

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE

N°...../SNV/2016

## THÈSE

Présentée par

**MOSBAH Asma**

Pour obtenir le diplôme de

## DOCTORAT EN SCIENCES

*Filière* : Biologie

*Option* : Biochimie

## THÈME

**Etude de l'effet hépatoprotecteur de l'huile totale et de la fraction  
neutre des graines de *Nigella sativa* contre l'hépatotoxicité  
induite par l'éthanol chez le rat**

Soutenue publiquement le 01/ 03 / 2016

Devant le Jury

Président :	Pr SENATOR Abderrahmane	Pr. UFA Sétif 1
Directeur :	Pr BENBOUBETRA Mustapha	Pr. UFA Sétif 1
Examineurs :	Pr KACEM-CHAOUICHE Nouredine	Pr. UMC Constantine 1
	Pr BENABDESSELAM Fadila	Pr. UAM Béjaia 1
	Pr KHETTAL Bachra	Pr. UAM Béjaia 1
Invité :	Pr MALEK Rachid	Pr. CHU de Sétif

*Laboratoire de Biochimie Appliquée*

## ***REMERCIEMENTS***

Mes prières et mes remerciements les plus sincères je les adresse à toi mon Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force, la patience et le courage de mener à terme ce modeste travail.

J'adresse mes remerciements à mon directeur de thèse, le professeur BENBOUBETRA Mustapha, je tiens à lui exprimer ma vive reconnaissance pour m'avoir guidé durant toutes mes années d'études. Qu'il Trouve ici l'expression de mon respect, de ma gratitude, mes souhaits de bonne santé et de bon rétablissement et continuation.

Je remercie infiniment le professeur SENATOR Abderrahmane, de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Mes remerciements sont adressés aussi au professeur KACEM-CHAOUCHE Nourdine d'avoir accepté d'examiner ma thèse. Aussi, je le remercie pour son soutien et encouragement lors de la réalisation de ce travail.

Mes remerciements sont adressés aussi à Mme le professeur BENABDESLAM Fadila et Mme le Professeur KHETTAL Bachra d'avoir accepter d'examiner ma thèse.

Mes remerciements sont adressés au professeur MALEK Rachid, Chef de service, Médecine interne, CHU de Sétif, pour avoir accepté d'être parmi nous lors de l'évaluation de ce travail.

Je ne pourrai jamais remercier suffisamment Dr SOBHI Widad pour son aide, conseils et soutien inconditionné. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Aussi, je n'oublierai jamais de remercier ZETTAL Hasna pour son aide et accueil au sein de l'animalerie de l'Université les Frères Mentouri de Constantine.

Aussi, je tiens à remercier Pr TOUABTI, responsable du laboratoire des analyses biochimiques de CHU- Setif, pour son inestimable aide. Mes remerciements son aussi adressés à tout les membres de son équipe et l'équipe du laboratoire d'anatomie pathologique.

Mes remerciements et ma reconnaissance sont aussi adressés à mes enseignants, mes collègues et à toute personne ayant Contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

# *Dédicace*

*Avec mes vifs remerciements et ma profonde gratitude je vous dédie, mes chers parents, ce modeste travail. Je ne pourrais jamais être à la hauteur de vos sacrifices et patience. Je pris*

*Dieu pour qu'il vous accorde santé et une longue vie.*

*Merci papa, Merci mama*

*A mon frère unique Youcef, à mes sœur Sara et Chayma.*

*Merci pour tout, pour vos encouragements et soutient.*

*A Widad, Imen, Nawel, Sana et Hanane mes amies, je vous remercie pour votre amitié et votre soutient.*

*A tout mes amies du bloc de recherche, de faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Ferhat Abbas de Setif. Merci pour votre amitié et pour tous les bons moments.*

*A mes amies de l'Université les Frères Mentouri de Constantine.*

## RESUME

Ce travail de recherche a été initialement consacré à l'étude de la capacité anti-oxydante de deux fractions ; l'huile totale et la fraction neutre des graines de *Nigella sativa*. *In vitro*, nos résultats montrent que les deux fractions sont dotées d'un pouvoir antioxydant important, notamment l'inhibition de la peroxydation lipidique. Pour évaluer le pouvoir hépatoprotecteur sur un modèle animal de toxicité induite par l'éthanol chez le rat, les deux fractions sont utilisées et montrent un effet antioxydant important. Cette capacité protectrice serait le résultat de l'amélioration : **(i)** de l'état des marqueurs du stress oxydatif (GSH, CAT, SOD, MDA) plasmatique et tissulaire, **(ii)** des paramètres biochimiques hépatiques et lipidiques et **(iii)** de la morphologie des hépatocytes.

Pour comprendre le mécanisme de l'effet hépatoprotecteur des deux fractions (l'huile totale et la fraction neutre), nous avons effectué le dosage, par ELISA, de la xanthine oxydoréductase (XOR), enzyme génératrice des espèces réactives de l'oxygène, et les anticorps anti-XOR. Ce dosage a été effectué dans les sérums et les homogénats du foie des rats traités et non traités avec l'éthanol. Les résultats, après traitement avec les deux fractions, montrent une diminution significative ( $p \leq 005$ ) de la concentration de l'enzyme XOR et des taux d'anticorps anti XOR, dans les sérums et les homogénats du foie des rats ayant une toxicité hépatique alcoolique. Ceci révèle un effet hépatoprotecteur des deux extraits contre la toxicité hépatique induite par l'éthanol. De plus, et au vue des résultats, nous pouvons suggérer que la XOR pourrait être considérée comme un marqueur fiable du stress oxydatif lors de la toxicité hépatique alcoolique.

Afin d'exclure une éventuelle toxicité due aux fractions de graines de *Nigella sativa*, la toxicité des deux fractions (l'huile totale et la fraction neutre) a été évaluée sur un rat. Les résultats montrent l'absence de traces majeures de toxicité hépatique et ce dans les conditions expérimentales appliquées, en termes de quantité des extraits administrés et la durée du test, ces deux fractions sont dépourvues de toxicité hépatique.

**Mots-clés : Hépatotoxicité, *Nigella sativa*, huile total, fraction neutre, XOR, ERO  
et stress oxydant.**

## SUMMARY

This research investigation focused initially on the antioxidant property of the extracted *Nigella sativa* seeds' total oil and its lipid neutral fraction. *In vitro*, both fractions showed a significant antioxidant activity mainly on the inhibition of lipid peroxidation. When evaluated for a possible protective effect against ethanol induced hepatotoxicity in rat animal model, the treatment by these two fractions led, by their significant antioxidant power, to improvement in **(i)** the state of oxidative stress markers (GSH, CAT, SOD, LPO) in plasma and tissue, **(ii)** hepatic and lipid biochemical markers of animals and **(iii)** on hepatocytes' morphology.

To understand the mechanism by which the hepatoprotective effect of the two fractions (total oil and neutral lipid fraction) occurs, we looked, by ELISA, at the level of xanthine oxidoreductase (XOR), enzyme generating reactive oxygen species (ROS), and anti-XOR antibodies in both sera and liver homogenates of ethanol treated and non treated rats. Results after treatment with the two fractions showed a significant ( $p \leq 0.05$ ) decrease in both XOR and anti-XOR titers in sera and homogenates of ethanol fed rats. These findings point out the hepatoprotective effect of the two extracts against the ethanol induced liver toxicity. In the view of a sum up of these results addition, XOR could be a good and a reliable candidate as a new marker of oxidative stress in alcohol induced liver toxicity.

To exclude a possible toxic effect from the plant *Nigella sativa* itself, we evaluated the toxicity of both used extracts (total oil and neutral lipid fraction) on rats. On experimental conditions (in terms of amount administered extracts and the test duration) used in this research work, the two fractions did not show liver toxicity.

**Key words:** Hepatotoxicity, *Nigella sativa*, total oil, neutral fraction, XOR, ROS  
**and oxidative stress.**

## الملخص

من خلال هذا العمل البحثي ، قمنا بدراسة النشاطية المضادة للأكسدة للجزئين المستخرجين من الحبة السوداء ، وهما الزيت الاجمالي و الجزء المحايد المستخرج منه، نتائج الدراسة التي أجريت خارج الجسم الحي أظهرت أن الجزئين المستخرجين يملكان نشاطية مضادة للأكسدة معتبرة، و خاصة القدرة على تثبيط بيروكسيد الدهون . من أجل تقييم التأثير الوقائي ضد التسمم الكبدي الناجم عن الايثانول داخل الجسم الحي باستخدام نموذج حيواني (الفئران)، قمنا باستخدام الزيت الإجمالي والجزء المحايد المستخرج منه و أظهرت النتائج نشاطية مضادة للأكسدة معتبرة . هذه القدرة الوقائية هي نتيجة للتحسينات في (ا) حالة مضادات الأكسدة (MDA ، SOD ، CAT ، GSH) في البلازما والأنسجة، (ب) القياسات البيوكيميائية للكبد والمادة الدهنية في للحيوانات و (ج) مورفولوجيا الخلايا الكبدية.

لفهم آلية التأثير الوقائي للكبد باستخدام الجزئين المستخرجين (الزيت الاجمالي و الجزء المحايد المستخرج منه) ، أجرينا الفحص الكمي، باستخدام تقنية ELISA، لإنزيم الكراتين المؤكسد المرجع XOR، المولدة للجذور الحرة للأكسجين و الأجسام المضادة المولدة ضد إنزيم XOR . تم إجراء هذا الاختبار في مصل الدم ومستخلص نسيج الكبد في الفئران المعالجة وغير المعالجة بالايثانول . وتشير النتائج بعد المعالجة بالجزئين المستخلصين إلى انخفاض ملحوظ ( $p \leq 005$ ) في تركيز الإنزيم XOR و الأجسام المضادة لل XOR في مستخلص الكبد و الدم للفئران المعالجة بالايثانول . وهذا يكشف عن نشاطية وقائية للكبد باستخدام الجزئين المستخرجين ضد السمية الناجمة عن الايثانول في الكبد . بالإضافة إلى ذلك، وبالنظر إلى النتائج، يمكننا القول بأن XOR يمكن اعتباره مقياس موثوق للإجهاد التأكسدي الناتج عن السمية الكحولية للكبد.

استبعادا للسمية المحتملة الناتجة من الحبة السوداء نفسها، قمنا بدراسة سمية الجزئين المستخرجين ( الزيت الاجمالي و الجزء المحايد المستخرج منه) على الفئران . أظهرت النتائج عدم وجود علامات كبيرة من تسمم الكبد وهذا في الظروف التجريبية المطبقة، من حيث الكمية المعطاة ومدة الاختبار. هذين الجزئين لا يملكان أي تأثير سمي على الكبد.

الكلمات المفاتيح: سمية الكبد، الحبة السوداء، الزيت الإجمالي، الجزء المحايد، XOR ، الجذور الحرة

لأكسجين و الإجهاد التأكسدي

## LISTE DES ABREVIATIONS

ADH:	Alcool Déshydrogénase
AINS:	Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens
AGPI :	Acide Gras Poly-Insaturé
ALD:	Alcoholic Liver Disease
ALP:	Alkaline Phosphatase
ALAT :	Alanine-AminoTranferase
ASAT :	Aspartate-Aminotransferase
CAT :	Catalase
CCl4 :	Tétrachlorométhane
CD :	Classe de Différentiation
CSH:	Hepatic Satellite Cells
CYP2E1	Cytochrome P2E1
DMSO :	Dimethyl Sulfoxide
ERO :	Espèces Réactifs de l'Oxygène
EtOH :	Ethanol
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FN :	Fraction Neuter d'huile de <i>Nigella sativa</i>
GSH	Glutathion réduit
HT :	Huile Totale de <i>Nigella sativa</i>
IC <sub>50</sub> :	Concentration inhibitrice à 50%
IFN- $\gamma$ :	Interféron gamma
IgG :	Immunoglobuline G
IL :	Interleukin
LPS :	Lipopolysaccharide
MDA :	Malondialdéhyde
Min :	Minute
Mo :	Molybdène
NAC :	N-Acétyl Cystéine
NAD :	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NK :	Naturel killer
OPD :	Orthophenylenediamine
PCLS	Precision-Cut Liver Slices
RLs:	Radicaux Libres
ROS :	Reactive Oxygen Species
SOD :	Superoxide Dismutase
TNF :	Tumor Necrosis Factor
TQ :	Thymoquinone
XDH :	Xanthine Déshydrogénase
XO :	Xanthine Oxidase
XOR :	Xanthine Oxydo-Réductase

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>3</b>
<b>1. HÉPATOTOXICITÉ INDUITE PAR L'ÉTHANOL</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1. Foie cible de la toxicité</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2. Anatomie du foie</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3. Toxicité hépatique expérimentale de l'éthanol</b> .....	<b>5</b>
1.3.1. Ethanol .....	5
1.3.2. Métabolisme de l'éthanol .....	5
<b>1.4. Maladies alcooliques du foie</b> .....	<b>6</b>
1.4.1. Stéatose alcoolique .....	7
1.4.2. Fibrose hépatique .....	7
1.4.3. Cirrhose alcoolique .....	7
1.4.5. Éthanol et stress oxydatif .....	7
1.4.6. Activation des cellules de kupffer .....	8
<b>1.5. Toxicité aiguë et chronique de l'éthanol</b> .....	<b>8</b>
1.5.1 Toxicité aiguë .....	8
1.5.2. Toxicité chronique .....	9
<b>2. STRESS OXYDATIF</b> .....	<b>9</b>
<b>2.1. Définition</b> .....	<b>9</b>
<b>2.2. Différentes formes des radicaux libres</b> .....	<b>10</b>
<b>2.3. Biomarqueurs du stress oxydatif</b> .....	<b>11</b>
2.3.1. Dommages oxydatifs de l'ADN .....	11
2.3.2. Dommages oxydatifs des lipides membranaires .....	11
2.3.3. Dommages oxydatifs des protéines .....	12
2.3.5. Dommages oxydatifs des lipoprotéines .....	12
<b>2.4. Systèmes anti-oxydants</b> .....	<b>13</b>
2.4.1. Système antioxydant enzymatique .....	13

2.4.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques.....	14
<b>3. XANTHINE OXYDORÉDUCTASE .....</b>	<b>16</b>
3.1. Définition .....	16
3.2. Caractéristiques de la xanthine oxydoréductase (XOR) .....	16
3.3. Distribution de la XOR.....	17
3.4. Structure de la XOR.....	17
3.5. Rôle de la XOR .....	18
3.5.1. Rôle physiologique.....	18
3.5.2. Xanthine oxydoreductase en pathologie .....	19
3.6. Inhibiteurs de la XOR .....	20
3.6.1. Inhibiteur selon le mécanisme.....	20
3.6.2. Inhibiteurs selon la structure.....	21
3.6.3 Inhibiteur de type hybride .....	21
<b>4. NIGELLA SATIVA .....</b>	<b>21</b>
4.1. Généralités.....	21
4.2. Description botanique de la plante .....	22
4.3. Composition.....	22
4.3.1. Lipides et stérols .....	23
4.3.2. Composés aromatiques .....	23
4.3.3. Saponosides .....	23
4.3.4. Polyphénols et flavonoïdes.....	23
4.3.5. Alcaloïdes.....	24
4.3.6. Protéines.....	24
4.3.7. Vitamines et sels minéraux.....	24
4.4. Propriétés pharmacologiques de <i>Nigella sativa</i> .....	24
4.4.1. Activité Anti-inflammatoire .....	24
4.4.2. Activité antioxydante.....	25
4.4.3. Activité immuno-modulatrice.....	26
4.4.4. Activité Antidiabétique .....	26

4.4.5. Effet hepatoprotective .....	26
<b>4.5. Toxicité de <i>Nigella sativa</i> .....</b>	<b>27</b>
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>28</b>
<b>1. MATÉRIEL .....</b>	<b>30</b>
1.1. Matériel végétale .....	30
1.2. Animaux.....	30
<b>2. MÉTHODES .....</b>	<b>30</b>
2.1. Extraction et Fractionnement de l'huile totale de <i>Nigella sativa</i> .....	30
<b>2.2. Dosage de composés phénoliques des fractions de <i>Nigella sativa</i> .....</b>	<b>31</b>
2.2.1. Dosage des polyphénols totaux.....	31
2.2.2. Dosage des flavonoïdes .....	31
<b>2.3. Activité antioxydante <i>in vitro</i> .....</b>	<b>32</b>
2.3.1. Piégeage des radicaux libres.....	32
2.3.2. Peroxydation lipidique.....	33
2.3.3. Pouvoir réducteur.....	34
2.3.4. Activité anti-hémolyse oxydative .....	35
<b>2.4. Etude de l'effet hépatoprotecteur des fractions de <i>Nigella sativa</i> .....</b>	<b>35</b>
2.4.1. Etude de la toxicité des fractions de <i>Nigella sativa</i> .....	35
2.4.2. Induction de l'hépatotoxicité par l'éthanol .....	37
2.4.3. Etude de l'effet hépatoprotecteur des fractions de <i>Nigella sativa</i> .....	38
<b>3. ANALYSE STATISTIQUE.....</b>	<b>44</b>
<b>RÉSULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>44</b>
<b>1. RENDEMENT DE L'EXTRACTION .....</b>	<b>46</b>
<b>2. DOSAGE DE POLYPHÉNOLS ET FLAVONOÏDES.....</b>	<b>46</b>
<b>3. ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>48</b>
<b>3.1. Piégeage des radicaux libres .....</b>	<b>48</b>
3.1.1. Piégeage du $O_2^{\bullet-}$ .....	48
3.1.2. Piégeage du $OH^{\bullet}$ .....	50

3.1.3. Piégeage de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	51
<b>3.2. Test de peroxydation lipidique.....</b>	<b>52</b>
3.2.1. Test du blanchissement de β- carotène.....	53
3.2.2. Peroxydation de l'acide linoléique .....	53
3.2.3. Test du pouvoir réducteur .....	54
3.2.4. Test d'hémolyse oxydative .....	56
<b>4. EFFET HÉPATOPROTECTEUR DE L'HUILE TOTALE ET LA FRACTION NEUTRE... 60</b>	
<b>4.1. Évaluation de la toxicité des fractions de <i>Nigella sativa</i>.....</b>	<b>60</b>
4.1.1. Etude des paramètres biochimiques .....	60
4.1.2. Etude histo-pathologique .....	63
<b>4.2. Effet des fractions de <i>Nigella sativa</i> sur l'hépto-toxicité alcoolique .....</b>	<b>66</b>
4.2.1. Effet sur les paramètres biochimiques .....	66
4.2.2. Etude histopathologique .....	69
4.2.3. Effet des extraits sur les marqueurs du stress oxydative .....	72
4.2.4. Effet des extraits taux de la XOR et les anticorps anti-XOR.....	78
<b>7. DISCUSSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>83</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>86</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>87</b>

