cellules cancéreuses en présence de la Thymoquinone	21
2.5.2. Test de viabilité cellulaire	21
2.6. Etude du stress oxydatif de la lignée tumorale colorectale	22
2.6.1. Culture des cellules cancéreuses en présence de la TQ	22
2.6.2. Dosage de l'activité de la catalase	23
2.6.3. Dosage du monoxyde d'azote	23
2.6.4. Dosage de l'activité de l'Arginase (BioSystems)	24
2.6.5. Dosage de l'activité du SOD (SIGMA-ALDRICH)	25
2.6.6. Dosage de l'activité de la LDH (SPINREACT)	25
2.7. Analyse statistique	25
Chapitre 3. Résultats & interprétations	26
Chapitre 4. Discussions	30
Chapitre 5. Conclusions & perspectives	32
Chapitre 6. Références bibliographiques	33

Liste des figures

Figure 1.1 : Les trois phases de l'immunoediting.	4
Figure 1.2 : Illustration de la graine noire de « <i>Nigella sativa</i> » et structure chimique de la Thymoquinone.	6
Figure 1.3 : Voies de signalisation et cibles moléculaires de la Thymoquinone.	10
Figure 1.4 : Modèle de la sensibilité des cellules normales contre les cellules cancéreuses à des espèces réactives de l'oxygène.	16
Figure 2.1 : Dissociation de la biopsie du cancer colorectal.	19
Figure 2.2 : Culture des cellules cancéreuses dans les flasques	20
Figure 2.3 : Culture des cellules cancéreuses en présence de la Thymoquinone.	21
Figure 2.4 : Cellule de Malassez.	22
Figure 2.5 : Culture des cellules cancéreuses en présence de la Thymoquinone.	22
Figure 2.6 : Dosage de la catalase.	23
Figure 2.7 : Dosage de la LDH.	25
Figure 3.1 : Effet de la Thymoquinone sur la survie des cellules cancéreuses colorectales.	26
Figure 3.2 : Effet de la Thymoquinone sur la concentration du monoxyde d'azote extracellulaire des cellules cancéreuses colorectales.	27
Figure 3.3 : Effet de la Thymoquinone sur l'activité de la catalase intracellulaire des cellules cancéreuses colorectales.	27
Figure 3.3 : Effet de la Thymoquinone sur l'activité de l'arginase intracellulaire des cellules cancéreuses colorectales.	28
Figure 3.4 : Effet de la Thymoquinone sur l'activité de la superoxyde dismutase intracellulaire des cellules cancéreuses colorectales.	28
Figure 3.5 : Effet de la Thymoquinone sur l'activité du lactate déshydrogénase extracellulaire des cellules cancéreuses colorectales.	29

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique
APC : Adenomatous Polyposis Coli
ATP: Adénosine triphosphate
Bcl-2 : B-CQell Lymphoma 2
CCR: Cancer colorectal
CD : Cluster de différenciation
CDK: Cycline Dependant Kinase
CIN : Instabilité chromosomique
CMH: Complexe majeure d'histocompatibilité
CO₂ : dioxyde de carbone
CRC : cancer du côlon
DMSO: Dimethyl Sulfoxide
ERO: Espèces réactives de l'oxygène
IL: Interleukine
MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase
MG: Milligramme
NK: Natural killer
NM: Nanomètre
NO: Monoxyde d'azote (nitric oxide)
LDH: Lactate déshydrogénase
P53: Protéine 53
ROS: Reactive Oxygen Species
RPMI: Roswell Park Memorial Institute Medium
SOD : Superoxyde dismutase
STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3
SVF : Sérum de veau foetal
TQ: Thymoquinone
µL: Microlitre
µmoL : Micromole
mL : Millilitre

Introduction générale

Introduction générale

Le cancer est l'une des causes principales de mort à l'échelle mondiale, c'est une tumeur maligne qui est une maladie caractérisée par une prolifération cellulaire anormalement importante au sein d'un tissu normal de l'organisme conduisant à l'envahissement des tissus voisins par une croissance illimitée, l'invasion et la métastase des cellules (Chang et al., 2011; Takahashi et al., 2006).

Le cancer colorectal est le troisième cancer le plus fréquent dans le monde entier. Il représente la deuxième cause de mortalité par cancer. Plus d'un million de nouveaux cas de cancer colorectal sont diagnostiqués chaque année (Merika et al., 2010)

Le cancer colorectal est l'un des cancers les plus malins. Son apparition et sa progression impliquent un processus évolutif affecté par de multiples gènes (Li et al., 2013). Il est possible de réduire la morbidité et améliorer le pronostic du cancer colorectal par sa détection précoce (Li et al., 2012).

Au cours des travaux visant à identifier des substances naturelles capables d'inhiber la croissance tumorale et l'angiogenèse des cellules du cancer colorectal, une huile naturelle a été identifiée, il s'agit de l'huile de Nigelle.

La Thymoquinone est le principal constituant bioactif qui dérive de la plante médicinale « *Nigella sativa* » originaire de sud-ouest de l'Asie. Elle avait été utilisée dans la phytothérapie arabe traditionnelle pour le traitement d'arthrite, les maladies de poumon et l'hypercholestérolémie (Khader et al., 2009).

Elle a été étudiée *in vitro* et *in vivo* pour ses effets anti-inflammatoires, antioxydants et anticancéreux depuis sa première extraction en 1960. Son activité anti-oxydante / anti-inflammatoire a été rapportée dans différentes maladies, y compris l'encéphalomyélite, le diabète, l'asthme et la carcinogenèse. De plus, la TQ pourrait agir comme un radical libre et un absorbeur de radicaux superoxydes, aussi bien que préserver l'activité de diverses enzymes anti-oxydantes telles que la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion-S-transférase. Les impacts de la TQ sur le cancer sont médiés par différents modes d'action, tels que l'arrêt du cycle cellulaire, l'anti-prolifération, l'induction d'apoptose, la génération de ROS et l'anti-métastase / anti-angiogénèse.

Plusieurs études ont prouvé que la TQ est un médicament cytotoxique et génotoxique puissant sur un large éventail de cellules cancéreuses humaines (Gali-Muhtasib et al., 2006). Il a été suggéré que la TQ, en tant qu'agent nuisible pour l'ADN, est un producteur potentiellement réactif d'espèces d'oxygène (ROS) qui exerce ses effets anticancéreux en inhibant la croissance cellulaire, arrêtant la progression du cycle cellulaire et induisant par la

suite une mort cellulaire programmée dite apoptose (Gali-Muhtasib et al., 2008; Worthen et al., 1998).

Il est apparu alors essentiel de mettre en évidence les impacts moléculaires et cellulaires de cette molécule sur le ralentissement de la prolifération, l'induction d'apoptose et le stress oxydatif.

Notre objectif est de tester l'effet de la Thymoquinone à différentes concentrations sur la viabilité et la mort cellulaire ainsi que le stress oxydatif dans la lignée colorectale humaine cancéreuse mise en culture.

Ensemble, ces résultats nous permettront de voir les propriétés de ces différentes concentrations, d'apporter des éléments pour compléter nos connaissances sur le cancer colorectal, et de déterminer leur impact sur la biologie de cellules cancéreuses.

Une connaissance plus fine de ces mécanismes d'interaction de la Thymoquinone avec les molécules de signalisation *in vivo* pourrait être importante dans la compréhension des mécanismes de résistance aux traitements anticancéreux.

Chapitre 1

Revue de la littérature

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.1. Généralités sur le cancer

1.1.1. Définition

Le cancer est considéré comme une maladie génétique liée à l'acquisition progressive de 5 à 10 mutations "conductrices" dans une seule cellule (Stratton et al., 2009). Ces mutations s'accumulent au cours de la vie par l'action combinée de facteurs génétiques héréditaires et d'agents mutagènes d'origine exogène ou endogène. Le processus conduisant à la formation d'une tumeur cancéreuse, appelé cancérogenèse, est divisée en trois étapes : l'initiation, la promotion et la progression (Oliveira et al., 2007).

Il a été suggéré que le vaste catalogue de génotypes de cellules cancéreuses est une manifestation de six altérations essentielles de la physiologie cellulaire qui dictent collectivement la croissance maligne :

L'autosuffisance des signaux de croissance,
Insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance,
Évasion de la mort cellulaire programmée (apoptose),
Potentiel de réplication illimité,
Angiogenèse,
et invasion tissulaire et métastase (Hanahan and Weinberg, 2000).

1.1.2. Immunité naturelle innée et adaptative et cancer

Le système immunitaire peut identifier et détruire les cellules tumorales naissantes dans un processus appelé immunosurveillance du cancer, qui fonctionne comme une défense importante contre le cancer. Récemment, les données obtenues à partir de nombreuses recherches sur des modèles de cancer de la souris et chez des personnes atteintes d'un cancer offrent des signes convaincants que des types de cellules immunitaires innées et adaptatives particulières, des molécules effectrices et des voies peuvent parfois fonctionner collectivement comme des mécanismes anti-tumoraux extrinsèques. Cependant, le système immunitaire peut également favoriser la progression de la tumeur. Ensemble, les actions d'immunité de protection de l'hôte et de promotion de la tumeur sont appelées **cancer immunoediting** (Vesely et al., 2011).

1.1.3. Immunoediting

L'immunoediting est le résultat de trois processus qui fonctionnent indépendamment ou en séquence pour contrôler le cancer. Une fois que les cellules normales sont transformées en cellules tumorales par la combinaison d'oncogènes acquis et de mécanismes suppresseurs de tumeur intrinsèques non résistants, le système immunitaire peut fonctionner comme un

suppresseur de tumeur extrinsèque en éliminant les cellules tumorales ou en empêchant leur prolifération.

Dans la première phase, l'élimination, préalablement connue sous le nom d'immunosurveillance du cancer, les cellules immunitaires innées et adaptatives et les molécules reconnaissent les cellules transformées et les détruisent, ce qui entraîne un retour au tissu physiologique normal.

Cependant, si l'immunité antitumorale est incapable d'éliminer complètement les cellules transformées, les variantes tumorales survivantes peuvent entrer dans la phase d'équilibre, où les cellules et les molécules d'immunité adaptative empêchent l'expansion tumorale.

Ces variantes peuvent éventuellement acquérir d'autres mutations qui entraînent l'évasion de la reconnaissance, de la destruction ou du contrôle des cellules tumorales par les cellules immunitaires et la progression vers des tumeurs malignes cliniquement détectables dans la phase d'échappement (Dunn et al., 2002).

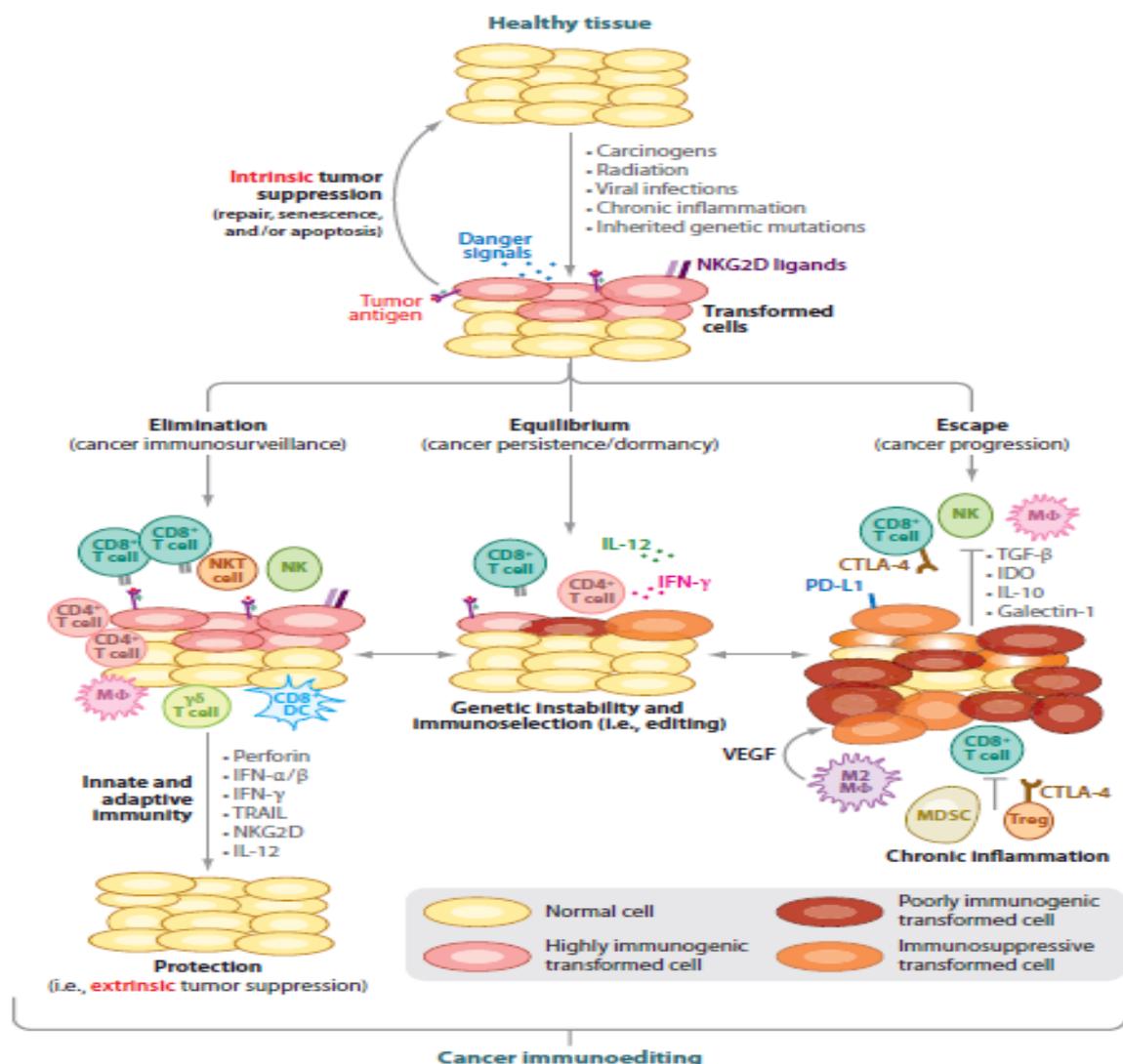


Figure 1.1 : Les trois phases de l'immunoediting (Dunn et al., 2002).

1.2. Cancer colorectal

Chaque année dans le monde, près d'un million de personnes développent un cancer colorectal et environ 655 000 personnes décèdent des suites de ce cancer. Ces données en font la seconde cause de décès dû au cancer dans le monde (Jemal et al., 2006).

L'épithélium intestinal est composé de cellules capables de proliférer de manière rapide et perpétuelle. Ainsi, l'épithélium est en constant renouvellement. Selon le modèle des cellules souches cancéreuses, les tumeurs malignes seraient issues d'une petite population de cellules cancéreuses capables d'auto-renouvellement et de pluripotentialité et capables de l'initiation et du maintien de la croissance tumorale (Boman and Wicha, 2008).

1.2.1. Origine et développement

Le développement du cancer du côlon (CRC) comprend généralement l'instabilité chromosomique (CIN), ce qui conduit à des amplifications et des délétions de gros segments d'ADN (Ashktorab et al., 2010).

De multiples sources de données indiquent que des composés bioactifs présents dans différentes plantes médicinales et comestibles puissent empêcher la carcinogenèse au niveau du côlon (Chung et al., 2013).

1.2.2. Instabilités génomiques dans le cancer colorectal

Le développement du cancer colorectal de l'adénome au carcinome peut durer plusieurs décennies. Les cancers émergent à la suite d'une accumulation d'altérations génétiques. Ces altérations permettent la croissance de cellules néoplasiques au phénotype caractéristique tel que celui décrit par le scientifique Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2000). Les scientifiques Vogelstein et Fearon, quant à eux, ont proposé un modèle décrivant l'évolution de la tumorigenèse des cellules colorectales, initiée par la mutation sur le gène de APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) puis amplifiée par les mutations sur les gènes de K-Ras et p53 (Vogelstein et al., 1989).

L'activité de la télomérase est généralement absente dans les cellules somatiques humaines alors que dans 90% des cellules tumorales, l'activation de la télomérase empêche le raccourcissement des télomères et permet ainsi une capacité de réplication illimitée (de Lange and DePinho, 1999).

1.3. Thymoquinone

1.3.1. Propriétés chimiques

La thymoquinone ou 2-isopropyl-5-méthyl-p-benzoquinone est une poudre cristallisée de couleur jaune.

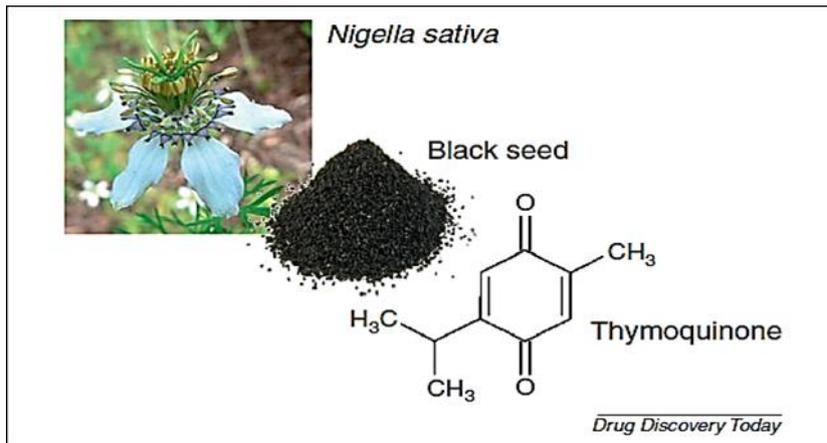


Figure 1.2 : Illustration de la graine noire de « *Nigella sativa* » et structure chimique de la TQ (Schneider-Stock et al., 2014).

1.3.2. Phytochimie de la graine

Les travaux concernant la composition chimique des graines de la nigelle ont révélé la richesse de ces graines en plusieurs constituants tant de métabolites secondaires que primaires, dont la teneur varie selon les conditions géographiques et climatiques, ainsi que les méthodes de caractérisation et d'extraction pratiquées (Bassim Atta, 2003; Sultan et al., 2009).

La famille des Renonculacées et notamment l'espèce *N. sativa* ont bénéficié de nombreuses études phytochimiques. Des échantillons de graines de *N. sativa* ont été analysés et caractérisés en termes de propriétés physiques, de minéraux, de composés chimiques et lipidiques. La présence d'une diversité de substances naturelles a été montrée regroupant des lipides, des terpénoïdes, des flavonoïdes, des alcaloïdes et des saponines. *N. sativa* constitue une importante source de protéines (21%) et de sels minéraux: phosphore, calcium, magnésium, potassium et sodium.

"*Nigella sativa*", connu aussi sous le nom de cumin noir, est une plante à fleurs annuelle qui pousse dans les pays méditerranéens, au Pakistan et en Inde (Gali-Muhtasib et al., 2006).

La thymoquinone (TQ), un composant de l'huile essentielle de graines noires, est connue pour induire la mort de cellules apoptotiques et le stress oxydatif. Le scientifique Nahed El-Najjar et ses collaborateurs montrent dans une étude que la TQ a inhibé la prolifération d'un panel de cellules cancéreuses du côlon humain (Caco-2, HCT-116, LoVo, DLD-1 et HT-29), sans être cytotoxique pour les cellules intestinales normales FHS74Int. Une étude plus poussée dans DLD-1 a révélé que la mort cellulaire apoptotique et le mécanisme de l'inhibition de la croissance sont induits par le TQ, comme le confirme la cytométrie en flux, la

mort cellulaire et l'activation des caspase-3/7. La TQ augmente la phosphorylation de MAPK, JNK et ERK, mais pas de p38.

Des travaux ont suggéré que des voies de signalisation pro-apoptotiques dans divers modèles de cancer humain sont induites par la TQ, un composé principal de l'huile de graine noire (Ocker, 2010).

Le scientifique Woo et ses collaborateurs ont indiqué que cette molécule présente une action anticancéreuse par la modulation de plusieurs cibles moléculaires, y compris p53, p73, PTEN, STAT3, PPAR-g, activation des caspases et génération de ROS. Ses effets anti-tumoraux ont aussi été étudiés dans des modèles de souris de xénotransgreffe de tumeur pour le cancer du côlon, de la prostate, du pancréas et du poumon (Woo et al., 2012a).

Les activités cellulaires induites par la TQ ont été mises en évidence par les voies de signalisation P53-dépendantes (H. Gali-Muhtasib et al., 2004) et p53 indépendantes (El-Mahdy et al., 2005; Worthen et al., 1998).

Dans des cellules cancéreuses colorectales humaines de type HCT-116, l'induction de l'apoptose par la TQ implique une régulation positive de l'expression de p53 et de p21^{WAF1/CIP1}, en même temps qu'une régulation négative de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (H. Gali-Muhtasib et al., 2004).

1.3.3. Propriétés pharmacologiques de la TQ

De nombreux travaux ont porté sur l'étude de "*Nigella sativa*" depuis et durant les années 1960 notamment sur les effets dus aux extraits de la graine, ainsi qu'aux principaux constituants, surtout la TQ.