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Anatomie segmentaire du foie (Sibulesky, 2013). .....	5
<b>Figure 2.</b> Illustration des voies du métabolisme de l'éthanol. a : voie de l'alcool déshydrogénase (ADH) au niveau du cytoplasme. b: voie du système microsomal d'oxydation de l'éthanol (MEOS) au niveau du réticulum endoplasmique. c : voie de la catalase dans la membrane des peroxysomes. ....	6
<b>Figure 3.</b> Schéma des défenses antioxydantes enzymatiques (Bonnefont-Rouseelot, 2003). a : voie de la SOD, b : voie de la catalase, c et d : voie de GSH-Peroxydase. ....	13
<b>Figure 4.</b> Schéma des réactions d'éliminations des radicaux lipidiques par les vitamines E et C. (LOO•) : radical peroxyde lipidique, (LOOH) : hydroperoxyde lipidique, (Vit. E) vitamine E, (Vit. C) : vitamine C, (GSH) : glutathion réduit, (GSSG) : glutathion oxydé, (LA) : acide lipoïque, (DHLA) : acide déshydrolipoïque. ....	16
<b>Figure 5.</b> Structure de la XOR en domaines ; domaine Mo-proteine, domaine FAD, domaine Fe/S (Sato et al., 1995). ....	18
<b>Figure 6.</b> Mécanismes par lesquels les ROS produits par XOR peuvent induire l'inflammation ou les lésions ischémiques (Hannah et al., 2005). ....	20
<b>Figure 7.</b> <i>Nigella sativa</i> ; (a) plante entière, (b) fleurs et (c) graines. ....	22
<b>Figure 8.</b> Effet piègeur de l'anion superoxyde produit dans le système (xanthine/XOR) par l'huile totale et la fraction neutre des graines de <i>Nigella sativa</i> , et de $\alpha$ -Tocophérol. Les résultats sont représentés en pourcentage d'inhibition de l'anion superoxyde par rapport au contrôle positif. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais $\pm$ SD, *: $p \leq 0.05$ , **: $p \leq 0.01$ . ....	49
<b>Figure 9.</b> Effet piègeur de l'OH• par l'huile totale et la fraction neutre des graines de <i>Nigella sativa</i> , et de $\alpha$ -Tocophérol. Les résultats sont représentés en pourcentage d'inhibition du radical hydroxyle par rapport au contrôle positif. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais $\pm$ SD, *: $p \leq 0.05$ , **: $p \leq 0.01$ . ....	50
<b>Figure 10.</b> Effet piègeur de $H_2O_2$ par l'huile totale et la fraction neutre des graines de <i>Nigella sativa</i> , et de $\alpha$ -Tocophérol. Les résultats sont représentés en pourcentage d'inhibition du peroxyde d'hydrogène par rapport au contrôle positif. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais $\pm$ SD, **: $p \leq 0.01$ . ....	52

<b>Figure 11.</b> Cinétique de blanchissement du $\beta$ -carotène à 490 nm en absence et en présence et de huile totale et la fraction neutre de graines de <i>Nigella sativa</i> par rapport au contrôles positif (BHT) qui représente une absorbance maximale et les contrôles négatifs ( $H_2O$ et MeOH) qui représentent une absorbance minimale. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais $\pm$ SD. ....	53
<b>Figure 12.</b> Pourcentages d'inhibition de la peroxydation lipidique par les extraits de graines de <i>Nigella sativa</i> et de l' $\alpha$ -tocophérol. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais $\pm$ SD. ....	54
<b>Figure 13.</b> Pouvoir réducteur de l'huile totale et la fraction neutre des graines de <i>Nigella sativa</i> par rapport au contrôle positif $\alpha$ -catechine. Les résultats sont représentés sous forme des concentrations effectrice à 50% $CE_{50}$ . Chaque valeur représente la moyenne de trois essais $\pm$ SD, **: $p \leq 0.01$ . ....	55
<b>Figure 13.</b> Cinétique de l'hémolyse en présence de l'huile totale et de la fraction neutre des graines de <i>Nigella sativa</i> et de contrôle positif la vitamine. Les résultats sont représentés en temps de demi-hémolyse $HT_{50}$ . Chaque valeur représente la moyenne de trois essais $\pm$ SD. ....	57
<b>Figure 14.</b> Bilan rénal (Urée et Créatinine) de groupes de rats traités avec de l'huile totale (400 mg/kg) et de la fraction neutre (300 mg/kg) des graines de <i>Nigella sativa</i> pendant 4 semaine par rapport au groupe de rats normaux. Chaque valeur est représentée en tant que moyen $\pm$ SEM. ....	60
<b>Figure 15.</b> Glycémie de groupes de rats traités avec de l'huile totale (400 mg/kg) et de la fraction neutre(300 mg/kg) des graines de <i>Nigella sativa</i> pendant 4 semaine par rapport au groupe de rats normaux. Chaque valeur est représentée en tant que moyen $\pm$ SEM. ....	61
<b>Figure 16.</b> Bilan lipidique (Cholestérol et Triglycéride) des groupes de rats traités avec de l'huile totale (400 mg/kg) et de la fraction neutre (300 mg/kg) des graines de <i>Nigella sativa</i> pendant 4 semaine par rapport au groupe de rats normaux. Chaque valeur est représentée en tant que moyen $\pm$ SEM. ....	61
<b>Figure 18.</b> Coupes histologiques du foie des groupes des rats ; A: groupe témoin, tissu hépatique normale. B: rats traités avec de l'huile totale (400mg/kg) pendant 4 semaines, tissu hépatique conservé. C: rats traités avec la fraction neutre (300 mg/kg) pendant 4 semaines, tissu hépatique conservé .....	64
<b>Figure 19.</b> Coupes histologiques des reins des groupes des rats ; A: groupe témoin, tissu rénal normale. B: rats traités avec de l'huile totale (400mg/kg) pendant 4 semaines, tissu rénal conservé. C: rats traités avec la fraction neutre (300 mg/kg) pendant 4 semaines, tissu rénal conservé. ....	65

<b>Figure 20.</b> Glycémie des groupes de rats alcooliques traités avec l'huile totale et la fraction neutre. ....	67
<b>Figure 21.</b> Bilan hépatique des groupes de rats alcooliques traités avec l'huile totale et la fraction neutre. ....	68
<b>Figure 22.</b> Bilan lipidique des groupes de rats alcooliques traités avec l'huile totale et la fraction neutre. ....	67
<b>Figure 23.</b> Bilan rénale Bilan hépatique des groupes de rats alcooliques traités avec l'huile totale et la fraction neutre. ....	69
<b>Figure 24.</b> Effet des fractions des graines de <i>Nigella sativa</i> sur les tissus hépatiques des rats traités avec de l'éthanol. a : tissu hépatique de rat traité avec de l'alcool, b : tissu Hépatique de rats normal, c : tissu hépatique de rat traité avec NAC, d : tissu hépatique de rat traité avec l'huile totale, e : tissu hépatique de rat traité avec la fraction neutre. ....	71
<b>Figure 25.</b> Effet des fractions de <i>Nigella sativa</i> sur les marqueurs du stress oxydatif au niveau tissulaire. Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM, (N = 8); *: $p \leq 0.05$ , **: $p \leq 0.01$ , *** : $p \leq 0.001$ une différence significative contre le groupe de rats traités par l'éthanol. ....	74
<b>Figure 26.</b> Effet des fractions de <i>Nigella sativa</i> sur les marqueurs du stress oxydatif au niveau plasmatique. Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM, (N = 8); * $p < 0.05$ une différence significative contre le groupe d'animaux traités par l'éthanol. ....	75
<b>Figure 27.</b> Caractérisation de la XOR purifiée à partir du lait humain. (a) Spectre d'absorption en UV-Vis (250 – 700) de la XOR purifiées par chromatographie d'affinité sur héparine-agarose. (b) SDS-PAGE (10%) de la XOR purifiée par chromatographie d'affinité sur le Gel d'héparine: 2- fractions brute de la XOR, 3- XOR après la chromatographie, 4- XOR avant la chromatographie, 1 et 5- protéines standards de poids moléculaires (Myosinne: 205 KDa, B- galactosidase: 116 KDa, phosphorylase: 97 KDa, BSA: 66 KDa, albumine d'œuf: 45 KDa et anydrase carbonique: 29 KDa). ....	79
<b>Figure 28.</b> Taux de la XOR (A) dans l'homogénat du foie, (B) dans le sérum de rats traités par l'EtOH, par NAC, par HT et par FN. Le lot de rats non traités est utilisé comme contrôle, **: $p \leq 0.01$ , *** : $p \leq 0.001$ . ....	80
<b>Figure 29.</b> Taux des anticorps anti-XOR (A) dans l'homogénat du foie, (B) dans le sérum de rats traités par l'EtOH, par NAC, par HT et par FN. Le lot de rats non traités est utilisé comme contrôle. **: $p \leq 0.01$ . ....	80

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b> Les différentes formes des espèces réactives de l'oxygène. ....	11
<b>Tableau 2.</b> La classification botanique de <i>Nigella sativa</i> (Guignard, 2001). ....	22
<b>Tableau 3.</b> Différents composants du régime Lieber-DeCarli liquide et le contrôle liquide.....	37
<b>Tableau 4.</b> Pourcentages en calories du régime de Lieber-DeCarli liquide et le régime contrôle.....	37
<b>Tableau 5.</b> Différents groupes expérimentaux. ....	38
<b>Tableau 6.</b> Rendement d'extraction de l'huile totale et la fraction neutre à partir des graines de <i>Nigella sativa</i>	46
<b>Tableau 7.</b> Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes. ....	46
<b>Tableau 8.</b> Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans les extraits de graines de <i>Nigella sativa</i> obtenus par différents solvants.....	47
<b>Tableau 9.</b> Valeurs des $IC_{50}$ des extraits de <i>Nigella sativa</i> et l' $\alpha$ -tocophérol.....	49
<b>Tableau 10.</b> Les valeurs $IC_{50}$ des extraits de <i>Nigella sativa</i> et le standard $\alpha$ -Tocophérol .....	51
<b>Tableau 9.</b> Les valeurs $IC_{50}$ des extraits de graines de <i>Nigella sativa</i> et de $\alpha$ -Tocophérol.....	52
<b>Tableau 10.</b> Les $CE_{50}$ de l'huile totale et de la fraction neutre des graines de <i>Nigella sativa</i> et de l' $\alpha$ -Catéchine. .....	55
<b>Tableau 11.</b> Temps de demi-hémolyse $HT_{50}$ des extraits des graines de <i>Nigella sativa</i> et de l'acide ascorbique comme contrôle. Chaque valeur est représentée en tant que moyen $\pm$ SD ( $n = 3$ ). Les comparaisons sont faites par rapport au contrôle. ** : $p \leq 0.01$ , *** : $p \leq 0.001$ , ns: non significatif.....	56
<b>Tableau 14.</b> Bilan hépatique, lipidique et rénal des groupes de rats traités avec de l'huile totale (400 mg/kg) et de la fraction neutre (300 mg/kg) des graines de <i>Nigella sativa</i> pendant 4 semaines par rapport au groupe de rats normaux. Chaque valeur est représentée en tant que moyen $\pm$ SEM. ....	62
<b>Tableau 15.</b> Effets des fractions de <i>Nigella sativa</i> sur les paramètres biochimiques chez les groupes expérimentaux. ....	69

<b>Tableau 16.</b> Effets des extraits de <i>Nigella sativa</i> sur les changements histologiques du foie, n=8. ....	70
<b>Tableau 17.</b> Effet des fractions de <i>Nigella sativa</i> sur certains marqueurs du stress oxydatif tissulaire chez les rats atteints de l'hépatotoxicité. Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM, (N = 8); * p<0.05 différence significative contre le groupe contrôle traité par l'éthanol.....	72
<b>Tableau 18.</b> Effet des fractions de <i>Nigella sativa</i> sur certains marqueurs du stress oxydatif plasmatique chez les rats atteints d'hépatotoxicité. Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM, (N = 8); * p<0.05 différence significative contre le groupe contrôle traité par l'éthanol.....	73
<b>Homogénat (ng/mg)</b>	
<b>Sérum (ng/ml)</b> .....	81
<b>Tableau 19.</b> Taux de la XOR et les Ac anti-XOR plasmatique et tissulaire chez les groupes expérimentaux.....	81

# **Introduction**

Les pathologies hépatiques d'origine alcooliques constituent un problème mondial de santé publique. La consommation d'éthanol cause diverses lésions hépatiques ; stéatose, hépatite alcoolique aiguë, fibrose et cirrhose voir carcinome hépatocytaire. Les mécanismes impliqués dans le développement des maladies hépatiques alcooliques restent mal élucidés. Toutefois, le degré de sévérité de ces maladies est lié à la consommation prolongée excessive d'alcool. De nombreux arguments montrent que l'alcool est responsable au niveau hépatique d'un stress oxydant résultant d'une perturbation du rapport oxydants/antioxydants. La plupart des études évoquent l'association entre les marqueurs biologiques du stress oxydant et les atteintes hépatiques liées à l'alcoolisme.

Parmi les sources du stress oxydatif, l'enzyme xanthine oxydoréductase (XOR) localisée dans le foie génère l'anion superoxyde au cours de son métabolisme. Des taux élevés de la XOR ont été observés dans divers pathologies hépatiques, d'où l'intérêt croissante pour ces rôles pathologiques potentiels

Au cours des dernières années, un des objectifs de la recherche scientifique est de trouver de nouvelles molécules bioactives à partir de sources naturelles dotées d'un potentiel thérapeutique important. En 2001, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), a estimé que 80% de la population des pays en voie de développement a toujours eu recours à la médecine traditionnelle dans les soins primaires. Parmi ces plantes, *Nigella sativa*, elle est considérée comme une des plantes médicinales les plus utilisées à travers le monde. Les études récentes montrent des propriétés curatives prometteuses des différents extraits de cette plante (anti-tumorales, hépato-protectrices, immunostimulantes et anti-oxydantes). Ce travail vise à évaluer l'effet hépatoprotecteur des extraits de *Nigella sativa* contre la toxicité alcoolique et ce en estimant l'activité antioxydante de l'huile totale et sa fraction neutre *in vitro* en premier temps. Dans un deuxième temps, nous nous intéresserons à l'étude de l'effet hépatoprotecteur de l'huile totale et de sa fraction neutre *in vivo* par le biais de ; **(i)** marqueurs du stress oxydatif plasmatique et tissulaire, **(ii)** bilans biochimiques plasmatiques (hépatique, rénale et lipidique) et **(iii)** étude histologique du foie. A la fin, nous évaluerons l'expression de la XOR et les anticorps anti-XOR plasmatique et tissulaire en tant que marqueur du stress oxydatif hépatique généré par l'éthanol.

# **Étude bibliographique**

# 1. Hépatotoxicité induite par l'éthanol

## 1.1. Foie cible de la toxicité

Le foie est l'organe principal pour le métabolisme des produits chimiques et des aliments. Il régule la production, le stockage et la libération des sucres, des graisses et du cholestérol (Desmeules et *al.*, 1999; Plaa et Charbonneau, 2001), la synthèse des facteurs de coagulation du sang et la régulation de l'homéostasie de l'organisme. A la différence des autres cellules, les hépatocytes produisent de l'énergie pour leurs propres besoins et pour d'autres tissus (Desmet et *al.*, 1999).

Il est important de retenir que les cellules péri-veineuses du foie sont potentiellement les plus sensibles à une nécrose ischémique. Il est suggéré que la consommation d'alcool, des conditions hypoxiques sont des facteurs suffisants pour endommager les hépatocytes (Mezey, 1984; Tsukamoto et Xi, 1989). Puisque l'expression de cytochrome P2E1(CYP2E1) est plus élevée dans cette région (Kato et *al.*, 1990), les hépatocytes dans cette zone contiennent moins de facteurs antioxydants (le glutathion réduit, le glutathion peroxydase). Lorsqu'une peroxydation lipidique se produit au niveau des cellules péri-veineuses, à cause d'agents oxydants et des radicaux libres, l'impact sera plus important et la capacité de détoxification des hépatocytes dans la zone péri-veineuse est fortement réduite (Kera et *al.*, 1987).

## 1.2. Anatomie du foie

Malgré la complexité de ses fonctions, le foie a un aspect homogène, ce qui rend l'anatomie hépatique un sujet difficile d'étude (Juza et *al.*, 2014). Le foie est le plus gros organe solide du corps, avec un poids représentant environ 2% du poids du corps humain. Selon la classification de Couinaud, le foie est divisé en huit segments fonctionnels indépendamment. Chaque segment a son propre pédicule portal, composé d'une branche de l'artère hépatique, d'une branche portal, d'une voie biliaire et une branche veineuse hépatique distincte (figure 1) (Soler et *al.*, 2001; Liau et *al.*, 2004).

Au microscope, les hépatocytes des mammifères sont organisés en cordes unicellulaires avec deux domaines basolatéraux. Des jonctions serrées sont formées entre les hépatocytes adjacents et la communication entre les hépatocytes se produit par des jonctions d'espaces (Mc Cuskey et Sipes, 1997).