1.3.3.1. Propriétés immunostimulantes

Après injection d'huile de nigelle chez une souris infectée par un cytomégalovirus, une diminution de la charge virale et une augmentation simultanée du taux sérique en IFN- γ et en cellules CD4⁺ ont été observées. Les souris traitées ont dix fois moins de virus que celles non traitées (Salem and Hossain, 2000).

1.3.3.2. Propriétés antioxydantes

L'activité antioxydante de la graine de nigelle et de ses différents constituants ont été mises en évidence par des études réalisées *in vitro* et *in vivo*.

Études *in vitro*

Le thymol, la thymoquinone et la dithymoquinone, constituants de *Nigella sativa*, ont un rôle de neutralisant des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Leur activité anti-radicalaire, vis-à-vis du radical hydroxyle, de l'anion superoxyde, ou encore de l'oxygène singulet, a été déterminée par spectrophotométrie et chimioluminescence (Kruk et al., 2000).

1.3.3.3. Propriétés antitumorales de la TQ

Les propriétés antitumorales de "*Nigella sativa*" et de ses constituants ont été montrées *in vitro* et *in vivo* par plusieurs études. Un effet cytotoxique a été observé en étudiant l'action de l'huile essentielle de "*Nigella sativa*" sur les différentes cellules cancéreuses humaines.

Propriétés cytotoxiques *in vitro*

Les effets cytotoxiques observés sur les différentes cellules cancéreuses humaines seraient dus à l'activation du gène et de la protéine p53 suppresseur de tumeur, et à l'inhibition de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 car ces deux processus bloquent la cellule en phase G1 du cycle cellulaire, et à ce moment soit une réparation, soit l'apoptose est déclenchée (Salem, 2005).

1.3.4. TQ et cycle cellulaire

La TQ aurait une action sur l'expression des protéines de régulation du cycle cellulaire. Il existe des points de contrôle dans le cycle cellulaire qui permettent à la cellule de vérifier qu'aucune modification génétique et structurale n'ait été commise. Deux points de contrôle majeurs de l'intégrité de l'ADN existent, un à la transition G1-S qui vérifie que la réplication s'est faite correctement, et un à la transition G2-M qui bloque la ségrégation chromosomique si la réplication est erronée.

Sur des cellules canines d'ostéosarcome et humaines de cancer du côlon, l'arrêt du cycle en G1 est lié à une stimulation de la p21, une protéine inhibitrice de kinase cycline-dépendante, qui est la cible principale de transcription du gène p53.

La cellule reste bloquée en G1 car l'augmentation en p21 inhibe l'activité des kinases permettant l'avancement dans le cycle cellulaire. (el Daly, 1998; H. Gali-Muhtasib et al., 2004; H. U. Gali-Muhtasib et al., 2004).

Ces résultats montrent les effets de la TQ dans la prolifération cellulaire et la viabilité à différents niveaux du cycle cellulaire. La TQ pourrait s'avérer être utile dans les thérapies ciblées sur les protéines du cycle cellulaire. Son effet sur la voie de signalisation p53 justifie les études à venir sur la détermination des différentes cibles moléculaires dans les cancers humains.

1.3.5. Activité de la TQ sur la réponse immunitaire

L'effet de "*Nigella sativa*" sur la réponse immunitaire a été évalué pour la première fois en 1987 chez des sujets humains volontaires. L'administration de capsules renfermant la poudre de TQ a entraîné, une augmentation de la population lymphocytaire *T helper* (CD4) et a contribué à l'amélioration du rapport cellules *T helper*/cellules T suppresseurs (CD4/CD8) après cinq semaines de traitement. Par ailleurs, l'activité des cellules tueuses NK est augmentée de 30% par la TQ. Il a également été prouvé que l'extrait aqueux de "*Nigella sativa*" stimule la réponse lymphocytaire, la production des interleukine-3 et la libération des

interleukines-1 β . Cela entraîne une stimulation de l'activité phagocytaire des macrophages et des leucocytes polynucléaires (Haq et al., 1995).

A fin de confirmer ses propriétés curatives, de nombreux travaux pour étudier les différentes activités biologiques des différents extraits de la graine de nigelle sur divers systèmes *in vitro* et *in vivo* ont été poussés par des applications thérapeutiques traditionnelles.

1.3.6. Effets chimiopréventifs de la TQ

L'administration orale de la TQ a montré une inhibition du benzo(α)pyrène induit lors de la carcinogénèse de l'estomac (Badary et al., 1999), et de 20-méthylcholanthrène lors de la tumorigénèse du fibrosarcome chez les souris (Badary and Gamal El-Din, 2001). De plus, la TQ joue un rôle dans la prévention du cancer induit par des produits chimiques grâce à sa capacité anti-oxydante (Woo et al., 2012a).

1.3.7. Effets pro-apoptotiques de la TQ

On a découvert que la TQ provoquait l'apoptose d'une manière dépendante de la dose et du temps dans les cellules tumorales colorectales humaines de type HCT116 via la voie dépendante de p53, cela a aussi été confirmé par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de p53 (pifithrine- α) (H. Gali-Muhtasib et al., 2004).

D'autre part, l'induction de l'apoptose par la TQ dans les cellules leucémiques myéloblastiques type HL-60 p53-null par l'activation des caspases 8, 9 et 3, ainsi que l'augmentation du rapport Bax /Bcl-2 a été rapportée par El-Mahdy et ses collaborateurs; Ceci suggèrait que l'effet apoptotique de la TQ est indépendant de p53 (El-Mahdy et al., 2005). La même étude a également prouvé que l'inhibiteur des caspases pourrait inverser l'apoptose provoquée par la TQ, ce qui confirme que l'activité apoptotique de la TQ dans les cellules leucémiques est dépendant de l'activation des caspases (El-Mahdy et al., 2005).

1.3.8. Cibles moléculaires de la TQ

Les effets de "*Nigella sativa*" dans la régulation du métabolisme des glucides, des lipides, ainsi que son action au niveau cardiovasculaire aboutissent à l'activation de la voie de MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) (Benhaddou-Andaloussi et al., 2011; Minokoshi et al., 2002).

Entre autre de la voie de MAPK, la TQ utilise d'autres voies de signalisation anticancéreuses telles que l'AKT et l'ERK en agissant sur la croissance cellulaire, l'apoptose, l'angiogénèse et le métabolisme protéique (Benhaddou-Andaloussi et al., 2008; Yi et al., 2008).

TQ et régulation de la voie de l'Akt

Une expression réduite ou nulle de l'inhibiteur de l'Akt (également appelée PKB = protéine kinase B), le PTEN (Phosphatase and TENsin homolog), un gène suppresseur de tumeur ayant une délétion sur le chromosome 10, est montrée dans la plupart des cancers humains, par conséquent, l'axe phosphatidylinositol-3-kinase/Akt est fréquemment activé dans les

cancers. Les substrats impliqués dans la régulation de la survie cellulaire, la progression du cycle cellulaire, et la croissance cellulaire sont phosphorylés en aval par la protéine kinase Akt activée; c'est donc une cible de choix dans la thérapeutique anticancéreuse. Des travaux ont montré que la TQ inhibe la voie de signalisation de l'Akt en induisant une inhibition de la croissance des cellules cancéreuses, et en provoquant leur apoptose dans les cancers du sein, de la prostate et même dans le lymphome des séreuses (Arafa et al., 2011; Hussain et al., 2011; Yi et al., 2008)

La TQ inhibe également les facteurs de l'angiogenèse, en corrélation avec l'inactivation de l'Akt et de la voie de signalisation ERK (*Extracellular Regulated-Kinase*) *in vitro* sur des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (Yi et al., 2008).

TQ et voie des MAPK

Il existe trois sous-familles de MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*), les ERK, les JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) et les p38 kinases. Dans les cellules du cancer du côlon, la production d'ERO active la voie des MAPK (ERK, JNK, mais pas les p38 kinases), ce qui provoque une apoptose induite par la TQ (El-Najjar et al., 2010).

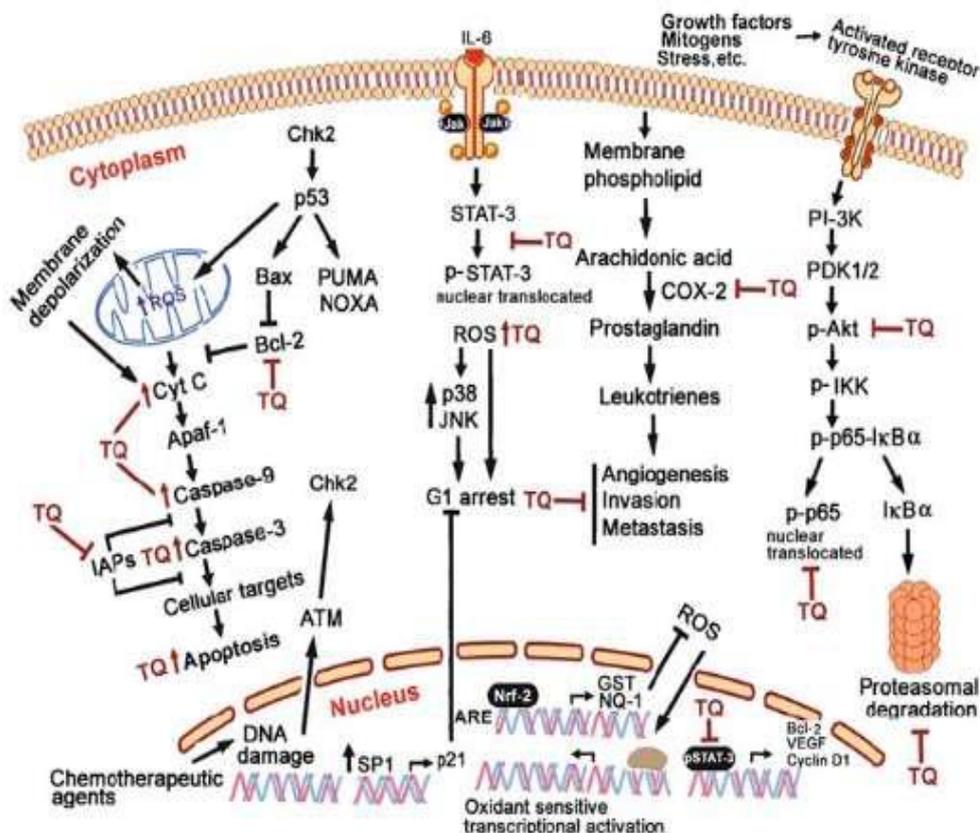


Figure 1.3 : Voies de signalisation et cibles moléculaires de la TQ (Shankar and Srivastava, 2012).