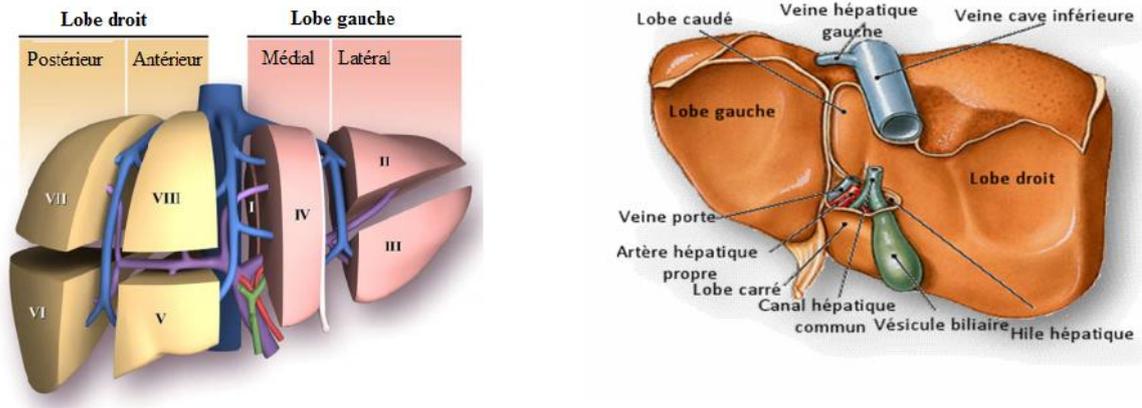


Figure 1. Anatomie segmentaire du foie (Sibulesky, 2013).

### 1.3. Toxicité hépatique expérimentale de l'éthanol

De nombreuses molécules toxiques, médicamenteuses ou non, peuvent être à l'origine de l'hépatotoxicité aiguë qu'elle soit dose-dépendante ou non. Les principaux produits toxiques sont le paracétamol, les antibiotiques, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), le tétrachlorure de carbone ( $\text{CCl}_4$ ) et les alcools comme l'éthanol. Nous intéresserons ici à l'étude de la toxicité hépatique induite par l'éthanol.

#### 1.3.1. Ethanol

L'éthanol est un alcool, incolore, volatil, d'odeur plutôt agréable, et très inflammable. Il est également miscible à l'eau. Son contenu énergétique correspond à 7 kcal/g. Il possède les propriétés générales des alcools primaires (réactions d'oxydation, déshydrogénation, déshydratation et estérification). Sa formule chimique est  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ .

#### 1.3.2. Métabolisme de l'éthanol

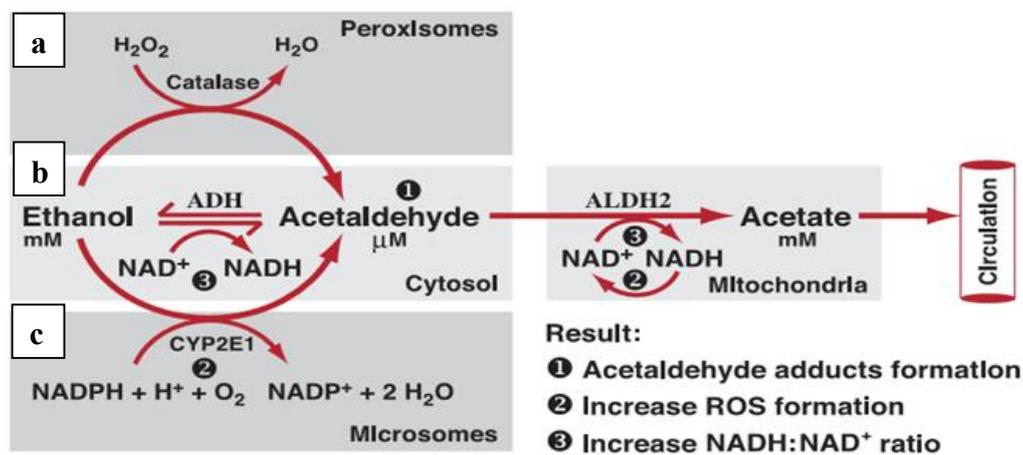
Environ 90% de l'alcool est métabolisé dans le foie. L'hépatocyte contient les trois principales voies métaboliques de l'alcool, Il est éliminé grâce à une série des réactions d'oxydation.

- 1) la voie de l'alcool déshydrogénase (ADH). L'éthanol est dégradé par l'ADH au niveau du cytoplasme des hépatocytes, en acétaldéhyde. Ce dernier est toxique et la réaction est réversible,
- 2) Une autre voie de métabolisme de l'éthanol est le système microsomal d'oxydation de l'éthanol (MEOS) au niveau du réticulum endoplasmique (Lieber et Decarli, 1974). Dans cette voie, le cytochrome P2E1 (CYP2E1 superfamille des CYP450) est

l'enzyme principale impliquée dans l'oxydation de l'éthanol et assure la formation d'acétaldéhyde dans les peroxysomes (Cederbaum, 2006; Lieber, 2004),

- 3) Une troisième voie est catalysée par la catalase dans la membrane des peroxysomes (Wu et Cederbaum, 2003),

L'acétaldéhyde formé est transformé en acétate. Cette réaction est principalement réalisée par l'aldéhyde déshydrogénase mitochondriale (ALDH) et transforme le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) à sa forme réduite (NADH) (Lieber, 2004 ; Wu et *al.*, 2006). L'acétate résultant est instable et se décompose en eau (H<sub>2</sub>O) et en dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) dans les tissus périphériques (Lieber, 2004; Wu et *al.*, 2006) (Figure 2).



**Figure 2.** Illustration des voies du métabolisme de l'éthanol. a : voie de l'alcool déshydrogénase (ADH) au niveau du cytoplasme. b : voie du système microsomal d'oxydation de l'éthanol (MEOS) au niveau du réticulum endoplasmique. c : voie de la catalase dans la membrane des peroxysomes.

#### 1.4. Maladies alcooliques du foie

L'éthanol induit un certain nombre de changements métaboliques dans le foie. Son utilisation excessive à long terme conduit au développement de la stéatose, la fibrose et la cirrhose (Kumar et *al.*, 2003). L'acétaldéhyde peut se fixer chimiquement à des protéines, des lipides ou à l'acide désoxyribonucléique, les molécules hybrides qui en résultent sont appelées adduits (Sorrell et Tuma, 1987). La formation de ces adduits peut contribuer à une lésion hépatique alcoolique, soit en altérant la fonction de la protéine affectée ou en stimulant le système immunitaire qui, à son tour, détruit ou altère les cellules saines du foie (Israel et *al.*, 1988).

### 1.4.1. Stéatose alcoolique

C'est la première et la plus courante des affections hépatiques induites par la consommation d'alcool. Il s'agit d'une accumulation, à des niveaux variés, de graisses (triglycérides, des phospholipides et des esters de cholestérol) sous forme de macro-vésicules ou microvésicules dans les hépatocytes. Au cours du métabolisme de l'éthanol à l'acétate, le rapport de NADH/ NAD<sup>+</sup> dans la cellule augmente ce qui provoque l'inhibition de la  $\beta$ -oxydation des acides gras dans le foie (Baraona et Lieber, 1979). Le blocage se situe au niveau de l'acétyl-CoA produit par  $\beta$ -oxydation. Cette augmentation de NADH réduit la bêta oxydation et l'activité de l'acide tricarboxylique entraînant une augmentation des acides gras libres, et la synthèse de triacylglycérol (Galli et *al.*, 2005).

### 1.4.2. Fibrose hépatique

La fibrose hépatique est caractérisée par l'accumulation excessive de collagène et d'autres protéines de la matrice extracellulaire. L'acétaldéhyde agit sur les cellules satellites hépatiques dans le foie (CSH) d'une manière paracrine, les transforment en myofibroblastes et donc la surproduction des protéines responsables de la fibrose (collagène de type I) (Bataller et Brenner, 2005 ; Friedman, 2008). Aussi, au cours de l'inflammation, les cellules de kupffer sécrètent le facteur de transformation de la croissance (TGF- $\beta$  pour Transforming Growth Factor  $\beta$ ) qui stimulent les cellules CSH pour produire le collagène (Tilg et Diehl, 2000).

### 1.4.3. Cirrhose alcoolique

La cirrhose hépatique alcoolique est la forme définitive et irréversible de la maladie alcoolique du foie, dans laquelle le dépôt de collagène se produit dans l'espace de Disse, et autour des veines centrales. C'est la forme grave d'atteinte hépatique alcoolique et généralement de type micronodulaire ; le sang ne circule pas librement à travers le foie, conduit à une hypertension portale (Schuppan et Afdhal, 2008).

### 1.4.5. Éthanol et stress oxydatif

Le métabolisme de l'éthanol est fortement impliqué dans l'induction du stress oxydatif, par le système MEOS en favorisant la production des enzymes cytosoliques; xanthine oxydase et aldéhyde oxydase (Sergent *et al.*, 2001). Des études ont montré que le cytochrome P2E1(CYP2E1) pourrait être fortement impliqué dans le stress oxydant et dans les lésions hépatiques induites par l'éthanol en stimulant divers agents réactifs, générant ainsi les ERO tels que O<sub>2</sub><sup>•-</sup> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ces molécules attaquent les lipides membranaires, certaines

protéines et provoque une altération des récepteurs membranaires, des enzymes et des acides nucléiques, ce qui va créer un risque de mutation et de cancérisation (Cederbaum, 2006; Lieber, 2004).

De nombreuses études ont montré que la consommation aiguë ou chronique d'alcool provoque une augmentation du fer non hémique au niveau hépatique (Cederbaum, 2001). Le fer favorise le stress oxydatif en catalysant la conversion d'oxydants moins réactifs tels que les superoxydes ( $H_2O_2$ ) en oxydants puissants tels que les radicaux hydroxyles (OH) (Whitfield *et al.*, 2001).

#### **1.4.6. Activation des cellules de kupffer**

Dans les circonstances normales, des quantités infimes d'endotoxines peuvent passer à travers la muqueuse intestinale dans la circulation sanguine. Cependant, l'ingestion d'alcool provoque la dysbiose entérique qui augmente la perméabilité intestinale aux endotoxines et par conséquent, augmente l'accès à la circulation et dans le foie (Yan *et al.*, 2011). Après avoir atteint le foie, les endotoxines provoquent l'activation des cellules de Kupffer (Enomoto *et al.*, 2001). Dans les cellules de Kupffer, les LPS interagissent avec les récepteurs Toll-like4 (TLR4) pour activer la voie de signalisation de la réponse de différenciation myéloïde primaire 88 (MyD88), conduisant ainsi à la production du stress oxydatif et des cytokines pro-inflammatoires (Zhao *et al.*, 2008 ; Petrsek *et al.*, 2011).

La consommation d'alcool active également les fractions C3 et C5 du complément, qui activent, à leur tour, les cellules de Kupffer en se fixant sur leurs récepteurs spécifiques. L'activation du complément est suivie par la production du facteur de nécrose tumorale (TNF- $\alpha$ ) et de l'induction de lésions hépatocytaires (Cohen *et al.*, 2010; Nath *et al.*, 2011).

### **1.5. Toxicité aiguë et chronique de l'éthanol**

#### **1.5.1 Toxicité aiguë**

La toxicité aiguë de l'éthanol est faible par inhalation et par ingestion, et elle est négligeable par contact cutané. Pour les diverses espèces étudiées (souris, rats, cobayes, lapins, chiens), les DL50 par voie orale sont comprises entre 5 et 20 g/kg (Clayton et Clayton, 2001). Quelque soit la voie d'administration et l'espèce considérée, les symptômes observés sont très semblables à ceux décrits chez l'homme. Ce sont essentiellement ceux d'une excitation puis d'une dépression du système nerveux central : ataxie, prostration, somnolence, paralysie et dyspnée. La mort survient par défaillance respiratoire ou circulatoire après une

baisse progressive de la tension artérielle. L'examen anatomo-pathologique révèle des lésions hépatiques : œdème des cellules périphériques des lobules, accumulation de lipides notamment de triglycérides (Clayton et Clayton, 2001).

### **1.5.2. Toxicité chronique**

La toxicité chronique à l'éthanol dépend de la voie d'administration (orale ou respiratoire) de la quantité ingérée et de la durée d'exposition. Les effets se manifestent sur le foie et le système hématopoïétique à des doses élevées. Aucun effet systémique n'a été observé par voie cutanée (Clayton et Clayton, 2001). Chez le rat, l'administration pendant 12 semaines d'éthanol dans l'eau de boisson à la concentration de 15 % (environ 10 g/kg) provoque un ralentissement de la croissance pondérale et une stéatose hépatique. Cette même stéatose peut se manifester par administration pendant 14 semaines d'un régime dans lequel l'éthanol représente 33 % de l'apport calorique (environ 12 g/kg). Une diminution du taux d'érythrocytes, de l'hématocrite, de la concentration en hémoglobine et du taux de lymphocytes, est également observée à une dose de 8 g/kg/j pendant 10 mois (Clayton et Clayton, 2001).

## **2. Stress oxydatif**

### **2.1. Définition**

Le stress oxydatif, parfois appelé stress oxydant, se définit comme étant un déséquilibre de la balance entre les oxydants et les antioxydants en faveur des premiers (Pincemail et *al.*, 2000). Il se développe lorsque les radicaux libres, molécules oxydantes, sont produits plus rapidement qu'ils ne peuvent être neutralisés par l'organisme (Pincemail et *al.*, 1999). Ce RL retrouve sa stabilité en participant à des réactions chimiques dont la conséquence est l'oxydation des lipides membranaires, des acides aminés, des glucides et des acides nucléiques (Favier, 2003; Dalton et *al.*, 2002). A long terme, ceci peut contribuer à l'apparition de diverses pathologies comme les cancers ou les maladies cardio-vasculaires. Dans un souci de prévention, il conviendra donc de disposer d'outils performants permettant d'évaluer correctement le statut du stress oxydant chez un individu afin d'apporter les corrections nécessaires pour optimiser nos défenses antioxydantes et diminuer les dommages oxydatifs induits par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) en général au niveau de l'ADN, des protéines et des lipides (Halliwell et Gutteridge, 2007).

## 2.2. Différentes formes des radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié. Extrêmement instable, le radical libre peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairer son électron. Il peut soit arracher un électron (se comportant comme un oxydant), soit céder un électron (agissant comme un réducteur). La première réaction conduit généralement à la formation en chaîne de nouveaux radicaux. Ceci explique le fait que la production d'un premier radical libre peut causer des lésions importantes dans la cellule (Milane, 2004).

L'O<sub>2</sub> est une molécule biradicalaire formée de deux atomes présentant, sur leurs orbitales externes, deux électrons non appariés. Il est donc susceptible de capter facilement 1<sup>ère</sup> puis 2<sup>ème</sup> électrons pour être partiellement réduit en (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) puis en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'appellation espèces réactives de l'oxygène (ERO) inclut les radicaux libres de l'oxygène: anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>) mais aussi certains dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Fulbert et Cals, 1992 ; Yoshikawa et al., 2000) (tableau 1). Les facteurs exogènes associés à une production accrue et/ou à réduction dans l'élimination des radicaux libres sont également très variés. Parmi ces facteurs, on retrouve :

- L'alimentation (antibiotiques, alcool, café, aliments riches en protéines et/ou lipides, faible consommation d'antioxydants) (Moller et al., 1996 ; Hu et al., 2006),
- Le CO<sub>2</sub> atmosphérique (Bentes de Souza et al., 2003a),
- Les polluants (fumée de cigarette, pollution atmosphérique (SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, hydrocarbures), métaux occupationnels (métaux de transition tels le mercure, le fer, le cadmium et le nickel, l'arsenic, l'amiante). Les métaux lourds ayant une grande affinité avec les groupements sulfhydryles (-SH), inactivent facilement les antioxydants contenant du soufre (Valko et al., 2005 ; Moller et al., 1996),
- Les médicaments (traitements contre le cancer, psoralène), les radiations (ionisantes, ultraviolets, micro-ondes) et l'absorption dermique (insecticides, médicaments) (Moller et al., 1996).

**Tableau 1.** Les différentes formes des espèces réactives de l'oxygène.

<b>Radicaux libres</b>	<b>Structure chimique</b>
Radical hydroxyle	$\text{OH}^\bullet$
Radical hydroperoxyde	$\text{HOO}^\bullet$
Radical alkoxyde	$\text{LO}^\bullet$
Radical oxyde nitrique	$\text{NO}^\bullet$
Radical peroxyde	$\text{ROO}^\bullet$
Peroxyde d'hydrogène	$\text{H}_2\text{O}_2$
Peroxynitrite	$\text{ONOO}^\bullet$
Anion superoxyde	$\text{O}_2^{\bullet-}$
Oxygène singlet	$1\text{O}_2$

## 2.3. Biomarqueurs du stress oxydatif

### 2.3.1. Dommages oxydatifs de l'ADN

Les espèces réactives de l'oxygène constituent la source majeure des dommages endogènes de l'ADN. Elles peuvent induire de nombreuses modifications telle que ; des lésions de bases nucléotidiques (purines et pyrimidines), La guanine, par exemple, peut réagir avec  $\text{OH}^\bullet$  pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, il s'associe avec l'adénine, entraînant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations des messages génétiques impliqués dans le déclenchement du cancer et du vieillissement (Von Sonntag, 1987; Favier, 2003).

### 2.3.2. Dommages oxydatifs des lipides membranaires

Les lipides, en particulier, les acides gras polyinsaturés, sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle. Ce radical est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons des acides gras poly-insaturés (AGPI): c'est la phase d'initiation. Le radical lipidique réagit avec une molécule d'oxygène pour former un radical peroxyde (ROO), suffisamment réactif pour arracher un  $\text{H}^+$  à un AGPI voisin, propageant ainsi la réaction (Atkin et al., 2006). Il en résulte une altération de la fluidité membranaire qui conduit inévitablement à la mort cellulaire. La peroxydation lipidique génère une variété de produits de décomposition relativement stables, principalement des

aldéhydes  $\alpha,\beta$ -insaturés tels le malondialdéhyde, le 4-hydroxy-2- nonéanal, le 2-propéanal et les isoprostanes qui peuvent être dosés dans le plasma et l'urine comme marqueurs indirects du stress oxydatif (Gardès et *al.*, 2003).

### **2.3.3. Dommages oxydatifs des protéines**

Les acides aminés possèdent des susceptibilités différentes *vis-à-vis* des ERO. Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent une fonction thiol (SH) (Favier, 2003). Les protéines les plus réactives sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine. Lorsque les radicaux libres réagissent avec des protéines saines, plus précisément avec le groupement radical (chaîne latérale) des acides aminés, il en résulte la formation de groupements carbonyles. Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques (enzyme, anti-enzyme, transporteurs, récepteurs...) et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases et notamment du protéasome (Favier, 2003). Le dosage plasmatique des protéines carbonylées est actuellement le marqueur d'oxydation avancée des protéines le plus utilisé, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, pour mesurer les dommages oxydatifs des protéines (Halliwell et Gutteridge, 2007).

### **2.3.5. Dommages oxydatifs des lipoprotéines**

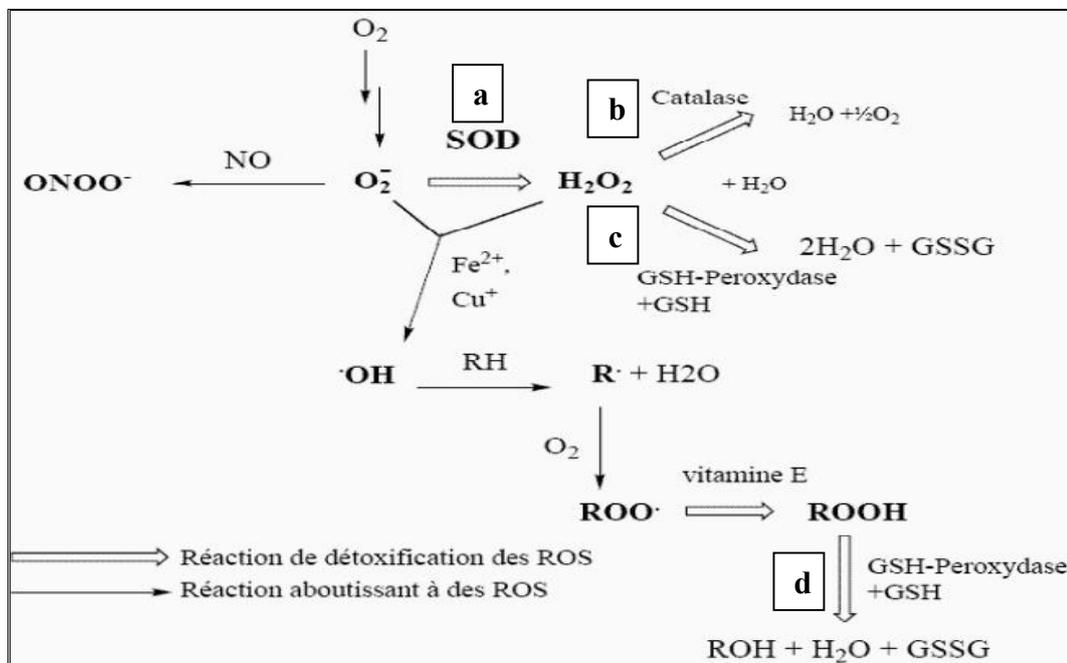
Les lipoprotéines sont de grands complexes de protéines et de lipides, hydrosolubles, qui transportent massivement les lipides dans tout l'organisme. La coque externe est une mono couche de phospholipides contenant du cholestérol et une ou plusieurs molécules protéiques appelées apolipoprotéines; la partie centrale contient des triglycérides, des esters de cholestérol et de petites quantités d'autres substances hydrophobes, comme des vitamines liposolubles. L'attaque radicalaire des lipoprotéines circulantes aboutit à la formation de molécules LDL oxydées, qui seront captées par des récepteurs spécifiques des macrophages. Ces macrophages se transforment petit à petit en cellules spumeuses (rôle important dans les premières étapes de l'athérosclérose) (Nakajima et *al.*, 2006). En outre, ces LDL oxydées sont immunogènes et les complexes immuns formés peuvent activer la voie classique du complément et générer la sécrétion de cytokines proinflammatoires par les macrophages (Saad et *al.*, 2006).

## 2.4. Systèmes anti-oxydants

Les radicaux libres sont produits spontanément et de manière continue au sein de notre organisme. Le maintien d'un niveau non cytotoxique des ERO est assuré par des systèmes antioxydants. Un déficit ou un dysfonctionnement de ces systèmes engendre une augmentation des dommages tissulaires. Les antioxydants sont des systèmes enzymatiques ou non-enzymatiques (Germain *et al.*, 2003 ; Gardès *et al.*, 2003).

### 2.4.1. Système antioxydant enzymatique

Les antioxydants enzymatiques sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ERO, parmi ces enzymes on trouve, la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion reductase (Figure 3).



**Figure 3.** Schéma des défenses antioxydantes enzymatiques (Bonnefont-Rouseelot, 2003). a : voie de la SOD, b : voie de la catalase, c et d : voie de GSH-Peroxydase.

#### 2.4.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)

Cette enzyme catalyse la dismutation de l' $O_2^{\cdot -}$  en  $H_2O_2$ . La SOD existe sous trois isoformes qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD). Il a été récemment montré que la Cu/Zn-SOD était également présente dans l'espace inter-membranaire (Okado-Matsumoto et Fridovich, 2001; Sturtz *et al.*, 2001). La distribution de

ces différentes isoformes varie selon le tissu. Dans le muscle, environ 65 à 85% de l'activité de la SOD se trouvent dans le cytosol tandis que les 15 à 35% restants sont localisés dans les mitochondries. Cependant, la Mn-SOD semble indispensable à la vie puisque sa mutation est non viable (Huang et *al.*, 2000 ; Sentman et *al.*, 2006).

#### **2.4.1.2. Glutathion peroxydase (GPx) et reductase (GR)**

La glutathion peroxydase (GPx) agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du  $H_2O_2$  en  $H_2O$  et  $O_2$ . Lors de cette réaction, deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion-disulfure (GSSG) (Mates et *al.*, 1999; Powers et Lennon, 1999). Il existe également une glutathion peroxydase associée à la membrane mitochondriale, la phospholipide-hydroperoxyde glutathion peroxydase (PHGPx) qui est spécifiquement impliquée dans la diminution de la peroxydation lipidique (Nomura et *al.*, 2000). La glutathion réductase, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons. En effet, la concentration cellulaire en glutathion étant limitée, il est nécessaire de le réduire constamment pour que la GPx maintienne sa fonction. Ces deux enzymes sont présentes dans le cytosol et dans les mitochondries (Avissar et *al.*, 1989).

#### **2.4.1.3. Catalase**

La catalase est responsable de l'élimination d' $H_2O_2$  par une transformation en  $H_2O$  et  $O_2$ . Contrairement à la GPx, l'affinité de la catalase pour l' $H_2O_2$  est élevée seulement lorsque les teneurs en peroxyde d'hydrogène sont accrues (Mates et *al.*, 1999; Powers et Lennon, 1999). Cette enzyme est considérée la source majeure de protection (Milane, 2004; Borg et Reeber, 2008). Elle est abondante dans le foie et les globules rouges. Elle se retrouve préférentiellement dans les peroxysomes et en plus faible quantité dans le cytosol. La catalase est surtout active lorsque le niveau du stress oxydatif est élevé ou que la quantité de glutathion peroxydase est limitée et elle joue un rôle significatif en permettant d'éliminer l'excès de peroxyde d'hydrogène afin que la réaction de Fenton ne puisse s'amplifier (Cantin, 1999).

#### **2.4.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques**

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie d'antioxydants nous retrouvons les oligoéléments, la glutathion réduit (GSH), l'ubiquinone, le cytochrome c et les vitamines E et C.

### 2.4.2.1. Oligoéléments

Le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique du cuivre et du zinc, la catalase du fer et la GPx du sélénium. Cependant, certains oligoéléments, notamment le fer, lorsqu'ils sont en excès dans l'organisme et sous leur forme réduite, peuvent avoir une action prooxydante (réaction de Fenton, d'Haber-Weiss) (Buldak et *al.*, 2014).

### 2.4.2.2. Glutathion

Le glutathion réduit (GSH), réduit le peroxyde d'hydrogène et/ou les peroxydes organiques grâce à la réaction catalysée par la glutathion peroxydase (GPx). Il peut aussi réduire les niveaux de peroxydation lipidique et les radicaux formés par l'oxydation des vitamines E et C (Power et Lennon, 1999 ; Packer et *al.*, 2001). Le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydant car plus le flux d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé est augmenté (Milane, 2004).

### 2.4.2.3. Ubiquinones et cytochrome c

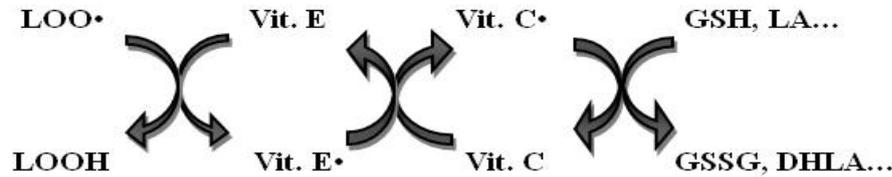
Les ubiquinones, sous leur forme semi-radicalaire, jouent un rôle fondamental dans la production de ERO. Inversement, il a été démontré que la forme "ubiquinol" agit comme antioxydant (Power et Lennon, 1999). L'ubiquinol protège les membranes de la peroxydation lipidique par une diminution de la formation et de la propagation des radicaux peroxylys. L'ubiquinone est également impliquée dans la régénération de la vitamine E ce qui amplifie son rôle protecteur contre les ERO (Packer et *al.*, 1997).

Le cytochrome c présent dans l'espace intermembranaire a un rôle de détoxification en captant l'électron libre d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> produit au niveau de la chaîne respiratoire. Ainsi, il cède cet électron au complexe IV formant du cytochrome c oxydé et de l'H<sub>2</sub>O (Skulachev, 1998).

### 2.4.2.4. Vitamine E et vitamine C

Les vitamines E ( $\alpha$ -tocophérol) et C (acide ascorbique) semblent être les plus importants dans la lutte contre le stress oxydant. La vitamine E étant liposoluble, elle se fixe aux membranes et peut ainsi séquestrer les radicaux libres empêchant la propagation des réactions de peroxydation lipidique (Packer et *al.*, 1997; Evans, 2006). La vitamine C, hydrosoluble, se

trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire et peut capter directement l' $O_2^{\cdot-}$  et l' $OH^{\cdot}$ . Elle peut aussi réduire le radical  $\alpha$ -tocophérol et permet une meilleure efficacité de la vitamine E (Packer et *al.*, 1997; Evans, 2006) (Figure 4).



**Figure 4.** Schéma des réactions d'éliminations des radicaux lipidiques par les vitamines E et C. (LOO•) : radical peroxyde lipidique, (LOOH) : hydroperoxyde lipidique, (Vit. E) vitamine E, (Vit. C) : vitamine C, (GSH) : glutathion réduit, (GSSG) : glutathion oxydé, (LA) : acide lipoïque, (DHLA) : acide déshydro-lipoïque.

### 3. Xanthine oxydoréductase

#### 3.1. Définition

La xanthine oxydoréductase (XOR) est une molybdoflavo enzyme. Un complexe disponible dans de lait de vache, où il forme un composant majeur de la membrane du globule gras du lait (Keenan, 2001). Cette membrane dérive de la membrane apicale de la cellule mammaire. En raison de la disponibilité de la XOR, elle a été connue depuis 100 ans et étudiée sous sa forme pure, depuis plus de 60 ans (Massey et *al.*, 1997).

#### 3.2. Caractéristiques de la xanthine oxydoréductase (XOR)

La Xanthine oxydoréductase(XOR) apparaît sous deux formes interconvertibles fonctionnellement distinctes :

- 1) la xanthine déshydrogénase (XDH; EC 1.1.1.204), exprimée d'une manière constitutive. C'est la forme qui prédomine *in vivo*.
- 2) La xanthine oxydase (XO; EC 1.1.3.22), est générée par la modification post-traductionnelle de XDH.

Les deux formes peuvent être converties entre elles réversiblement par des réactions des sulfures ou irréversiblement par la protéolyse d'un segment de XDH. La XDH requiert du  $NAD^+$  comme un accepteur d'électrons pour ses réactions d'oxydoréduction, ce qui génère le  $NADH$ , produit stable. La XO est incapable d'utiliser le  $NAD^+$  comme un accepteur d'électrons, ce qui nécessite l'utilisation de l'oxygène moléculaire comme accepteur d'électrons (Harrison, 2002). La XOR est susceptible de jouer un rôle dans le métabolisme

des xénobiotiques. Récemment, il a été démontré que la XOR jouait un rôle important dans la sécrétion des globules gras du lait (Harrison, 2002). Aussi, la XOR du lait maternel montre une faible activité envers les substrats réducteurs "classiques".

### 3.3. Distribution de la XOR

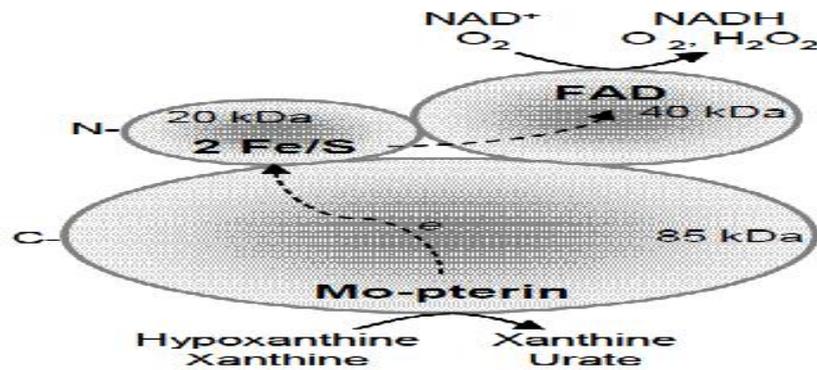
L'activité de XOR a été détectée chez toutes les espèces des mammifères. L'activité est largement distribuée ; les niveaux les plus élevés sont détectés dans le foie et l'intestin. Chez l'humain, en dehors du foie et de l'intestin, la plupart des tissus présentent une faible activité de la XOR.

Dans les hépatocytes, le XOR est exprimée plus fortement dans la région périportale, l'endothélium sinusoidal, des cellules épithéliales et la région apicale. Dans l'intestin, l'enzyme a été également détectée dans les jonctions serrées entre les cellules épithéliales intestinales humaines (Harrison, 2002). Elle est également présente dans les cellules épithéliales de Paneth qui jouent un rôle défensif antimicrobien (Morita, 2001). Dans des hépatocytes de rats, la localisation de la XOR est dans le cytosol et sur la surface luminale des cellules endothéliales sinusoidales (Frederiks et *al.*, 2002 ; Harrison, 2002 ). Cependant une localisation dans les peroxyosomes, le réticulum endoplasmique, les lysosomes a été mise en évidence par microscopie électronique (Hoare, 2002).

### 3.4. Structure de la XOR

La taille du gène codant la XOR humaine est inférieure à 60 kb. Le locus génétique codant pour XOR de l'homme et de la souris sont localisés sur les chromosomes 2p22 et 17 respectivement. Ces gènes de mammifères contiennent 36 exons et la structure exon-intron est hautement conservée, très différente de celle de la drosophile ou *Calliphora*, qui est plus compacte, avec seulement quatre ou cinq exons. La séquence de XOR de mammifères correspond à 1330-1335 acides aminés. (Harrison, 2002).

La XOR humaine est un homodimère d'environ 300 kDa (bovine 290 kDa), chaque sous-unité contient quatre centres redox : un cofacteur de molybdène (Mo-co), un FAD (flavinadeninedinucleotide), et deux cœurs Fe-S (2 Fe-S) (Figure 5). Le Mo-co comprend un dérivé de ptérine organique (molybdoptérine), contenant une chaîne latérale de dithiolène cyclique, avec un atome Mo (Nishino, 1994 ; Hille, 1996).



**Figure 5.** Structure de la XOR en domaines ; domaine Mo-protéine, domaine FAD, domaine Fe/S (Sato et al., 1995).

### 3.5. Rôle de la XOR

#### 3.5.1. Rôle physiologique

La XOR catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique. Elle réduit également de l'oxygène au superoxyde et peroxyde d'hydrogène. Cette enzyme est responsable des lésions cellulaires provoquées par le superoxyde (Mather et Keenan, 1998 ; Keenan, 2001). Récemment, il a été rapporté que XO catalyse la réduction du nitrite par la réduction de  $\text{NO}_3$  en  $\text{NO}_2$  puis en oxyde nitrique (NO) dans des conditions hypoxiques (Li et al., 2004; Boueiz et al., 2008).

Chez les mammifères, la XOR est impliquée dans la sécrétion de lait. L'association de l'enzyme à la membrane des globules gras du lait suggère qu'elle jouerait un rôle dans la sécrétion du lait pendant l'allaitement. Cependant, le rôle de la XOR dans la lactation n'est pas encore élucidé (Harrison, 2006). Il a été signalé que la XOR peut avoir un rôle de défense en cas de méningite, de paludisme et de trypanosomiase (Christen et al., 2001 ; Wang et al., 2002). Aussi, elle inhibe la croissance des bactéries (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* et *Staphylococcus aureus*) dans le lait de bovin. Des études complémentaires ont démontrés l'effet antibactérien de la XOR par sa capacité de produire le NO ayant des effets cytotoxiques sur les bactéries étudiées (Stevens et al., 2000). Il a été également trouvé que la XOR joue un rôle antimicrobien *in vivo* en effet les nourrissons qui reçoivent du lait maternel riche en XOR sont moins susceptibles de développer une gastro-entérite que ceux nourris au lait maternisé (Stevens et al., 2000).

### **3.5.1.1. Xanthine oxydoréductase : un médiateur de l'inflammation**

L'inflammation est une réaction de défense contre les invasions externes, mais elle peut s'amplifier d'une manière incontrôlable conduisant à des désordres et maladies inflammatoires (Govindarajan et *al.*, 2004). La XOR est impliquée dans le déroulement de la réaction physiologique de l'inflammation et elle participe également dans l'amplification par sa capacité de produire les ROS (Meneshian et Bulkley, 2002). Au cours de la réaction inflammatoire, il y'a l'expression de différentes cytokines. Il se trouve que la XOR est stimulée par IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 et d'IL-3; certains de ces facteurs initient aussi la conversion de la XDH à la forme de XO (Harrison, 2002 ; Meneshian et Bulkley, 2002).