1.4. Apoptose et cancer

1.4.1. Rôles et facteurs déclenchant l'apoptose

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, joue un rôle essentiel dans la survie des organismes pluricellulaires en les débarrassant des cellules endommagées ou infectées qui peuvent interférer avec le fonctionnement normal (Portt et al., 2011). L'apoptose est donc indispensable pour le fonctionnement normal des organismes pluricellulaires. En effet, elle joue un rôle essentiel dans le développement, le maintien et le renouvellement tissulaire (développement embryonnaire, régulation du système immunitaire, morphogenèse) et la destruction des cellules potentiellement dangereuses (Abena et al., 2003; Ségal-Bendirdjian et al., 2005; Vachon, 2006). Toute dérégulation de ce processus conduit à de nombreux désordres pathologiques comme les maladies neurodégénératives (excès de mort cellulaire) ou le cancer (défaut de mort cellulaire) (Michel, 2003). Il peut être réglé par de nombreux modulateurs, y compris certains ions (par exemple le calcium), des gènes (par exemple c-myc, Bcl-2/Bax et Fas), des protéines (par exemple p53, caspases) et même des organites (par exemple, les mitochondries, réticulum endoplasmique) (Ulukaya et al., 2011). Parmi ces régulateurs, les membres de la famille des caspases conduisent à la perte de la structure et de la fonction cellulaire et, éventuellement, entraînent la mort cellulaire par apoptose (González et al., 2010; Walsh et al., 2008).

L'apoptose est un phénomène actif et complexe qui fait intervenir une cascade de facteurs et qui consomme de l'énergie sous forme d'ATP. L'apoptose peut être due à un déséquilibre de l'homéostasie cellulaire, comme une forte baisse transitoire de la concentration intracellulaire en ATP (Izyumov et al., 2004). Une certaine concentration en zinc semble prévenir l'activation de certaines caspases. Ainsi une diminution de cette concentration entraîne le déclenchement de l'apoptose (Seve et al., 2002; Stefanidou et al., 2006). L'apoptose peut être induite par de nombreux stimuli différents, tels que les rayons ultraviolets (UV) (Bivik et al., 2006), les agents de chimiothérapie (Seitz et al., 2010), l'infection par des agents pathogènes (Wu et al., 2010; Zhang et al., 2011), les biphényles polychlorés (Zhang et al., 2009), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Solhaug, 2003), les insecticides (Jin et al., 2013) et des métaux lourds (Pathak et al., 2013).

1.4.2. Modifications morphologiques

Les cellules apoptotiques présentent les mêmes caractéristiques particulières quels que soient les tissus d'origine. Les cellules apoptotiques montrent un rétrécissement cellulaire (Kerr, 2002) et une condensation de la chromatine suivie de la fragmentation de l'ADN qui se termine par une fragmentation de la cellule en corps apoptotiques. Au cours du processus apoptotique la membrane expose sur sa face externe la phosphatidyl serine signalant ainsi

son état aux macrophages (Erwig and Henson, 2008), puis elle devient peu à peu perméable. Au niveau mitochondrial, on observe une baisse du potentiel membranaire due à la dislocation de la chaîne de transport des électrons et du métabolisme énergétique au niveau du cytochrome C. Cette dislocation est consécutive à l'action de facteurs apoptotiques ayant pour cible la mitochondrie (Green and Reed, 1998). La libération du cytochrome C serait un évènement précoce de l'apoptose (Bossy-Wetzel, 1998) et certainement à l'origine de la diminution du potentiel membranaire. Le cytochrome C est également impliqué dans l'activation des caspases (Green and Reed, 1998).

Le développement harmonieux et la survie de tout organisme multicellulaire résultent d'un contrôle précis du nombre de cellules qui le composent grâce à un équilibre entre les phénomènes de prolifération et mort cellulaires.

L'apoptose (mort physiologique programmée) est due à plusieurs causes intrinsèques ou extrinsèques. Parmi ces causes, on cite le stress cellulaire provoqué par l'accumulation des radicaux libres qui altèrent les protéines, les lipides, les glucides et endommagent l'ADN.

En cas de cancer, la cellule cancéreuse s'adapte aux stress cellulaires et active des voies de signalisation de survie et présente une prolifération permanente (Favier, 1997).

1.5. P53 et cancer

1.5.1. P53 : le cœur de lésions d'ADN

TP53 est l'un des plus célèbres gènes suppresseurs de tumeurs, il code pour la protéine p53 dont la fonction principale est de répondre au stress cellulaire (Suzuki and Matsubara, 2011). La protéine p53 a plusieurs fonctions biologiques telles que la régulation du cycle cellulaire, le métabolisme de l'ADN, la différenciation cellulaire, la réponse immunitaire l'apoptose, la sénescence et l'angiogenèse. D'autres fonctions de p53 ont été rapportées incluant des rôles de transcription, de post-transcription et de post-traduction (Suzuki and Matsubara, 2011).

Les fonctions de base de p53 sont la régulation de l'arrêt de la croissance et de l'apoptose comme revu par les chercheurs Vousden et Prives (Vousden and Prives, 2009).

Il est rapporté que la voie p53 est inactivée dans environ la moitié de tous les cancers (Soussi and Bérout, 2001).

1.5.2. Fonctions normales de p53

P53 comme détecteur de dommages à l'ADN

L'une des caractéristiques les plus importantes des tumeurs malignes est l'instabilité génétique. P53 joue un rôle important dans des systèmes de détection de dommages à l'ADN et de réparation du génome. Pour répondre aux dommages à l'ADN, p53 provoque soit l'arrêt du cycle cellulaire soit l'apoptose (Hanahan and Weinberg, 2000).

Toledo et ses collaborateurs ont démontré que des souris ayant une p53 mutée n'ont pas la capacité d'induire l'arrêt du cycle cellulaire, mais conservent la capacité à induire l'apoptose, et donc de supprimer efficacement les tumeurs induites par l'oncogène (Toledo et al., 2006), Ce qui suggère que la fonction pro-apoptotique de p53 peut jouer un rôle plus important dans ses effets anti tumoraux que dans l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire.

1.5.3. P53 et apoptose

De nombreux rapports ont décrit le mécanisme par lequel p53 induit l'apoptose. Comme p53 fonctionne principalement comme un facteur de transcription, il est important d'explorer les gènes régulés par p53 qui contribuent à la régulation de l'apoptose. Les premières études ont montré que la p53 de type sauvage (Wilde Type WT) peut se lier à la région du promoteur du gène Bax et réguler la transcription de ce gène (Miyashita et al., 1994; Miyashita and Reed, 1995). Bax est un membre de la famille Bcl-2, qui forme des hétérodimères avec Bcl-2, inhibant son activité (Oltvai et al., 1993). La famille des protéines Bcl-2 joue un rôle important dans l'apoptose et le cancer (Cotter, 2009; Yip and Reed, 2008). Par exemple, Bcl-2 contrôle la libération du cytochrome c à partir des mitochondries, ce qui active la voie apoptotique en activant la caspase 9. La caspase 9 active alors la caspase 3 effectrice (Suzuki and Matsubara, 2011).

L'expression de Bcl-2 est modifiée dans plusieurs cancers humains, y compris le cancer du côlon et de l'estomac (Ayhan et al., 1994; Hague et al., 1994; Krajewska et al., 1996).

1.5.4. Cancers humains et mutations de p53

Plus de 26 000 données de mutations somatiques de p53 apparaissent dans l'agence internationale de recherche sur le cancer "International agency for research on cancer (IARC)" TP53 version de base de données R14 (Petitjean et al., 2007).

Le gène TP53 codant la protéine p53 a une fréquence de mutation qui varie de ~ 10% (malignités hématopoïétiques) à 50-70% (tumeurs colorectale, de la tête, du cou et ovarienne) (Brosh and Rotter, 2009). Le syndrome de Li-Fraumeni est provoqué par la mutation germinale de TP53, c'est un syndrome de cancer familial incluant le cancer du sein, le sarcome des tissus mous et divers autres types de cancer (Malkin et al., 1990).

La majorité des mutations TP53 entraînent des mutations au sein de la liaison d'ADN dans les cancers humains, ce qui empêche la p53 de transcrire ses gènes cibles.

Cependant, le mutant p53 conduit à une perte de la fonction normale de la protéine de type sauvage qui a un rôle de suppresseur de tumeur et peut même exercer des effets favorisant le cancer (Brosh and Rotter, 2009). Wolf et ses collaborateurs ont publié le premier rapport de ce gain de fonction par le mutant p53 était l'observation que la transfection de p53 mutant dans des cellules p53-null améliore la formation de tumeur chez la souris (Wolf et al., 1984).

1.6. Stress oxydatif

1.6.1. Définition

Le stress oxydatif est communément défini comme un déséquilibre entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydantes d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire (Barouki, 2006), il se produit dans la cellule quand la concentration des espèces réactives excède les capacités antioxydantes de cette cellule (Roberts and Sindhu, 2009). Ainsi, le stress oxydant est la conséquence d'une augmentation dans la génération des espèces réactives et /ou d'une défaillance dans les systèmes antioxydants (Roberts and Sindhu, 2009) à cause soit d'un déficit nutritionnel en antioxydants comme les vitamines ou aux anomalies génétiques responsables d'un mauvais codage d'une protéine soit enzymatiquement antioxydante, soit synthétisant un antioxydant soit régénérant ce dernier. La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement augmente la production mitochondriale de radicaux et diminue les défenses antioxydantes (Sohal et al., 2002).

Le dommage oxydatif cellulaire est une caractéristique clé de la lésion cellulaire et tissulaire (Blair, 2008; Floyd, 1990; Spatz and Bloom, 1992; Valko et al., 2006, 2007) et est médiée par la production de radicaux libres et d'espèces réactives d'oxygène (ROS), qui se lient à, réagissent et attaquent plusieurs composants cellulaires, en formant des métabolites réactifs d'oxygène actif (Blair, 2008; Floyd, 1990; Spatz and Bloom, 1992; Valko et al., 2006, 2007). Une cible de ROS primaire est les acides gras polyinsaturés associés à la membrane cellulaire, et l'attaque ROS conduit à la peroxydation lipidique et à l'endommagement de la structure et de l'activité cellulaires (Blair, 2008; Valko et al., 2006, 2007). Dans des conditions normales, plusieurs mécanismes antioxydants sont opérationnels, et agissent pour maintenir l'intégrité et la fonction cellulaire, qui comprennent la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx) et la catalase (CAT) comme enzymes détoxifiantes/antioxydantes et le métabolite non enzymatique de faible poids moléculaire réduit le glutathion (GSH) (Valko et al., 2007).

Un déséquilibre entre la formation de métabolites réactifs de l'oxygène et leur balayage par des antioxydants, également appelé stress oxydatif, (Papas, 1996) a été suggéré de jouer un rôle important dans plusieurs états pathologiques, y compris la carcinogenèse (Floyd, 1990; Spatz and Bloom, 1992; Valko et al., 2006).