La XOR endothéliale est aussi impliquée dans le déclenchement de la réponse inflammatoire microvasculaire, conduisant au recrutement et à l'activation de neutrophiles circulants et le piégeage des agents pathogènes circulants (Meneshian et Bulkley, 2002). Le recrutement des neutrophiles et l'activation des macrophages sont induits par les ROS qui augmentent l'expression des molécules d'adhésions cellulaires (Kurose et Granger, 1994). Les ROS produits par XOR et NADPH oxydase induisent l'expression de P-sélectine à la surface des cellules endothéliales en réponse à l'inflammation (Takano et *al.*, 2005). La génération des ROS par la XOR semble aussi être impliquée dans l'activation du système complément (Tanhehco et *al.*, 2000 ; Vorbach et *al.*, 2003). La XOR est considérée comme une composante importante du système immunitaire inné.

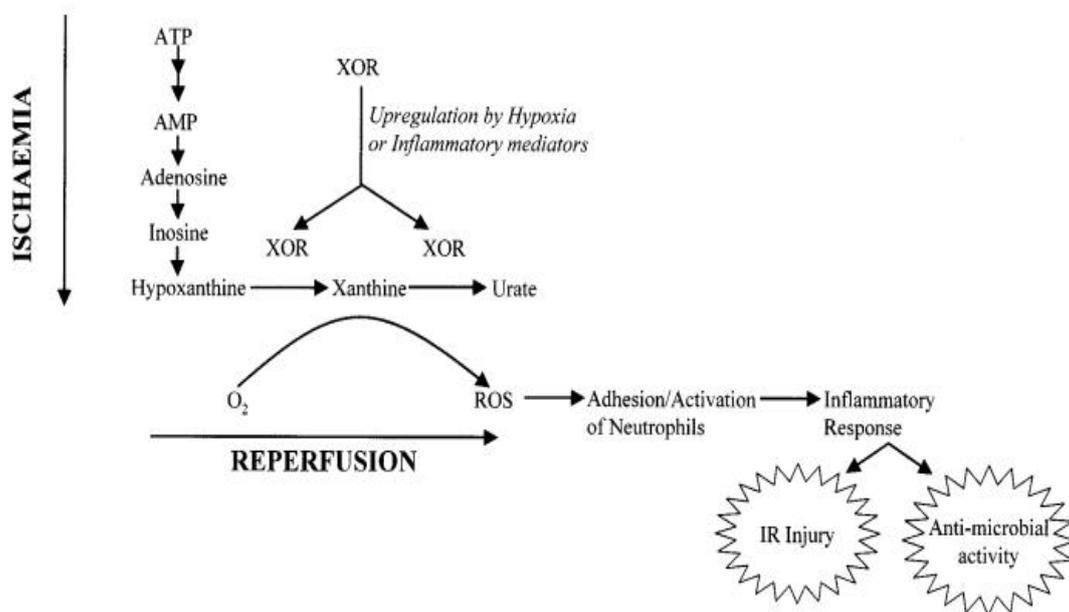
### **3.5.2. Xanthine oxydoreductase en pathologie**

#### **3.5.2.1. Hyperuricémie**

L'hyperuricémie est la pathologie la plus citée impliquant la XOR. Il s'agit d'un état pathologique qui résulte de la surproduction de l'acide urique par la XOR liée à des altérations des tubules rénaux lors de l'excrétion urinaires (Kasper et *al.*, 2008). Un état hyperuricémique peut également se développer suite à une nécrose des cellules tumorales, produisant ce qu'on appelle le 'syndrome de lyse tumorale'. Aussi, Les cellules néoplasiques nécrotiques libèrent les purines dans le liquide interstitiel et le plasma, ce qui peuvent être à l'origine d'une insuffisance rénale (Smalpley et *al.*, 2000 ; Kasper et *al.*, 2008). Plus grave, cette enzyme peut générer des atteintes du système nerveux central, où l'accumulation de l'acide urique conduit à des symptômes cliniques tels que la spasticité, hyperréflexie, arriération mentale et l'auto-mutilation (Kasper et *al.*, 2008 ).

### 3.5.2.2. Ischémie réperfusion

La XOR est liée à la pathophysiologie de la réoxygénation après hypoxie. C'est le processus l'ischémie reperfusion (I/R). L'hypoxanthine est libérée pendant l'ischémie suite à la dégradation d'adénosine triphosphate (ATP). Concurremment, le calcium pénètre dans les cellules favorisant ainsi l'activation des protéases qui convertissent la XDH en XO (forme productrice du radical  $O_2^{\cdot-}$ ). Lors de reperfusion, la XO oxyde l'hypoxanthine accumulée pour produire les ROS. Les ROS générés par le XOR sont impliqués à la fois dans le dommage structural des tissus et la signalisation cellulaire (Mc Cord, 1985) (Figure 6).



**Figure 6.** Mécanismes par lesquels les ROS produits par XOR peuvent induire l'inflammation ou les lésions ischémiques (Hannah et al., 2005).

## 3.6. Inhibiteurs de la XOR

Les inhibiteurs de la XOR peuvent ainsi réduire la concentration d'acide urique dans le sérum ; Les structures cristallines de XOR liées avec divers inhibiteurs révèlent que les inhibiteurs peuvent être classés en trois types (Okamoto et Nishino, 2008).

### 3.6.1. Inhibiteur selon le mécanisme

Allopurinol (4-OH-pyrazolo [4,4-d] pyrimidine), un isomère de l'hypoxanthine, a d'abord été synthétisé par Robins et a été introduit par Elion comme un puissant inhibiteur de la XOR, il ya plus de 40 ans. Il a été largement prescrit dans la goutte et l'hyperuricémie (Massey et Harris, 1997). L'allopurinol est oxydé par XOR à l'oxipurinol, qui présente une

faible inhibition, mais se lie très étroitement au molybdène réduite pendant la rotation d'enzyme. La structure cristalline indique que l'oxypurinol forme une liaison covalente avec l'atome réduite de molybdène (Okamoto *et al.*, 2008).

### **3.6.2. Inhibiteurs selon la structure**

Le febuxostat est un inhibiteur synthétique non purinique spécifique de la XOR. Il inhibe sélectivement les deux formes de la XOR et non pas les autres enzymes catalyseurs du métabolisme des purines (Takano *et al.*, 2005). Le febuxostat a de nombreuses liaisons hydrogènes, des ponts de sel, et des interactions hydrophobes avec des acides aminés dans le site actif et près à remplir complètement le canal étroit menant au centre de molybdène de l'enzyme (Okamoto *et al.*, 2003; Fukunari *et al.*, 2004).

### **3.6.3 Inhibiteur de type hybride**

FYX-051 est un inhibiteur qui agit simultanément sur le mécanisme et la structure de la XOR. C'est un substrat lent de XOR et forme une réaction intermédiaire stable avec l'atome de molybdène dans l'enzyme. FYX-051 a aussi des interactions diverses avec des résidus d'acide aminé au site actif (Okamoto *et al.*, 2004).

## **4. *Nigella sativa***

### **4.1. Généralités**

Au cours des dernières années, les plantes médicinales requièrent une attention particulière dans le traitement de maladies humaines parmi ces plantes ; *Nigella sativa*. Les graines de *Nigella sativa* ont été utilisées traditionnellement dans la médecine populaire comme un remède naturel pour diverses maladies ainsi que comme une épice (Gilani *et al.*, 2004). Cette plante est connue sous différents nom dont le plus courant est "Habbah Sawda" ou "Habbat el Baraka". En Inde, elle est appelée "Kalonji" tandis qu'en Chine elle est connue comme " Hak Jung Chou " (Bakathir et Abbas, 2011). *Nigella sativa* est une plante annuelle à fleurs, originaire d'Asie du sud-ouest et cultivée dans des pays comme la région de la Méditerranée orientale, moyen orient, Europe du Sud, la Syrie, la Turquie, l'Arabie saoudite, le Pakistan et l'Inde.

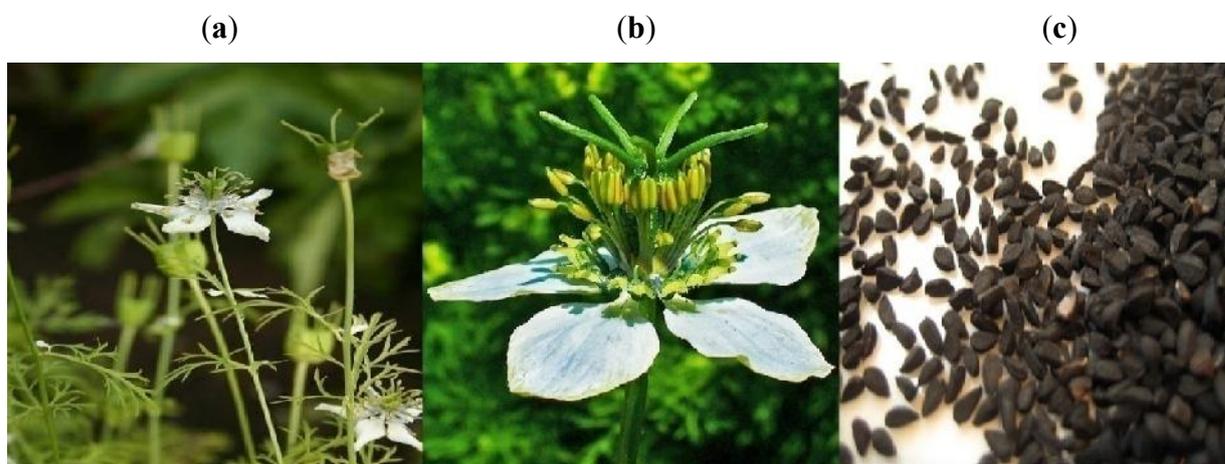
## 4.2. Description botanique de la plante

*Nigella sativa* est une plante herbacée annuelle de la famille des Renonculacées Atteignant 30 à 60 cm de haut (Ramadan, 2007) (tableau 2).

**Tableau 2.** La classification botanique de *Nigella sativa* (Ramadan, 2007).

Règne	Plantae
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Ranunculales
Famille	Ranunculaceae
Genre	<i>Nigella</i>
Espèce	<i>Nigella sativa</i>

C'est une plante qui a des feuilles linéaires finement divisées (Mozzafari et *al.*, 2000). Les fleurs sont délicates et généralement de couleur blanche, jaune, rose, bleu pâle ou pourpre pâle, avec 5 à 10 pétales (Warrier, 2004). Les fruits mûrs constitués de follicules soudés s'ouvrant par une fente interne et renfermant de nombreuses graines de couleur noire, ovoïdes, mesurant de 2 à 3 mm de long et présentant trois ou quatre angles, Elle est généralement cultivée sur un sol sec de Novembre à Avril (Figure 7).



**Figure 7.** *Nigella sativa*; (a) plante entière, (b) fleurs et (c) graines.

## 4.3. Composition

L'analyse des graines de *Nigella sativa* a permis de déterminer la teneur en eau (varie de 5.52 à 7.43%) en protéines totales (de 20 à 27%), en cendre (de 3.77 à 4.92%), en lipides (de 34.49 à 38.72%) et en glucides (de 23.5 à 33.2%) (Atta, 2003).

#### 4.3.1. Lipides et stérols

Les graines de *Nigella sativa* renferment environ 0,4-2,5% de l'huile essentielle, plus de 30% d'huiles fixes et 38% de lipides totaux dont les phospholipides (Martin et al., 2001). Les acides oléique et linoléique sont les deux acides gras majeurs de l'huile de *Nigella sativa*, ils constituent 75% des acides gras totaux (Abdel-Aal et Attia, 1993). Les stérols représentent environ 2% de l'huile fixe. La plupart sont retrouvés sous forme estérifiée et libre. Aussi, on peut rencontrer le cholestérol à l'état de trace, c'est-à-dire environ 1% (Cheikh-Rouhouet et al., 2008; Hamrouni-Sellami et al., 2008).

#### 4.3.2. Composés aromatiques

C'est en 1963 que la thymoquinone, monoterpène oxygéné, a été isolée dans l'huile de nigelle par El-Dakhakhny. D'autres études ont mis en évidence 32 constituants par GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectroscopy*) dont la majorité sont des monoterpènes: *p*-cymène (38%), thymoquinone (30%), carvacrol (5-11%),  $\alpha$ -pinène (5-14%),  $\beta$ -pinène (5%), limonène (4%), longifolène (1,2-8%), 4-terpinéol (1,98-6,59%) et *t*-anéthol (0,25-4,28%) (Burits et Bucar, 2000).

#### 4.3.3. Saponosides

Les saponosides sont des hétérosides de stérols ou de triterpènes. Ce sont des composés très répandus dans le règne végétal. Solubles dans l'eau, ils sont libérés par l'hydrolyse d'un ou de plusieurs oses et une génine (sapogénine). La première saponine isolée par Greenisch en 1882 à partir des graines de *Nigella sativa* est la mélanthine, dont l'aglycone est l'hédéragénine (Greenish, 1880).

#### 4.3.4. Polyphénols et flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés aromatiques dont la biosynthèse constitue l'un des processus fondamentaux de la phytochimie. Ils font partie de ce que l'on appelle les composés phénoliques. Parmi les flavonoïdes présentant un intérêt, nous citons les anthocyanes. En 1997, trois nouveaux flavonoïdes triglycosylés ont été isolés à partir des graines de *Nigella Sativa* (Merfort et al., 1997).

1. Quercétine 3-glycosyl (1→2) galactosyl (1→2) glucoside
2. Kæmpférol 3-glycosyl (1→2) galactosyl (1→2) glucoside
3. Quercétine 3-(6-feruloglucosyl) (1→2) galactosyl (1→2) glucoside

#### 4.3.5. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances présentant un caractère alcalin, contenant de l'azote, le plus souvent inclu dans un hétérocycle. Les alcaloïdes ont, pour la plupart, des actions physiologiques et thérapeutiques à faibles doses. Ils deviennent cependant très toxiques à fortes doses. Les plus importants alcaloïdes de *Nigella sativa* ont été isolés à partir des graines entre les années 1985 et 1995: Nigellicine, à noyau indazole (Atta-Ur-Rahman et *al.*, 1985b), Nigellimine, une isoquinoléine (Atta-Ur-Rahman et Zaman, 1992), Nigellimine N-oxyde, dérivé N-oxyde de la nigellimine (Atta-Ur-Rahman et *al.*, 1985a), Nigellidine, également un indazole (Atta-Ur-Rahman et *al.*, 1995).

#### 4.3.6. Protéines

Les graines de *Nigella sativa* sont très riches en protéines (environ 20 %), avec dominance de l'acide glutamique (22,4%), d'acide aspartique (10,05%) et d'arginine (9,18%) (Al-Gaby, 1998). La protéine la plus étudiée jusqu'à présent est la lipase qui catalyse des réactions de trans-estérification (Tuter et *al.*, 2003).

#### 4.3.7. Vitamines et sels minéraux

La composition en vitamines a été déterminée et révèle la présence des vitamines A, B1, B2, B6 et de l'acide folique (Nergiz et Otles, 1993). Les tocophérols totaux constituent 0,05% de l'huile, et sont constitués majoritairement de l' $\alpha$ -tocophérol (48%) et du  $\gamma$ -tocophérol (28%) et d'autres vitamines liposolubles comme le  $\beta$ -carotène (0,05%) et la vitamine K1 (0,1%) ont été rapportées. Des travaux sur la composition minérale de la graine de *Nigella sativa* ont rapporté que sa teneur en potassium est importante (1,18 % du poids total de la graine). Le calcium, le fer, le sodium représentent 0,188%, 0,0575% et 0,0853 % respectivement (Nergiz et Otles, 1993). La teneur des graines en sélénium a été également déterminée, elle représente 0,27 à 0,54 mg/kg des graines (Al-Saleh et *al.*, 2006).

### 4.4. Propriétés pharmacologiques de *Nigella sativa*

#### 4.4.1. Activité Anti-inflammatoire

Les composants de *Nigella sativa* ont également montré des effets anti-inflammatoires remarquables dans plusieurs maladies inflammatoires, y compris l'allergie expérimentale, Encéphalomyélite (EAE), la colite et l'arthrite (Chakrabarty et *al.*, 2003). L'huile et la thymoquinone ont la capacité d'atténuer l'inflammation allergique des voies aériennes par

l'inhibition des cytokines de Th2 et l'infiltration des eosinophiles dans les voies respiratoires (Salem, 2005).

Le mécanisme par lequel l'huile fixe de *Nigella sativa* et la thymoquinone exercent leurs effets anti-inflammatoires a été étudié, la thymoquinone s'est avérée être un puissant inhibiteur de la synthèse des eicosanoïdes notamment la thromboxane B2 et leucotriène B4 par l'inhibition respective des cycloogénase et lipoxygénase. Cependant, l'activité de l'huile fixe sur ces deux enzymes est plus importante que la thymoquinone elle-même. Ainsi l'activité anti-inflammatoire n'est pas donc entièrement dûe à la présence de la thymoquinone, des acides gras insaturés de type C<sub>20:2</sub> semblent être impliqués (Houghton et al., 1995 ; Gilani et al., 2004). Dans une étude menée sur les propriétés anti-inflammatoires de *Nigella sativa*, l'administration par voie orale de doses de l'huile essentiel (100, 200 et 400 µl/ kg) inhibe l'œdème induit par la carraghénane sur la patte de rat avec des pourcentages d'inhibition de 24% ,34% et 20 % respectivement (Valiollah et al., 2004).

#### 4.4.2. Activité antioxydante

L'huile de graine de *Nigella sativa* est bien connue pour ses fortes propriétés antioxydantes (Badary et al., 2003). Des études antérieures ont démontrés que le prétraitement avec TQ protège les organes contre les dommages oxydatifs induits par une variété d'agents générant des radicaux, tels que le tétrachlorure de carbone (Nagi et al., 1999).

La thymoquinone (TQ), la dithymoquinone, et le thymol ont été testés contre plusieurs ROS, et tous les composés testés de *Nigella sativa* ont exercé des effets antioxydants forts (Kruk et al., 2000). La TQ pourrait agir comme un capteur de RLs et elle conserve l'activité de diverses enzymes antioxydantes (Woo et al., 2012). Les fractions d'huile de *Nigella sativa*, l'extrait méthanolique et l'huile volatile et leurs composants, thymoquinone et le limonène présentent de fortes activités antioxydantes contre 2,2-diphényl-1-picryle hydrazyl (DPPH), ABTS, de l'oxyde nitrique et des radicaux hydroxyles. *In vitro* l'extrait méthanolique, riche en composés phénoliques ainsi que des composés d'acides gras présentent une capacité antioxydante plus élevée que l'huile volatile et TQ, tandis que limonène avait même un piègeur de radicaux plus faible que l'huile *Nigella sativa*. En accord avec ces résultats, l'enquête *in vivo* a révélé que les fractions et les composés testés, particulièrement l'extrait méthanolique, efficacement protégés contre le stress oxydatif induit des dommages cellulaires des tissus érythrocytaires et hépatiques, en empêchant la peroxydation lipidique excessive (Ahmad et Beg, 2014).

#### 4.4.3. Activité immuno-modulatrice

Des études précédentes basées sur l'animal ont montré que *Nigella sativa* et ses constituants principalement TQ montrent un rôle central dans le maintien de système immunitaire *via* la suppression ou l'activation de diverses cellules, lymphocytes T, lymphocytes B et des cytokines (Houghton et al., 1995).

L'effet de *Nigella sativa* sur la réponse immunitaire a été évalué chez des sujets humains volontaires. Le traitement de ces volontaires avec la poudre des graines entières aux doses de 1g deux fois par jour pendant 4 semaines a augmenté le ratio cellules *T helper*/cellules T suppresseurs (CD4/CD8) de 72%. Par ailleurs, *Nigella sativa* augmente de 30% l'activité des cellules tueuses NK (Haq et al., 1999). Une autre étude a montré que les graines activent la sécrétion d'IL-3 et augmentent la production de l'IL-1 $\beta$  par les lymphocytes T humain, ce qui indique un effet stimulateur sur les macrophages (Haq et al., 1995). Une étude importante a montré que le traitement par l'huile de *Nigella sativa* réduit les niveaux d'anticorps anti-cellules des îlots de langerhans, qui sont les principaux anticorps produits dans des processus de la maladie auto-immune (Hmza et al., 2013).

#### 4.4.4. Activité Antidiabétique

Les effets anti-diabétiques de *Nigella sativa* ont été étudiés ces dernières années et des résultats satisfaisants ont été obtenus (Akash et al., 2011). Dans une étude plus récente, il a été rapporté que l'administration de l'extrait lipidique total de *Nigella sativa* réduit le taux du glucose chez les rats rendus diabétiques par la streptozotocine /nicotinamide et suggère que l'effet hypoglycémiant de la fraction lipidique polaire est le résultat de l'inhibition des premières étapes du métabolisme des glucides à cause de leur effet inhibiteur sur l'activité de l'alpha-glucosidase (Sobhi et al., 2011). Les différentes études convergent que le mécanisme de l'effet hypoglycémiant de *Nigella sativa* est multi factorielle incluant ; (i) l'amélioration du statut du stress oxydatif, (ii) l'élévation de l'insuline, (iii) l'atténuation de la résistance à l'insuline et (iv) la néoglucogenèse hépatique (Bamosa, 2015).

#### 4.4.5. Effet hepatoprotective

Plusieurs études ont montré les effets protecteurs de *Nigella sativa* contre les lésions hépatiques provoquées par les ROS à travers ses propriétés de piéger les radicaux libres et d'améliorer les défenses antioxydants dans le corps (Mollazadeh et Hosseinzadeh, 2014) (Tableau 3).

Il a été suggéré que *Nigella sativa* améliore les lésions induites par l'alcool et le mécanisme peut impliquer la prévention des perturbations de la membrane cellulaire et la réduction du stress oxydatif par piégeage des radicaux libres. Les composants de cette plante inhibent l'activation des cellules de Kupffer et les médiateurs pro-inflammatoires et permet une normalisation de l'état redox altéré en accélérant l'élimination de l'éthanol et de l'acétaldéhyde à partir du sang (Nehar, 2014).

#### 4.5. Toxicité de *Nigella sativa*

Les études toxicologiques de *Nigella sativa* et la thymoquinone révèlent une toxicité extrêmement faible. La dose létale médiane (DL<sub>50</sub>) pour une seule dose orale ou intrapéritonéale de l'huile de *Nigella sativa*, chez les souris, est de 28,8 mL / kg et 2,06 ml/kg respectivement (Zaoui et al., 2002b). Une enquête récente a montré que la plante est relativement dangereuse si elle est consommée pendant des périodes de temps prolongées (Zaoui et al., 2002b).

Des études récentes indiquent que l'extrait éthanolique de *Nigella sativa* possède des effets cytotoxiques contre des différentes classes de lignées cellulaires de cancer, tels que, P388, HepG2, Molt 4 et Lewis cellules de carcinome du poumon (Swamy et Tan, 2000). L'étude de Khader et ses collaborateurs montrent un effet cyto et géno-toxique concentration-dépendant de la thymoquinone. La thymoquinone augmente significativement le taux de cellules nécrosées lorsqu'on l'utilise à une concentration de 2.5 et 20 µM. De plus, elle induit une géno-toxicité significative à une concentration  $\geq 20\mu\text{M}$ . la thymoquinone peut être métabolisée en espèces réactives et augmente le stress oxydatif qui contribue à la déplétion des enzymes antioxydantes et provoque l'oxydation de l'ADN dans les hépatocytes traités avec des concentrations élevées de la thymoquinone (Khader et al., 2009).

La toxicité de l'huile totale de *Nigella sativa* a été aussi évaluée sur des tranches fines de foie (PCLS). Cette approche a montré, clairement, que l'huile de *Nigella sativa* n'a pas un effet hépato-protecteur contre le l'acétaminophen (le paracétamol). L'huile totale et ses deux grandes fractions polaire et neutre ont fait l'objet d'une évaluation de leur toxicité *in vivo*. Les résultats indiquent une absence de traces majeures de toxicité hépatique et ce dans les conditions expérimentales appliquées, c'est-à-dire, quantité des extraits administrés et durée du test (Sobhi et al., 2011).

## **Matériel et Méthodes**

## 1. Matériel

### 1.1. Matériel végétale

Les graines de *Nigella sativa* utilisées dans cette étude sont locales, cultivées et récoltées dans la wilaya de Bechar au cours des années de 2012 et 2013. Après nettoyage des débris végétaux, les graines sont stockées à l'obscurité et à 4°C jusqu'à leur utilisation. La taxonomie de cette plante et de ses graines a été confirmée par le professeur Laour (Laboratoire de Valorisation des Ressources Biologiques Naturelles, Université de Sétif 1).

### 1.2. Animaux

Des rats mâles adultes de souche Wistar Albinos, pesant entre 120-180g, issus d'élevage au niveau de l'animalerie de l'Université Frères Mentouri de Constantine sont utilisés au cours des différentes expérimentations. Les rats ont un accès libre à l'eau *ad Libitum* et à l'aliment standard fourni par l'Office National des Aliments de Bétails (ONAB) de Bejaia.

## 2. Méthodes

### 2.1. Extraction et Fractionnement de l'huile totale de *Nigella sativa*

L'extraction et le fractionnement de l'huile totale des graines de *Nigella sativa* sont réalisés selon le protocole de Ramadan et Mörsel (2002a) avec quelques modifications. Les graines de *Nigella sativa* préalablement nettoyées sont broyées et la poudre obtenue est soumise à une extraction par soxhlet, en utilisant le méthanol comme solvant, pendant 2 heures à température ambiante. Le méthanol est éliminé par évaporation sous pression réduite à 40°C en utilisant un rotavapeur (BÜCHI). Cette opération a permis ainsi d'obtenir un extrait caractérisé par une couleur vert-foncée.

L'extrait méthanolique est mélangé dans une ampoule à décanter avec l'hexane (200 ml). Après agitation, deux phases ont été obtenues ; une phase méthanolique qui apparaît au-dessous et une phase hexanique, contenant les lipides. Cette dernière phase a été récupérée et l'hexane a été évaporé à 40°C. L'extrait résultant constitue l'huile totale des graines de *Nigella sativa* caractérisée par une couleur verdâtre.

Le fractionnement de l'huile totale des graines de *Nigella sativa* est réalisé par chromatographie sur colonne (CC). La colonne utilisée est de 30 cm de hauteur et de 20 mm de diamètre. La phase stationnaire est constituée du gel de silice 60G (70-230 Mesh; 0,063-0,2 mm). L'élution de la fraction neutre est réalisée selon avec le chloroforme pure (Ramadan et Mörsel, 2002a). Les solvants sont éliminés par évaporation sous pression réduite à 40°C en utilisant un rotavapeur (BÜCHI).

## **2.2. Dosage de composés phénoliques des fractions de *Nigella sativa***

### **2.2.1. Dosage des polyphénols totaux**

Le dosage des composés phénoliques de l'huile totale et la fraction neutre des graines de *Nigella sativa* est réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu rapportée par Li et ses collaborateurs (2007). Cette méthode est basée sur la réduction, en milieu alcalin, du mélange phosphotungstique ( $WO_4^{2-}$ )-phosphomolybdique ( $MoO_4^{2-}$ ), conduisant à la formation d'un produit de couleur bleu. Ce produit présente un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon.

Brièvement, 1 ml du réactif de Folin (dilué 10 fois) est ajouté à 200 µl d'échantillon ou standard avec des dilutions convenables. Après 4 min. d'incubation, 800 µl d'une solution de carbonate de sodium (75 mg/ml) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 h d'incubation, à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 765nm. La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (20-140 µg/ml) et exprimée en µg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (µg EAG/g d'extrait).

### **2.2.2. Dosage des flavonoïdes**

Le dosage des flavonoïdes est effectué selon la méthode du trichlorure d'aluminium (Bahorun et al., 1996). À 1 ml d'échantillon ou standard est ajouté 1 ml de la solution d' $AlCl_3$  (2% dans le méthanol). Après 10 minutes de réaction, l'absorbance est mesurée à 430 nm. La concentration des flavonoïdes est calculée à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (1-40 µg/ml) comme standard et exprimée en µg d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (µg EQ/g d'extrait).

## 2.3. Activité antioxydante *in vitro*

### 2.3.1. Piégeage des radicaux libres

#### 2.3.1.1. Piégeage de l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ )

La production de  $O_2^{\bullet-}$  est effectuée par le système xanthine/XOR selon le protocole de Robak et Gryglewski (1988). Ce radical libre a la capacité de réduire le cytochrome c. Dans cette réaction le milieu réactionnel est constitué de xanthine (100  $\mu$ M), cytochrome c (25  $\mu$ M) préparé dans un tampon phosphate (50 mM  $Na_2HPO_4/NaH_2PO_4$ , pH 7.4) saturé avec l'oxygène et de différentes concentrations de l'huile totale et la fraction neutre. La réaction est déclenchée par ajout de l'enzyme xanthine oxydoréductase (XOR) à température ambiante. Le cytochrome c réduit est détecté spectrophotométriquement à 550 nm, après une minute de la réaction. Le pourcentage du cytochrome c réduite est déterminé par la relation suivante :

$$\% \text{ d'Inhibition} = (A_C - A_E / A_C) \times 100$$

$A_C$  : absorbance du contrôle.

$A_E$  : absorbance de l'échantillon.

#### 2.3.1.2. Piégeage du radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ )

Cette technique est réalisée selon la méthode de Smirnoff et Cumbes (1989). Le principe est basé sur la production de  $OH^{\bullet}$  dans le milieu réactionnel à travers la réaction de Fenton, ensuite le radical  $OH^{\bullet}$  produit réagit avec le sodium salicylate pour produire le complexe hydroxyle salicylate.

Le volume finale du milieu réactionnel est 3.0 ml, le milieu est constitué de 1.0 ml de  $FeSO_4$  (1.5 mM) , 0.7 ml de peroxyde d'hydrogène (6 mM) , 0.3 ml de sodium salicylate (20 mM) et 1 ml des différentes concentrations de l'huile totale et la fraction neutre. Après une incubation à 37°C pendant 1h, l'absorbance du complexe hydroxyle salicylate est mesurée à 562 nm. Le pourcentage d'inhibition de  $OH^{\bullet}$  est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100$$

$A_0$  : l'absorbance du contrôle (sans extrait).

$A_1$  : l'absorbance en présence d'extrait.

$A_2$  : l'absorbance sans sodium salicylate.

### 2.3.1.3. Piégeage du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ )

Le piégeage de  $H_2O_2$  est déterminé par la méthode décrite par Ruch et ses collaborateurs (1989) avec quelques modifications. Le principe de cette méthode est basé sur la capacité de l'huile totale et la fraction neutre à neutraliser le  $H_2O_2$  en molécules d'eau selon la réaction suivante :  $H_2O_2 + 2é \rightarrow 2H_2O$ .

Une solution de  $H_2O_2$  (40 mM) est préparée dans un tampon phosphate (pH 7,4). Le mélange réactionnel est composé de 1,2 ml de la solution de  $H_2O_2$  (40 mM dans un tampon phosphate, pH 7,4) et de 2 ml des échantillons ou du standard. Les absorbances sont mesurées, après 10 min, à 230 nm. Le pourcentage du piégeage de  $H_2O_2$  est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = (A_C - A_E) / A_C \times 100$$

$A_C$  : l'absorbance du contrôle ( $H_2O_2$ ).

$A_E$  : l'absorbance de l'échantillon.

### 2.3.2. Peroxydation lipidique

#### 2.3.2.1. Peroxydation de l'acide linoléique

L'oxydation des lipides polyinsaturés en présence d'oxygène est un processus radicalaire de réactions en chaîne, connue sous le nom de peroxydation lipidique. Au cours de l'oxydation de l'acide linoléique, des peroxydes sont formés. Par la suite, ces peroxydes vont oxyder le  $Fe^{+2}$  en  $Fe^{+3}$ . Ces derniers ions forment un complexe avec le thiocyanate, c'est le thiocyanate ferrique qui a une absorbance maximale à 500 nm. L'activité antioxydante totale des extraits de *Nigella sativa* est déterminée *in vitro* selon la méthode de Mitsuda et ses collaborateurs (1996).

Une émulsion de l'acide linoléique est préparée en mélangeant l'acide linoléique, l'éthanol, le tampon phosphate (0,05 M, pH 7.0) et les différentes concentrations de l'huile totale et la fraction neutre. Cette émulsion est incubée à 40 °C et à l'obscurité pendant 24 heures. Ensuite un volume de 100  $\mu$ l de cette solution est mélangé avec 9,7 ml d'éthanol (75%) et 100  $\mu$ l de thiocyanate d'ammonium. Après une incubation à l'obscurité pendant 3

min, 100µl de FeCl<sub>2</sub> est ajouté avant de mesurer l'absorbance à 500 nm. Le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique est calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition de peroxydation} = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100.$$

**A<sub>C</sub>** : absorbance du contrôle.

**A<sub>E</sub>** : Absorbance de l'échantillon à tester.

### 2.3.2.2. Test de blanchissement de β-carotène

Ce test est basé sur la capacité des extraits de *Nigella sativa* à inhiber la dégradation oxydative du β-carotène par les composés d'oxydation de l'acide linoléique. Le test est réalisé selon la méthode de Kartal et ses collaborateurs (2007).

L'émulsion de β-carotène /acide linoléique est préparée en mélangeant 0,5 mg de β-carotène dans 1 ml du chloroforme, 25µl d'acide linoléique et 200 mg du Tween 40, après évaporation à 40°C, 100 ml d'eau distillé oxygéné sont ajoutés avec une agitation vigoureuse. Ensuite, 350 µl de solution de l'huile totale ou la fraction neutre sont mélangés avec 2,5 ml de l'émulsion précédente. La cinétique de décoloration de l'émulsion, en présence et en absence d'antioxydant, est suivie à 490 nm à des intervalles

du temps réguliers pendant 48 heures. La capacité antioxydante est calculée en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Activité antioxydante} = A_E / A_{BHT} \times 100$$

**A<sub>E</sub>** : Absorbance de l'échantillon.

**A<sub>BHT</sub>** : Absorbance du contrôle.

### 2.3.3. Pouvoir réducteur

Cette méthode consiste à évaluer l'aptitude de l'échantillon à donner un électron pour convertir le Fe<sup>3+</sup> en Fe<sup>2+</sup>, cette forme est quantifiée par la mesure de la couleur bleu du complexe (bleu de Pruss Fe<sub>4</sub> [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sub>3</sub>) qui absorbe à 700 nm. Une absorbance élevée indique que l'échantillon possède un grand pouvoir réducteur (Barros *et al.*, 2007).

Ce test est effectué selon la méthode de Prasad et ses collaborateurs (2009). Brièvement, 1,25 ml du tampon phosphate (0,2M, pH=6,6) et 1,25 ml de 1% de potassium ferricyanide [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] sont ajoutés à 50 µl des différentes concentrations de l'huile totale et la fraction neutre. Après 20 min d'incubation à 50 °C, 1,25 ml d'une solution

aqueuse de TCA à 10% sont ajoutés au milieu réactionnel. Après 10 min de centrifugation à 3000 rpm, 1,25 ml d'eau distillée et 250µl de 0,1% FeCl<sub>3</sub> sont ajoutés à 1,25 ml du surnageant, puis l'absorbance est déterminée à 700 nm contre un blanc contenant tous les réactifs en absence de l'échantillon. Les résultats sont exprimés en concentration effective à 50 % (CE<sub>50</sub>) qui traduit la concentration d'antioxydant nécessaire pour l'obtention de 0,5 d'absorbance.

#### **2.3.4. Activité anti-hémolyse oxydative**

La résistance des érythrocytes à l'attaque radicalaire en présence de l'huile totale et la fraction neutre des graines de *Nigella sativa* est évaluée selon le protocole d'Albertini et ses collaborateurs (1996) avec de légères modifications. En bref, le sang des souris est dilué au 1/50 dans un tampon physiologique à un état isotonique (300 mOsm, pH 7,4), cette solution sanguine est mélangée avec une solution d'hydroperoxyde de tert-butyle (t-BHP) 0,5 mM en tant que solution libre génératrice des radicaux libres. La réaction est suivie en mesurant le taux de diminution de la densité optique à 630 nm. Le temps nécessaire pour atteindre 50% d'hémolyse totale (HT<sub>50</sub>) a été retenu et l'inhibition d'hémolyse (IH) est calculée avec la formule suivante :

$$\mathbf{IH = HT_{50} (E) - HT_{50} (C) / HT_{50} (C).}$$

**HT<sub>50</sub> (E)** : Temps d'hémolyse de l'échantillon.

**HT<sub>50</sub> (C)** : Temps d'hémolyse du contrôle.

### **2.4. Etude de l'effet hépatoprotecteur des fractions de *Nigella sativa***

Avant d'estimer l'effet hépatoprotecteur de l'huile totale et de la fraction neutre des graines de *Nigella sativa*, nous avons étudié la toxicité qui pourrait générer par ces deux fractions.