Un certain nombre de rapports ont souligné l'importance des indicateurs pro et anti-oxydants, comme marqueurs de chimioprévention pour de nombreux cancers, par des composés naturels et synthétiques (Arivazhagan et al., 1999; Balasenthil et al., 2000; Devasena et al., 2006; Ghadi et al., 2009; Lii et al., 1998). Il s'agissait notamment de la TQ un élément

abondant de l'extrait d'huile de graines noires, qui a été proposé comme prometteur non toxique, anticancéreux et agent antioxydant (Woo et al., 2012b; Worthen et al., 1998). Fonctionnellement, la TQ a été montré pour empêcher des tumeurs chimiquement induites, (Gali-Muhtasib et al., 2008b) et comme agent anticancéreux en raison de son prétendu effet anti-prolifératif, (H. U. Gali-Muhtasib et al., 2004) sa capacité d'arrêt du cycle cellulaire, (H. Gali-Muhtasib et al., 2004; H. U. Gali-Muhtasib et al., 2004) et ses effets pro-apoptotiques (Arafa et al., 2011; H. Gali-Muhtasib et al., 2004). La TQ agit également comme éliminateur de radicaux libres, en particulier le scavenger d'oxydes d'anions superoxyde, (Badary et al., 2003) par lequel la TQ aurait antagonisé les effets indésirables résultant de niveaux élevés de ROS dans ces troubles (Sankaranarayanan and Pari, 2011; Sayed-Ahmed et al., 2010). Les modèles de rat expérimentaux ont démontré l'effet anticancéreux de la TQ sur le cancer du côlon, (Gali-Muhtasib et al., 2008b) un processus à plusieurs étapes, dans lequel les radicaux oxygène jouent un rôle décisif lors des phases d'initiation, de promotion et de progression (Portt et al., 2011).

De plus, il existe une relation entre la production excessive de radicaux libres dans l'organisme à l'origine du stress oxydatif et l'inflammation (Lin and Karin, 2007; Reuter et al., 2010). En effet, l'initiation et la progression du cancer ont été associées au stress oxydatif induisant des dommages de l'ADN ou en augmentant les mutations de l'ADN, l'instabilité du génome et la prolifération cellulaire (Visconti and Grieco, 2009). Des études plus récentes ont prouvé qu'en plus d'induire une instabilité génomique, les espèces réactives de l'oxygène peuvent spécifiquement activer certaines voies de signalisation et contribuer ainsi au développement de la cellule cancéreuse à travers la régulation de la prolifération cellulaire, l'angiogenèse et la métastase (Storz, 2005).

Cependant, le cancer est maintenant considéré généralement comme une maladie évitable (Anand et al., 2008). En effet, seulement 5 à 10% des cancers sont de cause héréditaire, tandis que le reste soit 90 à 95% est lié au style de vie et à l'environnement (Anand et al., 2008). Les infections chroniques, l'obésité, les radiations, le tabac, l'alcool, les polluants environnementaux et le régime alimentaire riche en calories ont été reconnus comme des facteurs de risque les plus courants du cancer (Aggarwal et al., 2009). Tous ces facteurs de risque sont liés au cancer à travers l'inflammation (Aggarwal et al., 2009).

1.6.2. Relation entre production des radicaux libres à l'origine du stress oxydatif, inflammation et cancer

Le stress oxydant résultant du déséquilibre créé par la production excessive des espèces réactives de l'oxygène (ROS) est considéré comme étant impliqué de façon critique dans le processus normal de vieillissement, mais aussi dans le développement et la progression de diverses pathologies humaines dont les cancer (Becker et al., 2014). Les espèces réactives de l'oxygène sont impliquées dans les différentes phases de la tumorigenèse. Par conséquent, cibler des facteurs de et des transcription des voies redox-sensibles, est très prometteur pour la prévention et le traitement du cancer. De nombreux agents ont été identifiés et peuvent interférer avec les voies de signalisation cellulaire redox (Fang et al., 2009; Surh et al., 2005; Virgili and Marino, 2008).

Les cellules normales sont hypersensibles aux espèces réactives de l'oxygène (ROS) si elles ne sont pas suffisamment protégées par des mécanismes antioxydants pouvant conduire à la formation de tumeur (Figure 1.3). En revanche, Les cellules cancéreuses ont des mécanismes antioxydants objets d'une régulation (glutathion, SOD, catalase, et autres) qui les protègent contre les espèces réactives de l'oxygène, comme on peut l'observer dans le cas de la radiorésistance par exp (Reuter et al., 2010).

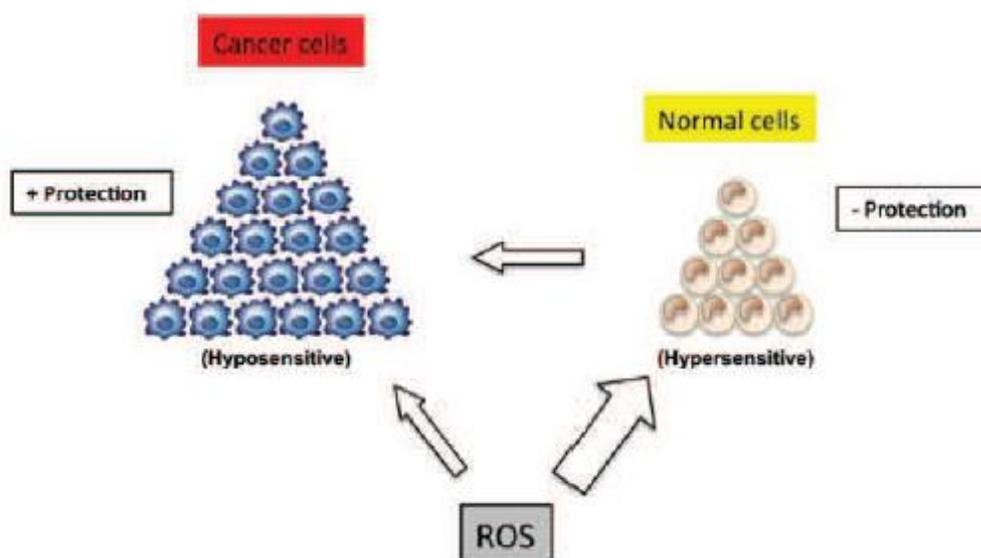


Figure 1.4 : Modèle de la sensibilité des cellules normales contre les cellules cancéreuses à des espèces réactives de l'oxygène (Bayala, 2014).

Les premières expériences sur le rôle des espèces réactives de l'oxygène dans l'initiation de la tumeur ont supposé que le stress oxydatif joue le rôle d'agent endommageant l'ADN, ce qui augmente efficacement le taux de mutation dans les cellules et par conséquent du pouvoir de transformation oncogénique (Jackson and Loeb, 2001) . Par ailleurs, des études

plus récentes ont prouvé qu'en plus d'induire une instabilité génomique, les espèces réactives de l'oxygène peuvent spécifiquement activer certaines voies de signalisation et de contribuer ainsi au développement de la tumeur à travers la régulation de la prolifération cellulaire, l'angiogenèse et la métastase (Storz, 2005).

Les cytokines libérées par les cellules tumorales et les cellules immunitaires/inflammatoires peuvent soit favoriser le développement de la tumeur et la survie des cellules cancéreuses soit exercer des effets anti-tumoraux. L'inflammation chronique se développe par l'action de différents médiateurs de l'inflammation, comprenant TNF- α , IL-6 et IL-17, ce qui conduit à l'élimination de l'immunité anticancéreuse et l'accélération de la progression tumorale. Cependant, TRAIL à travers l'induction directe de l'apoptose des cellules tumorales, IL-10, à travers des effets anti-inflammatoires et IL-12, à travers l'activation de cellules NK et CTLs l'expression de médiateurs cytotoxiques, peuvent conduire à la suppression tumorale. Les multiples actions de IL-23 et de TGF- β (cytotoxique dans les cellules du cancer du côlon, et ayant à la fois des effets positifs et négatifs sur le microenvironnement tumoral) expliquent leur double rôle dans le développement tumorale (Lin and Karin, 2007).

En conclusion, le passage de la cellule normale à la cellule cancéreuse correspond à l'acquisition de propriétés caractéristiques : prolifération incontrôlée, envahissement des tissus adjacents, colonisation d'organes à distance, instabilité génétique et dérèglement du système immunitaire.

Au cours des travaux visant à identifier les effets de substances naturelles sur l'inhibition de la prolifération et l'induction d'apoptose, la Thymoquinone, une huile naturelle de Nigelle a été identifiée.

Ces travaux, ont montré cette huile présente une activité considérable contre la prolifération cellulaire accompagnée de l'induction d'apoptose ainsi comme étant un antioxydant efficace. A partir de ces données, la TQ apparait comme une molécule privilégiée de thérapie anticancéreuse.

Objectifs des travaux

L'objectif de mes travaux de mémoire a été de mieux comprendre l'impact de la Thymoquinone à différentes concentrations sur la croissance tumorale et le stress oxydatif dans la lignée cancéreuse colorectale.

Chapitre 2

Matériels & méthodes

Chapitre 2. Matériels & méthodes**2.1. Introduction**

La Thymoquinone (TQ), principal constituant actif de l'huile essentielle de graines noires, présente des effets prometteurs contre les maladies inflammatoires et le cancer.

Cette molécule module les voies de signalisation qui sont essentielles à la progression du cancer et améliore le potentiel anticancéreux des médicaments cliniques tout en réduisant leur effets secondaires toxiques (Schneider-Stock et al., 2014).

2.2. Préparation de la TQ**2.3. Dissociation de la biopsie du cancer colorectal**

Une partie d'une biopsie d'un cancer solide colorectal d'un patient a été ramenée du Centre Hospitalier Universitaire de Tlemcen (CHU).

Une fois au laboratoire, un lavage de la biopsie a été effectué avec de l'eau physiologique stérile.

Trypsinisation

Les cellules cancéreuses ont été incubées toute une nuit sous des conditions physiologiques à 37°C + 5% CO₂ (Figure 2.2).

2.5. Etude de l'apoptose en présence de la TQ**Viabilité cellulaire****2.6. Etude du stress oxydatif****2.7. Analyses statistiques**

Les comparaisons des données quantitatives ont été réalisées par le test non paramétrique de Kruskal-Wallis à l'aide du logiciel SPSS. Lorsque p-value est inférieure à 0.05, la différence est statistiquement significative.

Chapitre 3

Résultats & interprétations

Chapitre 3. Résultats & Interprétations

Le cancer colorectal est un **carcinome**, qui se développe aux dépens des tissus de revêtement, il est dû à plusieurs dérèglements génétiques et métaboliques cellulaires, La Thymoquinone (TQ) est un composé d'une huile naturelle « *Nigella Sativa* » présentant des propriétés antiproliférative et pro-apoptotique dans plusieurs types de cancer. Dans notre étude, on a essayé d'étudier son impact sur l'apoptose (mort cellulaire programmée) et le stress oxydatif dans des cellules cancéreuses colorectales issues de biopsies chirurgicales.

CONFIDENTIEL

Chapitre 4

Discussions

Chapitre 4. Discussions

Le cancer colorectal est parmi les cancers les plus mortels, c'est l'un des cancers les plus diagnostiqués. La grande majorité des patients morts atteints de ce cancer est causée par les métastases de tumeur qui sont une conséquence d'un taux élevé d'invasion cellulaire (Gali-Muhtasib et al., 2007).

De ce fait, des composés naturels ont été mis en évidence pour réduire la prolifération du cancer colorectal tels que la Thymoquinone.

La Thymoquinone (TQ) est le principal constituant bioactif qui dérive de la plante médicinale « *Nigella sativa* ». Des études récentes ont rapporté que la TQ pourrait inhiber la prolifération de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses (Banerjee et al., 2010).

L'objectif de nos travaux a été de bien comprendre l'effet antiprolifératif, pro-apoptotique et anti ou pro-oxydant de la TQ dans la lignée cancéreuse colorectale humaine.

CONFIDENTIEL

CONFIDENTIEL

Chapitre 5

Conclusions & perspectives

Chapitre 5. Conclusions & perspectives

Les effets des substances naturelles sur les cancers ont fait l'objet de nombreux travaux.

Parmi ces substances on cite la Thymoquinone (TQ), un constituant major de l'huile naturelle de la graine noir « *Nigella sativa* », identifiée comme étant une molécule antiproliférative et antioxydant dans de nombreuses lignées cancéreuses.

Cependant, les mécanismes moléculaires de l'interaction de cette huile naturelle sur une lignée tumorale restaient mal décrits.

Au cours de mes travaux j'ai essayé de comprendre l'impact de la TQ sur la survie, l'apoptose et le stress oxydatif de la lignée colorectale cancéreuse.

Le message principal de l'ensemble de ces travaux est que la TQ serait une molécule antiproliférative efficace au niveau des cellules cancéreuses.

En perspectives de mes travaux, je propose des recherches plus approfondies pour déterminer les voies de signalisation activées ou inhibées en présence de la TQ qui induirait la réduction de la croissance et la survie tumorale dans différents cancers.

Chapitre 6

Références bibliographiques

Chapitre 6. Références bibliographiques**A**

- Abena, A.A., Diatowa, M., Gakosso, G., Gbeassor, M., Hondi-Assah, T., Ouamba, J.M., 2003. Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects of essential oil of *Lippia multiflora*. *Fitoterapia* 74, 231–236.
- Aggarwal, B.B., Vijayalekshmi, R.V., Sung, B., 2009. Targeting Inflammatory Pathways for Prevention and Therapy of Cancer: Short-Term Friend, Long-Term Foe. *Clin. Cancer Res.* 15, 425–430. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0149
- Alhosin, M., Abusnina, A., Achour, M., Sharif, T., Muller, C., Peluso, J., Chataigneau, T., Lugnier, C., Schini-Kerth, V.B., Bronner, C., Fuhrmann, G., 2010. Induction of apoptosis by thymoquinone in lymphoblastic leukemia Jurkat cells is mediated by a p73-dependent pathway which targets the epigenetic integrator UHRF1. *Biochem. Pharmacol.* 79, 1251–1260. doi:10.1016/j.bcp.2009.12.015
- Anand, P., Kunnumakara, A.B., Sundaram, C., Harikumar, K.B., Tharakan, S.T., Lai, O.S., Sung, B., Aggarwal, B.B., 2008. Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharm. Res.* 25, 2097–2116. doi:10.1007/s11095-008-9661-9
- Arafa, E.-S.A., Zhu, Q., Shah, Z.I., Wani, G., Barakat, B.M., Racoma, I., El-Mahdy, M.A., Wani, A.A., 2011. Thymoquinone up-regulates PTEN expression and induces apoptosis in doxorubicin-resistant human breast cancer cells. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 706, 28–35. doi:10.1016/j.mrfmmm.2010.10.007
- Arivazhagan, S., Balasenthil, S., Nagini, S., 1999. Modulatory effects of garlic and neem leaf extracts on circulating lipid peroxides and antioxidants during N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis. *Med. Sci. Res.* 27, 527–529.
- Asaduzzaman Khan, M., Tania, M., Zhang, D., Chen, H., 2010. Antioxidant enzymes and cancer. *Chin. J. Cancer Res.* 22, 87–92. doi:10.1007/s11670-010-0087-7
- Ashktorab, H., Schäffer, A.A., Darempouran, M., Smoot, D.T., Lee, E., Brim, H., 2010. Distinct Genetic Alterations in Colorectal Cancer. *PLoS ONE* 5, e8879. doi:10.1371/journal.pone.0008879
- Attoub, S., Sperandio, O., Raza, H., Arafat, K., Al-Salam, S., Al Sultan, M.A., Al Safi, M., Takahashi, T., and Adem, A. (2013). Thymoquinone as an anticancer agent: evidence from inhibition of cancer cells viability and invasion in vitro and tumor growth in vivo. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 27, 557–569.
- Ayhan, A., Yasui, W., Yokozaki, H., Seto, M., Ueda, R., Tahara, E., 1994. Loss of heterozygosity at the bcl-2 gene locus and expression of bcl-2 in human gastric and colorectal carcinomas. *Jpn. J. Cancer Res. Gann* 85, 584–591.

B

- Badary, O.A., Abdel-Naim, A.B., Abdel-Wahab, M.H., Hamada, F.M., 2000. The influence of thymoquinone on doxorubicin-induced hyperlipidemic nephropathy in rats. *Toxicology* 143, 219–226.
- Badary, O.A., Al-Shabanah, O.A., Nagi, M.N., Al-Rikabi, A.C., Elmazar, M.M., 1999. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced forestomach carcinogenesis in mice by thymoquinone. *Eur. J. Cancer Prev. Off. J. Eur. Cancer Prev. Organ. ECP* 8, 435–440.
- Badary, O.A., Gamal El-Din, A.M., 2001. Inhibitory effects of thymoquinone against 20-methylcholanthrene-induced fibrosarcoma tumorigenesis. *Cancer Detect. Prev.* 25, 362–368.
- Badary, O.A., Taha, R.A., Gamal el-Din, A.M., Abdel-Wahab, M.H., 2003. Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug Chem. Toxicol.* 26, 87–98. doi:10.1081/DCT-120020404
- Balasenthil, S., Arivazhagan, S., Nagini, S., 2000. Garlic enhances circulatory antioxidants during 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *J. Ethnopharmacol.* 72, 429–433.
- Banerjee, S., Padhye, S., Azmi, A., Wang, Z., Philip, P.A., Kucuk, O., Sarkar, F.H., and Mohammad, R.M. (2010). Review on Molecular and Therapeutic Potential of Thymoquinone in Cancer. *Nutr. Cancer* 62, 938–946.
- Barouki, R., 2006. Stress oxydant et vieillissement. *médecine/sciences* 22, 266–272. doi:10.1051/medsci/2006223266
- Barron, J., Benghuzzi, H., Tucci, M., 2008. Effects of thymoquinone and selenium on the proliferation of mg 63 cells in tissue culture. *Biomed. Sci. Instrum.* 44, 434–440.
- Bassim Atta, M., 2003. Some characteristics of nigella (*Nigella sativa* L.) seed cultivated in Egypt and its lipid profile. *Food Chem.* 83, 63–68. doi:10.1016/S0308-8146(03)00038-4
- Becker, K., Schroecksnadel, S., Gostner, J., Zaknun, C., Schennach, H., Uberall, F., Fuchs, D., 2014. Comparison of in vitro tests for antioxidant and immunomodulatory capacities of compounds. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* 21, 164–171. doi:10.1016/j.phymed.2013.08.008
- Benhaddou-Andaloussi, A., Martineau, L., Vuong, T., Meddah, B., Madiraju, P., Settaf, A., Haddad, P.S., 2011. The In Vivo Antidiabetic Activity of *Nigella sativa* Is Mediated through Activation of the AMPK Pathway and Increased Muscle Glut4 Content. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2011, 538671. doi:10.1155/2011/538671
- Benhaddou-Andaloussi, A., Martineau, L.C., Spoor, D., Vuong, T., Leduc, C., Joly, E., Burt, A., Meddah, B., Settaf, A., Arnason, J.T., Prentki, M., Haddad, P.S., 2008. Antidiabetic Activity of *Nigella sativa* . Seed Extract in Cultured Pancreatic β -cells,

- Skeletal Muscle Cells, and Adipocytes. *Pharm. Biol.* 46, 96–104. doi:10.1080/13880200701734810
- Bivik, C., Rosdahl, I., Ollinger, K., 2006. Hsp70 protects against UVB induced apoptosis by preventing release of cathepsins and cytochrome c in human melanocytes. *Carcinogenesis* 28, 537–544. doi:10.1093/carcin/bgl152
- Blair, I.A., 2008. DNA adducts with lipid peroxidation products. *J. Biol. Chem.* 283, 15545–15549. doi:10.1074/jbc.R700051200
- Boman, B.M., Wicha, M.S., 2008. Cancer stem cells: a step toward the cure. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 2795–2799. doi:10.1200/JCO.2008.17.7436
- Bossy-Wetzell, E., 1998. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J.* 17, 37–49. doi:10.1093/emboj/17.1.37
- Brosh, R., Rotter, V., 2009. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat. Rev. Cancer* 9, 701–713. doi:10.1038/nrc2693

C

- Chang, C.-C., Chen, W.-C., Ho, T.-F., Wu, H.-S., Wei, Y.-H., 2011. Development of natural anti-tumor drugs by microorganisms. *J. Biosci. Bioeng.* 111, 501–511. doi:10.1016/j.jbiosc.2010.12.026
- Chung, M.-Y., Lim, T.G., Lee, K.W., 2013. Molecular mechanisms of chemopreventive phytochemicals against gastroenterological cancer development. *World J. Gastroenterol.* 19, 984–993. doi:10.3748/wjg.v19.i7.984
- Cotter, T.G., 2009. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat. Rev. Cancer* 9, 501–507. doi:10.1038/nrc2663