#### **2.4.1. Etude de la toxicité des fractions de *Nigella sativa***

##### **2.4.1.1. Traitement des animaux**

Après une période d'adaptation, les animaux sont répartis en trois lots expérimentaux de six rats pour chacun. Les traitements sont administrés par la voie orale (per os) à l'aide d'une sonde spécifique. Pendant cette période les animaux ont accès libre

à la nourriture et à l'eau et sont maintenus dans une animalerie à température constante ( $22 \pm 2$  °C), soumis à un cycle de lumière/obscurité de 12/12h.

**Groupe 1:** les rats reçoivent de l'eau potable et de la nourriture standard produite par l'ONAB de Béjaia pendant 4 semaines.

**Groupe 2:** les rats reçoivent une dose de 400 mg /kg de l'huile totale, de l'eau potable et de la nourriture standard pendant 4 semaines.

**Groupe 3:** les rats reçoivent une dose de 300 mg /kg de la fraction neutre, de l'eau potable et de la nourriture standard pendant 4 semaines.

#### **2.4.1.2. Dosage des paramètres sanguins**

Des prélèvements sanguins sont réalisés à partir du sinus rétro-orbital de l'œil. Le sang récupéré est immédiatement centrifugé à 4000 t/min pendant 10 minutes. Des dosages biochimiques sont réalisés sur les sérums obtenus.

Les dosages biochimiques concernent les marqueurs : hépatiques (ASAT, ALAT et ALP), rénaux (urée et créatinine) et lipidiques (triglycérides et cholestérol) ont été réalisés en utilisant des kits de diagnostic Sprinreact avec un analyseur automatique (Bechman), dans le laboratoire central du CHU-Sétif, Algérie.

#### **2.4.1.3. Analyse histopathologique**

Les organes prélevés (foies et reins) sont conservés dans le formol (10%) puis transportés au service de l'anatomie pathologique du CHU de Sétif pour l'étude histopathologique. L'étude est effectuée selon le protocole expérimental du laboratoire qui consiste en:

- a) Déshydratation des prélèvements afin d'éliminer toute trace d'alcool,
- b) Enrobage à la paraffine pour obtenir un bloc qui sera facilement coupé,
- c) Confection des coupes au microtome avec une épaisseur est de 3-4 $\mu$ m. Les coupes obtenues sont placées sur des lames de verre préalablement recouvertes de gélatine,
- d) Déparaffinage : les coupes montées sur lames et séchées sont déparaffinées dans du xylène, réhydratées dans des bains successifs d'éthanol,
- e) Coloration avec la combinaison entre deux colorants hématoxyline et éosine (HE),
- f) Montage permanent entre lame et lamelle pour conserver les coupes colorées,
- g) Observation au photomicroscope.

### 2.4.2. Induction de l'hépatotoxicité par l'éthanol

L'hépatotoxicité des rats est induite par la consommation d'éthanol avec un régime alimentaire spécifique (Lieber-DeCarli liquid diet). Le groupe contrôle a subi un régime spécifique (control liquid diet) pendant six semaines. Initialement, les rats reçoivent une dose primaire d'éthanol de 12 mg/ kg/ jour durant la première semaine, cette dose est augmentée à 17 mg/ kg / jour pendant les cinq semaines suivantes (Adeline et *al.*, 2013). Les animaux sont maintenus dans une animalerie à température constante ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) soumis à un cycle de lumière/obscurité de 12/12h. Les rats sont ensuite traités conformément aux principes et directives énoncées dans le manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation. Les différentes composantes et les pourcentages en calories du régime de Lieber-DeCarli liquide et le régime contrôle sont représentés dans les tableaux 3 et 4 respectivement.

**Tableau 3.** Différents composants du régime Lieber-DeCarli liquide et le contrôle liquide

<b>Composants</b>	<b>Quantité /1 litre (Régime liquide de Lieber-DeCarli)</b>	<b>Quantité/ 1litre (Régime liquide contrôle)</b>
Dextrin-maltose	27,91g	114 g
Caséine	41,4g	41,4g
mélange des huiles	43,8 ml	43,8 ml
mélange des vitamines	100 ml	100 ml
Solutions des sels	100 ml	100 ml
l-cystine	0,5g	0,5g
méthionine	0,6g	0,6g
mélange des sels	individuelle	Individuelle
ddH <sub>2</sub> O	Approx 690 ml	Approx 760 ml
Éthanol	68,5 ml	/

**Tableau 4.** Pourcentages en calories du régime de Lieber-DeCarli liquide et le régime contrôle

<b>Composants</b>	<b>Régime contrôle</b>	<b>Régime Alcool</b>
Lipides (mélange des huiles)	35%	35%
Glucides (dextrine-maltose)	47%	11%
Protéine (caséine)	18%	18%
Vitamines	+	+
Sels	+	+
Éthanol	-	5g/dl=36%

### 2.4.3. Etude de l'effet hépatoprotecteur des fractions de *Nigella sativa*

Après l'induction de l'hépatotoxicité éthylique pendant six semaines, les rats (8 rats par groupe) ont été soumis à des traitements avec l'huile totale, la fraction neutre et le contrôle positif N- Acetyl cysteine (NAC) pendant quatre semaines. L'éthanol et les différents traitements ont été administrés quotidiennement à travers une sonde du gavage spécifique (Tableau 5).

**Tableau 5.** Différents groupes expérimentaux.

<b>Groupes expérimentaux</b>	<b>Traitements</b>
EtOH	Éthanol pendant 6 semaines
Huile totale	Éthanol 6 semaines + huile totale 400 mg/ml/jours (4 semaines).
Fraction neutre	Éthanol 6 semaines + fraction neutre 300 mg/ml/jours (4 semaines).
NAC	Éthanol 6 semaines + NAC 1,2 g/kg/jours (4 semaines).
Contrôle	Régime contrôle pendant 6 semaines.

## **- Préparation de l'homogénat**

Après la pesée de l'échantillon, l'homogénat est préparé par homogénéisation des morceaux du foie dans le tampon KCl (0,15 M) à 4 ° C. Les homogénats sont centrifugés à 3000 tpm pendant 10 min et les surnageants sont aliquotés et utilisés pour les dosages biochimiques.

### **2.4.3.1. Etude des paramètres de l'hépatotoxicité**

#### **a- Dosage des marqueurs de l'hépatotoxicité**

Les marqueurs de l'hépatotoxicité utilisés sont les paramètres biochimiques sanguins ; il s'agit du bilan hépatique (ASAT, ALAT et ALP), bilan rénal (urée et créatinine) et bilan lipidique (triglycérides et cholestérol). Le dosage de ces paramètres a déjà été mentionné dans la section 2.4.1.2. page 36.

#### **b- Analyse histopathologique**

L'étude histopathologique est réalisée dans le même laboratoire et suivant le même protocole rapporté en section 2.4.1.3. page 36.

### **2.4.3.2. Etude des marqueurs du stress oxydatif**

Les marqueurs du stress oxydatif sont déterminés dans le plasma et l'homogénat du foie. Ces paramètres inclus ; malondialdéhyde (MDA), la superoxyde dismutase (SOD), le glutathion réduit (GSH), la catalase (CAT), la xanthine oxydoreductase (XOR) et les anticorps anti-XOR.

#### **a- Détermination de la peroxydation lipidique**

La peroxydation lipidique dans le plasma et l'homogénat est estimé par une technique spectrophotométrique à 535 nm, basée sur le dosage du MDA en utilisant le 1,1,3,3-tétraméthoxypropane comme étalon externe. Le MDA est l'un des produits terminaux de la décomposition des acides gras polyinsaturés (AGPI) sous l'effet des radicaux libérés au cours du stress oxydatif. En milieu acide et à chaud (pH 2 à 3, 100 °C) une molécule de MDA est condensée avec deux molécules de thiobarbiturique (TBA) pour former un complexe coloré en rose. Les valeurs sont exprimées en nanomoles de MDA formé par millilitre du plasma ou gramme du tissu.

**i) Au niveau tissulaire**

Pour le dosage du MDA, 0,5 ml d'homogénat est ajouté à un mélange de 0,5 ml d'acide trichloracétique (20 %) et 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA à 0,67 %). Le mélange est chauffé à 100 °C pendant 15 minutes, refroidi puis additionné de 4 ml de n-butanol suivi par une centrifugation à 3000 t/min pendant 15 minutes (Okhawa et *al.*, 1979). L'absorbance est déterminée à 532 nm (spectrophotomètre LKB II).

**ii) Au niveau plasmatique**

Les teneurs en MDA plasmatiques sont déterminées par la méthode de Quantanilha et ses collaborateurs (1982). 100 µL du plasma dilué à 1/10<sup>ème</sup> dans du sérum physiologique (0,9 % NaCl) et 20 µL de buthyl-hydroxy toluène (BHT) (2% dans de l'éthanol) et 1 mL de TBA (0,375% de TBA dans du HCl 0,5N) sont mélangés. Après incubation à 85°C pendant 30 min, et refroidissement dans un bain glacé, les échantillons sont centrifugés à 2000 g pendant 10 min à 4°C. L'absorbance est déterminée à 535 nm.

**b- Détermination de la concentration en glutathion réduit**

L'estimation du glutathion réduit (GSH) dans le plasma et l'homogénat est déterminée par une méthode colorimétrique (Ellman, 1959). La réaction consiste à fractionner la molécule d'acide 5,5'dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par le GSH, libérant ainsi l'acide thionitrobenzoïque (TNB) lequel à pH (8-9) alcalin présente une absorbance à 412 nm. Le taux de GSH est déterminé à partir d'une courbe d'étalonnage de GSH. La concentration en GSH est exprimée en nmol / ml de plasma ou mg de tissu.

**i) Au niveau tissulaire**

Pour le dosage du GSH réduit, 50 µl d'homogénat du foie sont dilués dans 10 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 8). Ensuite, 3 ml de la solution d'homogénat diluée sont mélangés avec 20 µl de DTNB (0,01 M). La lecture de la densité optique est effectuée après 5 min d'incubation, à température ambiante, à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA 10%. La concentration du GSH est déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage et exprimée en nmol /gramme de tissu.

**ii) Au niveau plasmatique**

Pour l'estimation de la teneur plasmatique en GSH réduit, on a ajouté 2.3 ml du tampon phosphate (0.2 M, pH = 7.6) à 0.2 ml de plasma et 0.5 ml de DTNB (1 mM).

L'absorbance du produit de la réaction est mesuré après 4 min d'incubation, à température ambiante, à 412 nm et le taux de GSH est déterminé à partir de la courbe d'étalonnage.

### c) Détermination de l'activité de la catalase

L'activité de la catalase est estimée en suivant la disparition du  $H_2O_2$  pour donner de l'eau et de l'oxygène moléculaire en présence d'une source enzymatique (homogénat ou plasma), cette décomposition est suivie par la diminution de l'absorbance à 240 nm. L'activité enzymatique est estimée en mesurant la différence d'absorbance par unité du temps.

#### i) Au niveau tissulaire

Pour doser l'activité de la catalase au niveau tissulaire nous avons suivi la méthode de Clairborne (1985). Le mélange est constitué de 1 ml du tampon phosphate ( $KH_2PO_4$ , 0.1 M, pH 7.2), 0.975 ml de  $H_2O_2$  fraîchement préparé (0.091 M) et de 0.025 ml d'homogénat. L'absorbance est mesurée à 240nm après chaque minute dans un intervalle du temps de 2 minutes. L'activité enzymatique est calculée en terme d'unité internationale par minute et par gramme de protéine (UI/min/g de protéine), selon la formule :

$$UI/g = (2.3033/T) \times (\log A_1/A_2) /g \text{ de protéine.}$$

$A_1$ : Absorbance à la première minute.

$A_2$ : Absorbance à la deuxième minute.

$T$ : Intervalle du temps par minute.

#### ii) Au niveau plasmatique

Cette activité est estimée en suivant la méthode d'Aebi et ses collaborateurs (1984). Un volume de 0.1 ml de plasma est ajouté à 1.9 ml du tampon phosphate (50 mM, pH 7.0) et 1.0 ml de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ , 30 mM). Le changement en absorbance est détecté pendant 30 secondes à 240 nm avec un intervalle de 15 secondes. L'activité de la catalase est calculée en utilisant le coefficient d'extinction de  $H_2O_2$  (0.071 mmol  $cm^{-1}$ ) et les résultats sont exprimés par  $\mu$ mole de  $H_2O_2$  oxydé par mg de protéine suivant la relation suivante :

$$UI/g = (\Delta A) / E \times \text{Volume d'échantillon (ml)} \times \text{mg de protéine}$$

$\Delta A$  : changement de l'absorbance par minute

$E$  : coefficient d'extinction (0.071 mmol  $cm^{-1}$ )

### **iii) Détermination de protéines totales**

Les protéines totales dans le plasma ou l'homogénat du foie sont déterminées selon la méthode de Biuret en utilisant le Kit (Spinreact BSIS30-1). Le principe de ce test est basé sur la complexation entre les protéines et les sels de cuivre pour donner un complexe violet-bleu intense en milieu alcalin. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration en protéines totales dans l'échantillon et déterminée par mesure de l'absorbance à 540 nm contre une courbe d'étalonnage (Koller, 1984).

### **d- Détermination de l'activité de la SODCu-Zn**

L'activité de la SODCu-Zn est déterminée dans le plasma et l'homogénat du foie en suivant les mêmes étapes. Cette méthode est basée sur la réduction du nitrobleu tetrasolium (NBT) en formazan. Ce dernier est de couleur bleu foncé, il est détecté à 560 nm. Une unité de la SOD est déterminée comme la quantité de protéines qui inhibe le taux de NBT (Sun *et al.*, 1988). Le milieu réactionnel contient 40 ml de xanthine (0,3 mM), 20 ml de EDTA (0,6 mM), 20 ml de NBT 150 µM, 6ml de BSA (1g/l). Ensuite, à un volume du milieu réactionnel on a ajouté la source enzymatique (plasma ou homogénat). Après une incubation, 20 min à 25°C, l'absorbance est mesurée à 560 nm. Les résultats sont exprimés en U /mg de protéine ou ml de plasma.

### **e- Détermination du taux de la XOR et les anticorps anti-XOR**

#### **i) Purification de la XOR et les anticorps anti-XOR**

L'enzyme XOR utilisée dans ce travail a été purifiée à partir du lait humain selon la méthode décrite par les membres de l'équipe du professeur Harrison (Sanders *et al.*, 1997; Benboubetra *et al.*, 1997) (Voir annexe 1). La pureté de l'enzyme purifiée est estimée par l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE) et par le rapport protéine /flavine (RPF), correspondant à la lecture de l'absorbance aux longueurs d'ondes 280 nm et 450 nm ( $A_{280nm} / A_{450nm}$ ) (Harrison, 2002) (Voir annexe 2).

Les anticorps anti-XOR utilisés sont des anticorps issus de l'immunisation des lapins blanc par la XOR purifiée, le travail a été réalisé à l'Institut Pasteur d'Alger selon le protocole de Benboubetra et ses collaborateurs (Benboubetra *et al.*, 1997). Une semaine après le dernier rappel, les lapins sont égorgés pour récupérer la totalité possible du sang. La purification des anticorps anti-xanthine oxydoréductase est réalisée par la précipitation

au sulfate du sodium puis par chromatographie d'immunoaffinité sur gel de protéine A sépharose (Voir annexe 3).

### **ii) Dosage de la XOR au niveau tissulaire et plasmatique**

Le dosage de la XOR est réalisé par le test ELISA sandwich, ce test nous a permis de doser le taux du complexe immunitaire XOR-Anticorps anti-XOR qui reflète la quantité de la XOR (Benboubetra et *al.*, 1997).

Le dosage de la XOR dans le sérum et l'homogénat du foie des rats est déterminé comme suit. Les anticorps humains anti-XOR purifiés sont absorbés (5µg/ ml) dans Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 Mm renfermant 0.01% d'azide de sodium (100µl) dans chaque puits des plaques de microtitration pendant 4 heures à température de laboratoire. Les puits sont ensuite lavés trois fois pendant 5 min (200µl/puits) avec du PBS contenant 0.1% de Tween 20 (PBS-T). Après un blocage des sites libres pendant une nuit à 4°C avec de la caséine 2% dans le PBS et lavage trois fois avec PBS-Tween, les sérums et l'homogénat sont ajoutés en triplets puis la plaque est incubée pendant 1h 30 mn à 37°C. Après trois lavages avec PBS-Tween, les anticorps anti-XOR sont ajoutés avec une concentration de (0.5 µg/ ml) et incubé pendant 1h 30 mn à 37°C. La plaque est lavée trois fois par le PBS-Tween, puis les anti-IgG marquées à la peroxydase (Sigma, dilué 1/10000 fois dans du PBS) sont ajoutés et incubée pendant 90 mn à 37°C. Après trois lavages avec PBS-T, le tampon substrat est ajouté (100µl/puits) et la coloration jaune est laissée développer pendant 20 mn puis la réaction est arrêtée par 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2N) et l'absorbance est déterminée à l'aide d'un lecteur de microplaque (EL<sub>X</sub>800, BIO-TEK INSTRUMENTS, INC) à 492 nm. Le tampon de substrat est du citrate de sodium 0,1 M pH 5,0 renfermant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,01 v/v) et l'orthophénylène diamine (OPD) à 0,04% (p/v).

La concentration de la XOR est déterminée en se basant sur une courbe standard de l'absorbance contre le logarithme de la concentration de la XOR, la courbe est tracée pour chaque plaque et la partie linéaire est utilisée pour calculer les concentrations.