D

- Daba, M.H., Abdel-Rahman, M.S., 1998. Hepatoprotective activity of thymoquinone in isolated rat hepatocytes. *Toxicol. Lett.* 95, 23–29.
- de Lange, T., DePinho, R.A., 1999. Unlimited mileage from telomerase? *Science* 283, 947–949.
- Desai, M., Jellyman, J.K., and Ross, M.G. (2015). Epigenomics, gestational programming and risk of metabolic syndrome. *Int. J. Obes.* 2005 39, 633–641.
- Devasena, T., Menon, V.P., Rajasekharan, K.N., 2006. Prevention of 1,2-dimethylhydrazine-induced circulatory oxidative stress by bis-1,7-(2-hydroxyphenyl)-hepta-1,6-diene-3,5-dione during colon carcinogenesis. *Pharmacol. Rep. PR* 58, 229–235.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., Schreiber, R.D., 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 3, 991–998. doi:10.1038/ni1102-991

E

- Ebru, U., Burak, U., Yusuf, S., Reyhan, B., Arif, K., Faruk, T.H., Emin, M., Aydin, K., Atilla, I.I., Semsettin, S., Kemal, E., 2008. Cardioprotective effects of *Nigella sativa* oil on cyclosporine A-induced cardiotoxicity in rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 103, 574–580. doi:10.1111/j.1742-7843.2008.00313.x
- El-Mahdy, M.A., Zhu, Q., Wang, Q.-E., Wani, G., Wani, A.A., 2005. Thymoquinone induces apoptosis through activation of caspase-8 and mitochondrial events in p53-null myeloblastic leukemia HL-60 cells. *Int. J. Cancer* 117, 409–417. doi:10.1002/ijc.21205
- El-Najjar, N., Chatila, M., Moukadem, H., Vuorela, H., Ocker, M., Gandesiri, M., Schneider-Stock, R., Gali-Muhtasib, H., 2010. Reactive oxygen species mediate thymoquinone-induced apoptosis and activate ERK and JNK signaling. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 15, 183–195. doi:10.1007/s10495-009-0421-z
- Erwig, L.-P., Henson, P.M., 2008. Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ.* 15, 243–250. doi:10.1038/sj.cdd.4402184

F

- Fang, J., Seki, T., Maeda, H., 2009. Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 290–302. doi:10.1016/j.addr.2009.02.005
- Favier, A., 1997. Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 55, 9–16.
- Floyd, R.A., 1990. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 4, 2587–2597.

G

- Gali-Muhtasib, H., Diab-Assaf, M., Boltze, C., Al-Hmaira, J., Hartig, R., Roessner, A., Schneider-Stock, R., 2004. Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism. *Int. J. Oncol.* 25, 857–866.
- Gali-Muhtasib, H., Kuester, D., Mawrin, C., Bajbouj, K., Diestel, A., Ocker, M., Habold, C., Foltzer-Jourdainne, C., Schoenfeld, P., Peters, B., Diab-Assaf, M., Pommrich, U., Itani, W., Lippert, H., Roessner, A., Schneider-Stock, R., 2008a. Thymoquinone triggers inactivation of the stress response pathway sensor CHEK1 and contributes to apoptosis in colorectal cancer cells. *Cancer Res.* 68, 5609–5618. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0884
- Gali-Muhtasib, H., Ocker, M., Kuester, D., Krueger, S., El-Hajj, Z., Diestel, A., Evert, M., El-Najjar, N., Peters, B., Jurjus, A., Roessner, A., Schneider-Stock, R., 2008b.

- Thymoquinone reduces mouse colon tumor cell invasion and inhibits tumor growth in murine colon cancer models. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 330–342. doi:10.1111/j.1582-4934.2007.00095.x
- Gali-Muhtasib, H., Roessner, A., Schneider-Stock, R., 2006. Thymoquinone: a promising anti-cancer drug from natural sources. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 1249–1253. doi:10.1016/j.biocel.2005.10.009
- Gali-Muhtasib, H.U., Abou Kheir, W.G., Kheir, L.A., Darwiche, N., Crooks, P.A., 2004. Molecular pathway for thymoquinone-induced cell-cycle arrest and apoptosis in neoplastic keratinocytes. *Anticancer. Drugs* 15, 389–399.
- Ghadi, F.E., Ghara, A.R., Bhattacharyya, S., Dhawan, D.K., 2009. Selenium as a chemopreventive agent in experimentally induced colon carcinogenesis. *World J. Gastrointest. Oncol.* 1, 74–81. doi:10.4251/wjgo.v1.i1.74
- González, D., Espino, J., Bejarano, I., López, J.J., Rodríguez, A.B., Pariente, J.A., 2010. Caspase-3 and -9 are activated in human myeloid HL-60 cells by calcium signal. *Mol. Cell. Biochem.* 333, 151–157. doi:10.1007/s11010-009-0215-1
- Green, D.R., Reed, J.C., 1998. Mitochondria and Apoptosis. *Science* 281, 1309–1312.

H

- Hague, A., Moorghen, M., Hicks, D., Chapman, M., Paraskeva, C., 1994. BCL-2 expression in human colorectal adenomas and carcinomas. *Oncogene* 9, 3367–3370.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Hanene, J.H., Aicha, N., Ines, S., rani, Eya, M., Leila, C.G., Touhami, M., 2010. Antioxidant and antigenotoxic activities of *Globularia alypum* leaves extracts. *J. Med. Plants Res.* 4, 2048–2053. doi:10.5897/JMPR10.385
- Haq, A., Abdullatif, M., Lobo, P.I., Khabar, K.S., Sheth, K.V., al-Sedairy, S.T., 1995. *Nigella sativa*: effect on human lymphocytes and polymorphonuclear leukocyte phagocytic activity. *Immunopharmacology* 30, 147–155.
- Houghton, P.J., Zarka, R., de las Heras, B., and Houlst, J.R. (1995). Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Med.* 61, 33–36.
- Hussain, A.R., Ahmed, M., Ahmed, S., Manogaran, P., Plataniias, L.C., Alvi, S.N., Al-Kuraya, K.S., Uddin, S., 2011. Thymoquinone suppresses growth and induces apoptosis via generation of reactive oxygen species in primary effusion lymphoma. *Free Radic. Biol. Med.* 50, 978–987. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.034

I

- Ismail, M., Al-Naqeep, G., Chan, K.W., 2010. *Nigella sativa* thymoquinone-rich fraction greatly improves plasma antioxidant capacity and expression of antioxidant genes in

hypercholesterolemic rats. *Free Radic. Biol. Med.* 48, 664–672.
doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.002

Izyumov, D.S., Avetisyan, A.V., Pletjushkina, O.Y., Sakharov, D.V., Wirtz, K.W., Chernyak, B.V., Skulachev, V.P., 2004. “Wages of Fear”: transient threefold decrease in intracellular ATP level imposes apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1658, 141–147. doi:10.1016/j.bbabi.2004.05.007

J

Jackson, A.L., Loeb, L.A., 2001. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat. Res.* 477, 7–21.

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Smigal, C., Thun, M.J., 2006. Cancer statistics, 2006. *CA. Cancer J. Clin.* 56, 106–130.

Jin, Y., Pan, X., Cao, L., Ma, B., Fu, Z., 2013. Embryonic exposure to cis-bifenthrin enantioselectively induces the transcription of genes related to oxidative stress, apoptosis and immunotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Shellfish Immunol.* 34, 717–723. doi:10.1016/j.fsi.2012.11.046

K

Kerr, J.F.R., 2002. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 181–182, 471–474.

Khader, M., Bresgen, N., Eckl, P.M., 2009. In vitro toxicological properties of thymoquinone. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 47, 129–133. doi:10.1016/j.fct.2008.10.019

Khan, M., Yousaf, M., Wadood, A., Junaid, M., Ashraf, M., Alam, U., Ali, M., Arshad, M., Hussain, Z., and Khan, K.M. (2014). Discovery of novel oxindole derivatives as potent α -glucosidase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 22, 3441–3448.

Krajewska, M., Moss, S.F., Krajewski, S., Song, K., Holt, P.R., Reed, J.C., 1996. Elevated expression of Bcl-X and reduced Bak in primary colorectal adenocarcinomas. *Cancer Res.* 56, 2422–2427.

Kruk, I., Michalska, T., Lichszteid, K., Kładna, A., Aboul-Enein, H.Y., 2000. The effect of thymol and its derivatives on reactions generating reactive oxygen species. *Chemosphere* 41, 1059–1064.

L

Li, B.-Q., Huang, T., Liu, L., Cai, Y.-D., Chou, K.-C., 2012. Identification of colorectal cancer related genes with mRMR and shortest path in protein-protein interaction network. *PLoS One* 7, e33393. doi:10.1371/journal.pone.0033393

Li, B.-Q., Yu, H., Wang, Z., Ding, G.-H., Liu, L., 2013. MicroRNA mediated network and DNA methylation in colorectal cancer. *Protein Pept. Lett.* 20, 352–363.

Lii, C.K., Ko, Y.J., Chiang, M.T., Sung, W.C., Chen, H.W., 1998. Effect of dietary vitamin E on antioxidant status and antioxidant enzyme activities in Sprague-Dawley rats. *Nutr. Cancer* 32, 95–100. doi:10.1080/01635589809514725

Lin, W.-W., Karin, M., 2007. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J. Clin. Invest.* 117, 1175–1183. doi:10.1172/JCI31537

M

Majaw, T., Sharma, R., 2015. Arginase I expression is upregulated by dietary restriction in the liver of mice as a function of age. *Mol. Cell. Biochem.* 407, 1–7. doi:10.1007/s11010-015-2448-5

Malkin, D., Li, F.P., Strong, L.C., Fraumeni, J.F., Nelson, C.E., Kim, D.H., Kassel, J., Gryka, M.A., Bischoff, F.Z., Tainsky, M.A., 1990. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250, 1233–1238.

Mansour, M.A. (2000). Protective effects of thymoquinone and desferrioxamine against hepatotoxicity of carbon tetrachloride in mice. *Life Sci.* 66, 2583–2591.

Merika, E., Saif, M.W., Katz, A., Syrigos, K., Syrigos, C., Morse, M., 2010. Review. Colon cancer vaccines: an update. *Vivo Athens Greece* 24, 607–628.

Michel, J.-B., 2003. Anoikis in the Cardiovascular System: Known and Unknown Extracellular Mediators. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 2146–2154. doi:10.1161/01.ATV.0000099882.52647.E4

Minokoshi, Y., Kim, Y.-B., Peroni, O.D., Fryer, L.G.D., Müller, C., Carling, D., Kahn, B.B., 2002. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415, 339–343. doi:10.1038/415339a

Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B., Reed, J.C., 1994. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9, 1799–1805.

Miyashita, T., Reed, J.C., 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293–299.

Muntané, J., la Mata, M.D., 2010. Nitric oxide and cancer. *World J. Hepatol.* 2, 337–344. doi:10.4254/wjh.v2.i9.337

N

Nagi, M.N., Mansour, M.A., 2000. Protective effect of thymoquinone against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: a possible mechanism of protection. *Pharmacol. Res.* 41, 283–289. doi:10.1006/phrs.1999.0585

O

Ocker, 2010. Thymoquinone hydrazone derivatives cause cell cycle arrest in p53-competent colorectal cancer cells. *Exp. Ther. Med.* 1. doi:10.3892/etm_00000058

Oliveira, P.A., Colaço, A., Chaves, R., Guedes-Pinto, H., De-La-Cruz P, L.F., Lopes, C., 2007. Chemical carcinogenesis. *An. Acad. Bras. Cienc.* 79, 593–616.

Oltvai, Z.N., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J., 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609–619.

P

Papas, A.M., 1996. Determinants of antioxidant status in humans. *Lipids* 31 Suppl, S77-82.

Pathak, N., Mitra, S., Khandelwal, S., 2013. Cadmium Induces Thymocyte Apoptosis via Caspase-Dependent and Caspase-Independent Pathways: MULTIPLE APOPTOTIC PATHWAYS BY CADMIUM. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 27, 193–203. doi:10.1002/jbt.21468

Petitjean, A., Achatz, M.I.W., Borresen-Dale, A.L., Hainaut, P., Olivier, M., 2007. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene* 26, 2157–2165. doi:10.1038/sj.onc.1210302

Portt, L., Norman, G., Clapp, C., Greenwood, M., Greenwood, M.T., 2011. Anti-apoptosis and cell survival: A review. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1813, 238–259. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.10.010

R

Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., Aggarwal, B.B., 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* 49, 1603–1616. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006

Roberts, C.K., Sindhu, K.K., 2009. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci.* 84, 705–712. doi:10.1016/j.lfs.2009.02.026

S

Salem, M.L., 2005. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *Int. Immunopharmacol.* 5, 1749–1770. doi:10.1016/j.intimp.2005.06.008

Salem, M.L., Hossain, M.S., 2000. Protective effect of black seed oil from *Nigella sativa* against murine cytomegalovirus infection. *Int. J. Immunopharmacol.* 22, 729–740.

Sankaranarayanan, C., Pari, L., 2011. Thymoquinone ameliorates chemical induced oxidative stress and β -cell damage in experimental hyperglycemic rats. *Chem. Biol. Interact.* 190, 148–154. doi:10.1016/j.cbi.2011.02.029

Sayed-Ahmed, M.M., Aleisa, A.M., Al-Rejaie, S.S., Al-Yahya, A.A., Al-Shabanah, O.A., Hafez, M.M., Nagi, M.N., 2010. Thymoquinone attenuates diethylnitrosamine induction of hepatic carcinogenesis through antioxidant signaling. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 3, 254–261. doi:10.4161/oxim.3.4.12714

- Schneider-Stock, R., Fakhoury, I.H., Zaki, A.M., El-Baba, C.O., Gali-Muhtasib, H.U., 2014. Thymoquinone: fifty years of success in the battle against cancer models. *Drug Discov. Today* 19, 18–30. doi:10.1016/j.drudis.2013.08.021
- Ségal-Bendirdjian, E., Dudognon, C., Mathieu, J., Hillion, J., Besançon, F., 2005. [Cell death signalling: recent advances and therapeutic application]. *Bull. Cancer (Paris)* 92, 23–35.
- Seitz, S.J., Schleithoff, E.S., Koch, A., Schuster, A., Teufel, A., Staib, F., Stremmel, W., Melino, G., Krammer, P.H., Schilling, T., Müller, M., 2010. Chemotherapy-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma involves the p53 family and is mediated via the extrinsic and the intrinsic pathway. *Int. J. Cancer NA-NA*. doi:10.1002/ijc.24861
- Seve, M., Chimienti, F., Favier, A., 2002. [Role of intracellular zinc in programmed cell death]. *Pathol. Biol. (Paris)* 50, 212–221.
- Shankar, S., Srivastava, R.K. (Eds.), 2012. *Nutrition, Diet and Cancer*. Springer Netherlands, Dordrecht. doi:10.1007/978-94-007-2923-0
- Sohal, R.S., Mockett, R.J., Orr, W.C., 2002. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 575–586.
- Solhaug, A., 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbons induce both apoptotic and anti-apoptotic signals in Hepa1c1c7 cells. *Carcinogenesis* 25, 809–819. doi:10.1093/carcin/bgh069
- Soussi, T., Béroud, C., 2001. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* 1, 233–240. doi:10.1038/35106009
- Spatz, L., Bloom, A.D. (Eds.), 1992. *Biological consequences of oxidative stress: implications for cardiovascular disease and carcinogenesis*, The Conte Institute series. Oxford University Press, New York.
- Stefanidou, M., Maravelias, C., Dona, A., Spiliopoulou, C., 2006. Zinc: a multipurpose trace element. *Arch. Toxicol.* 80, 1–9. doi:10.1007/s00204-005-0009-5
- Storz, P., 2005. Reactive oxygen species in tumor progression. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 10, 1881–1896.
- Stratton, M.R., Campbell, P.J., Futreal, P.A., 2009. The cancer genome. *Nature* 458, 719–724. doi:10.1038/nature07943
- Suboh, S.M., Bilito, Y.Y., Aburjai, T.A., 2004. Protective effects of selected medicinal plants against protein degradation, lipid peroxidation and deformability loss of oxidatively stressed human erythrocytes. *Phytother. Res. PTR* 18, 280–284. doi:10.1002/ptr.1380
- Sultan, M.T., Butt, M.S., Anjum, F.M., Jamil Tajik, A., Akhtar, S.S., Nasir, M., Jamil, A.K., 2009. Nutritional profile of indigenous cultivar of black cumin seeds and antioxidant potential of its fixed and essential oil.

Surh, Y.-J., Kundu, J.K., Na, H.-K., Lee, J.-S., 2005. Redox-sensitive transcription factors as prime targets for chemoprevention with anti-inflammatory and antioxidative phytochemicals. *J. Nutr.* 135, 2993S–3001S.

Suzuki, K., Matsubara, H., 2011. Recent Advances in p53 Research and Cancer Treatment. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 1–7. doi:10.1155/2011/978312

T

Takahashi, H., Aoyagi, K., Nakanishi, Y., Sasaki, H., Yoshida, T., Honda, H., 2006. Classification of intramural metastases and lymph node metastases of esophageal cancer from gene expression based on boosting and projective adaptive resonance theory. *J. Biosci. Bioeng.* 102, 46–52. doi:10.1263/jbb.102.46

Toledo, F., Krummel, K.A., Lee, C.J., Liu, C.-W., Rodewald, L.-W., Tang, M., Wahl, G.M., 2006. A mouse p53 mutant lacking the proline-rich domain rescues Mdm4 deficiency and provides insight into the Mdm2-Mdm4-p53 regulatory network. *Cancer Cell* 9, 273–285. doi:10.1016/j.ccr.2006.03.014

U

Ulukaya, E., Acilan, C., Yilmaz, Y., 2011. Apoptosis: why and how does it occur in biology?: APOPTOSIS IN BIOLOGY. *Cell Biochem. Funct.* 29, 468–480. doi:10.1002/cbf.1774

V

Vachon, P.H., 2006. Survie cellulaire : differences et différenciation. *médecine/sciences* 22, 423–429. doi:10.1051/medsci/2006224423

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160, 1–40. doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009

Vesely, M.D., Kershaw, M.H., Schreiber, R.D., Smyth, M.J., 2011. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 235–271. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101324

Virgili, F., Marino, M., 2008. Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 1205–1216. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.08.001

Visconti, R., Grieco, D., 2009. New insights on oxidative stress in cancer. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 12, 240–245.

Vogelstein, B., Fearon, E.R., Kern, S.E., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Nakamura, Y., White, R., 1989. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 244, 207–211.

Vousden, K.H., Prives, C., 2009. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 137, 413–431. doi:10.1016/j.cell.2009.04.037

W

Walsh, J.G., Cullen, S.P., Sheridan, C., Luthi, A.U., Gerner, C., Martin, S.J., 2008. Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 12815–12819. doi:10.1073/pnas.0707715105

Wang, Y., Wei, Lian, Wei, D., Li, X., Xu, L., Wei, Linna, 2015. Testis-Specific Lactate Dehydrogenase (LDH-C4) in Skeletal Muscle Enhances Apika?s Sprint-Running Capacity in Hypoxic Environment. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 12, 9218–9236. doi:10.3390/ijerph120809218

Wilson, A.J., Saskowski, J., Barham, W., Khabele, D., Yull, F., 2015. Microenvironmental effects limit efficacy of thymoquinone treatment in a mouse model of ovarian cancer. *Mol. Cancer* 14. doi:10.1186/s12943-015-0463-5

Wolf, D., Harris, N., Rotter, V., 1984. Reconstitution of p53 expression in a nonproducer Ab-MuLV-transformed cell line by transfection of a functional p53 gene. *Cell* 38, 119–126.

Woo, C.C., Kumar, A.P., Sethi, G., Tan, K.H.B., 2012a. Thymoquinone: Potential cure for inflammatory disorders and cancer. *Biochem. Pharmacol.* 83, 443–451. doi:10.1016/j.bcp.2011.09.029

Woo, C.C., Kumar, A.P., Sethi, G., Tan, K.H.B., 2012b. Thymoquinone: Potential cure for inflammatory disorders and cancer. *Biochem. Pharmacol.* 83, 443–451. doi:10.1016/j.bcp.2011.09.029

Worthen, D.R., Ghosheh, O.A., Crooks, P.A., 1998. The in vitro anti-tumor activity of some crude and purified components of blackseed, *Nigella sativa* L. *Anticancer Res.* 18, 1527–1532.

Wu, H.-C., Wu, J.-L., Chu, H.-L., Su, Y.-C., Hong, J.-R., 2010. RGNNV induces mitochondria-mediated cell death via newly synthesized protein dependent pathway in fish cells. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 451–463.

Y

Yi, T., Cho, S.-G., Yi, Z., Pang, X., Rodriguez, M., Wang, Y., Sethi, G., Aggarwal, B.B., Liu, M., 2008. Thymoquinone inhibits tumor angiogenesis and tumor growth through suppressing AKT and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Mol. Cancer Ther.* 7, 1789–1796. doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0124

Yip, K.W., Reed, J.C., 2008. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* 27, 6398–6406. doi:10.1038/onc.2008.307

Z

- Zhang, J., Zhang, H., Ni, W., 2009. Oxidative stress and apoptosis of *Carassius auratus* lymphocytes induced by nonplanar (PCB153) and coplanar (PCB169) polychlorinated biphenyl congeners in vitro. *J. Environ. Sci. China* 21, 1284–1289.
- Zhang, L., Li, L., Zhang, G., 2011. Gene discovery, comparative analysis and expression profile reveal the complexity of the *Crassostrea gigas* apoptosis system. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 603–610. doi:10.1016/j.dci.2011.01.005