### **iii) Dosage des anticorps anti-XOR au niveau tissulaire et plasmatique**

Le dosage des anticorps anti-XOR est réalisé par un test ELISA indirect selon le protocole de benboubetra et ses collaborateurs (Benboubetra et *al.*, 1997).

Le dosage des anticorps anti-XOR dans le sérum et l'homogénat du foie des rats est déterminé comme suit. La XOR purifié est absorbé (10 µg/ ml) dans Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 Mm

renfermant 0.01% d'azide de sodium (100µl) dans chaque puits des plaques de microtitration pendant 4 heures à température de laboratoire. Les puits sont ensuite lavés trois fois pendant 5 min (200µl/puits) avec du PBS contenant 0.1% de Tween 20 (PBS-T). Après un blocage des sites libres pendant une nuit à 4°C avec de la caséine 2% dans le PBS et lavage trois fois avec PBS-Tween, les sérums et l'homogénat sont ajoutés en triplets puis la plaque est incubée pendant 1h 30 mn à 37°C. Ensuite, les anti-IgG marquées à la peroxydase (Sigma, dilué 1/10000 fois dans du PBS) sont ajoutés et incubée pendant 90 mn à 37°C. Après trois lavages avec PBS-T, le tampon substrat est ajouté (100µl/puits) et la coloration jaune est laissée développer pendant 20 mn puis la réaction est arrêtée par 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2N) et l'absorbance est déterminée à l'aide d'un lecteur de microplaque (EL<sub>X</sub>800, BIO-TEK INSTRUMENTS, INC) à 492 nm. Le tampon de substrat est du citrate de sodium 0,1 M pH 5,0 renfermant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,01v/v) et l'orthophénylène diamine (OPD) à 0,04% (p/v) .

La concentration des anticorps anti-XOR est déterminée en se basant sur une courbe standard de l'absorbance contre le logarithme de la concentration des anticorps anti-XOR, la courbe est tracée pour chaque plaque et la partie linéaire est utilisée pour calculer les concentrations.

### 3. Analyse statistique

Les résultats des tests effectués *in vitro* et *in vivo* sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD et moyenne  $\pm$  SEM respectivement. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe d'étalonnage. Les sigmoïdes de la cinétique d'hémolyse et la détermination de l'HT<sub>50</sub> sont effectués par le logiciel (Graph Pad. Prism. V 5.00). La différence entre le contrôle et les différents tests, est déterminée par le test de Student pour les comparaisons simples ou ANOVA univariée suivie du test de Dunnett/Tukey pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification. Les valeurs de  $p \leq 0.05$  sont considérées statistiquement significatives.

## **Résultats et discussion**

## 1. Rendement de l'extraction

L'extraction de l'huile totale et sa fraction neutre à partir des graines de *Nigella sativa*, cultivées dans le sud d'Algérie, a été effectuée selon la méthode de Ramadan et Mörsel (2002a) avec quelques modifications. Dans cette étude, le rendement de l'huile totale est de  $25.45 \pm 3.5$  % du poids de la graine. La chromatographie sur colonne a permis d'extraire la fraction neutre avec un rendement de  $95.30 \pm 0.6$  % de l'huile totale (Tableau 6). Nos résultats sont comparables à ceux rapportés par Sobhi et ses collaborateurs qui ont été utilisés des grains cultivées dans le nord d'Algérie (Sobhi et *al.*, 2011) et aussi à ceux de Ramadan et Mörsel (2002a). La ressemblance des résultats est due à l'utilisation du même procédé d'extraction.

**Tableau 6.** Rendement d'extraction de l'huile totale et la fraction neutre des graines de *Nigella sativa*

Fractions	Rendement d'extraction %
Huile totale	$25.45 \pm 3.5$ des graines
Fraction neutre	$95.30 \pm 0.6$ de l'huile totale

## 2. Dosage de polyphénols et flavonoïdes

Afin de déterminer la teneur en polyphénols dans l'huile totale et la fraction neutre des graines de *Nigella sativa*, un dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes a été effectué. Les résultats sont présentés dans le tableau 7.

**Tableau 7.** Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes.

Fractions	Polyphénols ( $\mu\text{g EAG /g extrait}$ )	Flavonoïdes ( $\mu\text{g EQ /g extrait}$ )
Huile totale	$26.44 \pm 0.21$	$1.34 \pm 0.21$
Fraction neutre	$16.66 \pm 0.48$	$0.59 \pm 0.06$

Pour la détermination quantitative des polyphénols de l'huile totale et la fraction neutre de *Nigella sativa*, nous avons utilisé la gamme d'étalonnage d'acide gallique ( $y = 0,006 x + 0,033$ ,  $R^2 = 0,990$ ). Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{g}$  équivalent d'acide gallique  $\mu\text{g}$  (EAG) / g d'extrait. Pour les flavonoïdes, on a utilisé la gamme d'étalonnage de

la quercétine ( $y = 0,026 x + 0,022$ ,  $R^2 = 0,990$ ) et les résultats sont exprimés en  $\mu\text{g}$  équivalent de quercétine  $\mu\text{g}$  (EQ) / g d'extrait.

Nos résultats montrent que l'huile totale de *Nigella sativa* contient la plus grande quantité de polyphénols avec une teneur de  $26,44 \pm 0,21 \mu\text{g EAG/g}$  d'extrait suivi par la fraction neutre avec une teneur de  $16,66 \pm 0,48 \mu\text{g EAG/g}$  d'extrait. La teneur en flavonoïdes totaux est plus élevée dans l'huile totale  $1,34 \pm 0,21 \mu\text{g EQ/g}$  d'extrait que dans la fraction neutre avec  $0,59 \pm 0,06 \mu\text{g EQ/g}$  d'extrait. Ces résultats sont similaires à ceux publiés par Ramadan et ses collaborateurs (2003) où ils ont montré que l'huile totale contient  $24 \pm 0,11 \mu\text{g EAG/g}$  d'extrait.

D'autres études réalisées dans notre laboratoire sur les différents extraits de cette plante, ont toujours montré que les extraits par le chloroforme (Huile totale) présente les niveaux les plus élevés en composés phénoliques et flavonoïdes par rapport aux extraits aqueux et hexaniques (Boudiaf et al., 2010; Meziti et al., 2012) (Tableau 8).

La faible teneur en polyphénols et en flavonoïdes dans la fraction neutre est expliquée par l'absence des composés polaires dans cette fraction (fraction apolaire) alors que les composés phénoliques sont, généralement, des composés polaires à cause de leur richesse en fonctions hydroxyles (Sultan et al., 2009).

L'huile totale est constituée, majoritairement, de composés apolaires (environ 97%) et une petite quantité de composés polaires dont les composés phénoliques (Ramadan et Morsel, 2003). Ceci peut expliquer la richesse relative de l'huile totale en ces composés comparé avec la fraction neutre.

**Tableau 8.** Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans les extraits de graines de *Nigella sativa* obtenus par différents solvants

Extrait	Meziti et al (2012)		Boudiaf et al (2010)	
	Polyphénols	Flavonoïdes	Polyphénols	Flavonoïdes
E. Hexanique	$15,95 \pm 0,58$	$0,43 \pm 0,06$	$11,95 \pm 1,36$	$0,49 \pm 0,07$
E. Chloroformique	$81,31 \pm 1,97$	$5,20 \pm 0,02$	$191,06 \pm 23,34$	$6,93 \pm 0,28$
E. Aqueux	$27,07 \pm 0,58$	$2,45 \pm 0,06$	$23,81 \pm 2,67$	$3,17 \pm 0,16$

### 3. Activité antioxydante *in vitro*

L'activité antioxydante des fractions de *Nigella sativa* a été réalisée suivant quatre mécanismes ; (1) la capacité de piéger des radicaux libres, (2) la réduction du  $\text{Fe}^{+3}$  en  $\text{Fe}^{+2}$ , (3) l'aptitude à inhiber la peroxydation lipidique et (4) la capacité de préserver les érythrocytes hémolysées.

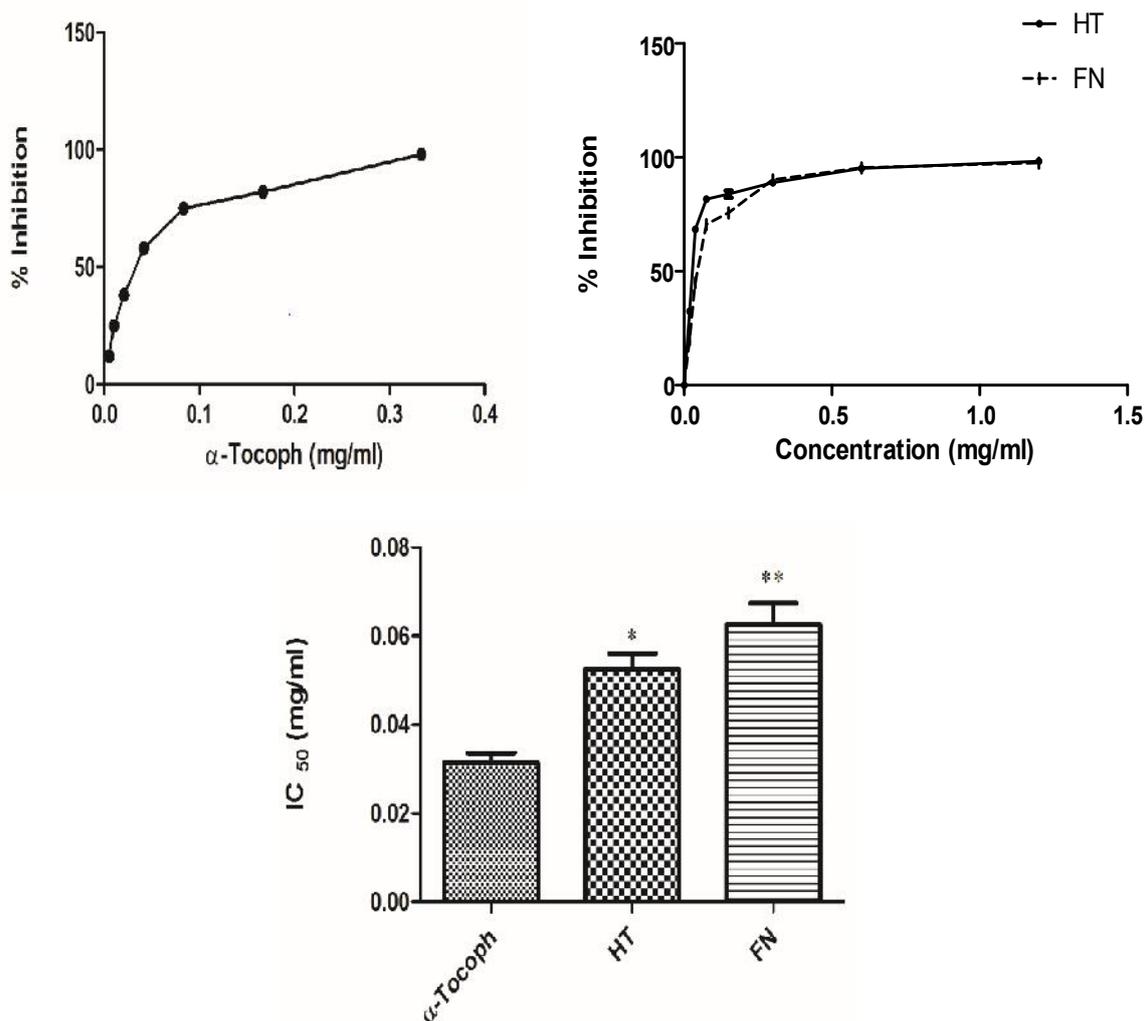
#### 3.1. Piégeage des radicaux libres

Le modèle de piégeage des radicaux libres par les antioxydants est largement utilisé pour évaluer les propriétés anti-oxydantes. Pour estimer cette capacité, nous avons utilisé deux essais ; le piégeage de l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) et le piégeage du radical hydroxyle ( $\text{OH}^{\bullet}$ ).

##### 3.1.1. Piégeage du $\text{O}_2^{\bullet-}$

Le  $\text{O}_2^{\bullet-}$  généré par le système xanthine/XOR est mesurée par sa capacité à réduire le cytochrome c. Ainsi, le taux de réduction du cytochrome c sera directement proportionnel au taux de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  généré. Les résultats sont exprimés sous forme de  $\text{IC}_{50}$  (Figure 8, tableau 9).

L'huile totale et la fraction neutre des graines de *Nigella sativa* inhibent l' $\text{O}_2^{\bullet-}$  d'une manière dose-dépendante. Le standard  $\alpha$ -tocophérol présente une bonne activité anti radicalaire avec une  $\text{IC}_{50}$  de 0.031 mg/ml. En revanche, la fraction neutre et l'huile totale présentent des  $\text{IC}_{50}$  plus élevés (0.068 et 0.052 mg/ml respectivement). Ces résultats indiquent une activité anti radicalaire relativement faible comparée à celle de l' $\alpha$ -tocophérol.



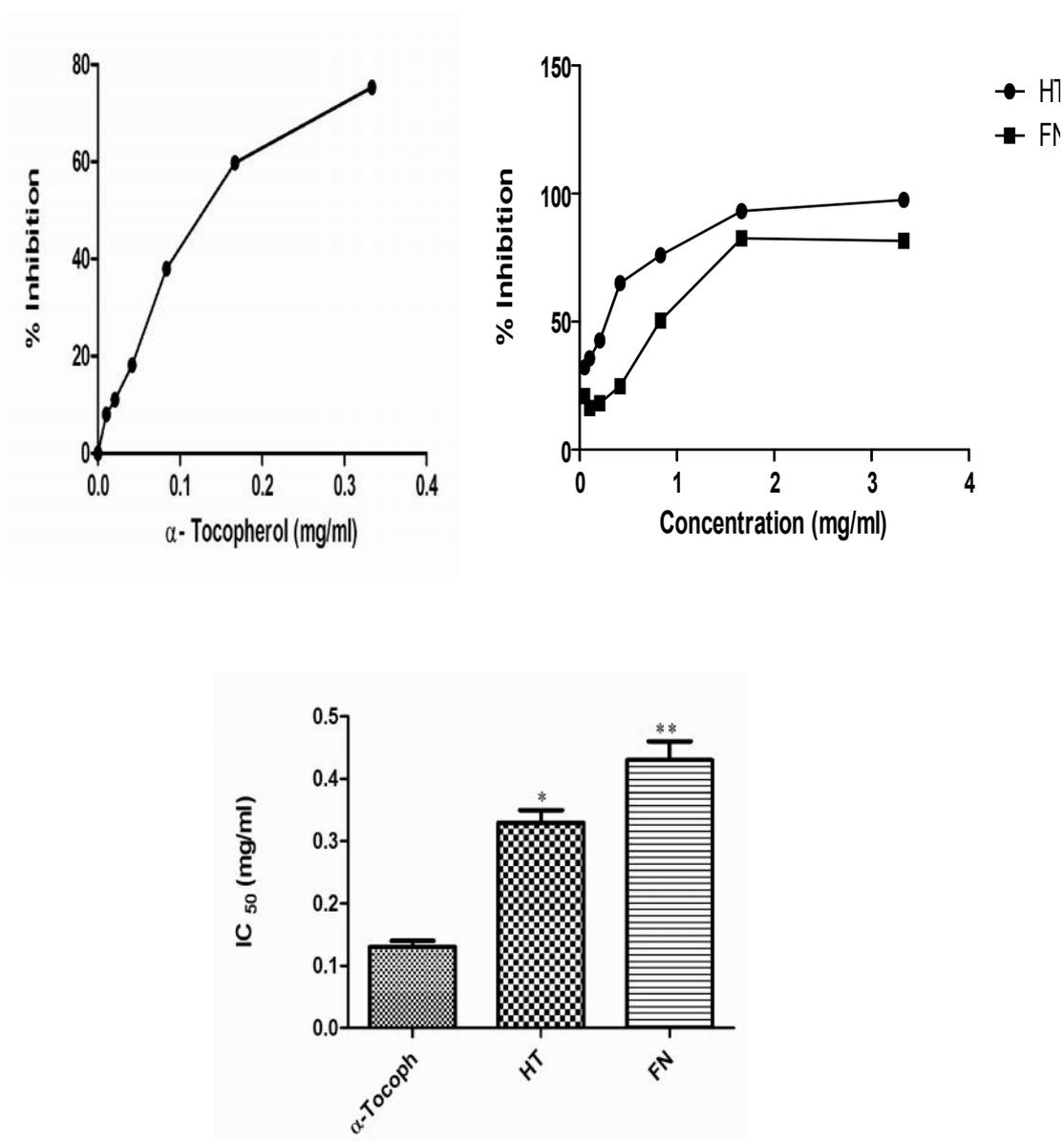
**Figure 8.** Effet piègeur de l'anion superoxyde produit dans le système (xanthine/XOR) par l'huile totale et la fraction neutre des graines de *Nigella sativa*, et de  $\alpha$ -Tocophérol. Les résultats sont représentés en pourcentage d'inhibition de l'anion superoxyde par rapport au contrôle positif. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais  $\pm$  SD, \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ .

**Tableau 9.** Valeurs des  $IC_{50}$  des extraits de *Nigella sativa* et l' $\alpha$ -tocophérol.

Fractions	$IC_{50}$ (mg/ml)
Huile totale	$0.0525 \pm 0.0074^*$
Fraction neutre	$0.0680 \pm 0.0039^{**}$
$\alpha$ -tocophérol	$0.0315 \pm 0.0056$

### 3.1.2. Piégeage du $\text{OH}^\bullet$

L'activité de piéger le  $\text{OH}^\bullet$  a été estimée en fonction de la concentration des extraits. Le pourcentage d'inhibition du radical  $\text{OH}^\bullet$  pour chaque extrait a été déterminé et les résultats obtenus sont présentés dans la figure 9 et les valeurs des  $\text{IC}_{50}$  sont présentées dans le tableau 10. Les huiles des graines de *Nigella sativa* montrent une capacité antiradicalaire dose-dépendante et l'huile totale montre la meilleure activité avec une  $\text{IC}_{50}$  de 0.330 mg/ml, mais cette activité reste faible par rapport à celle de l' $\alpha$ -Tocophérol ( $\text{IC}_{50}$  de 0.13 mg/ml).



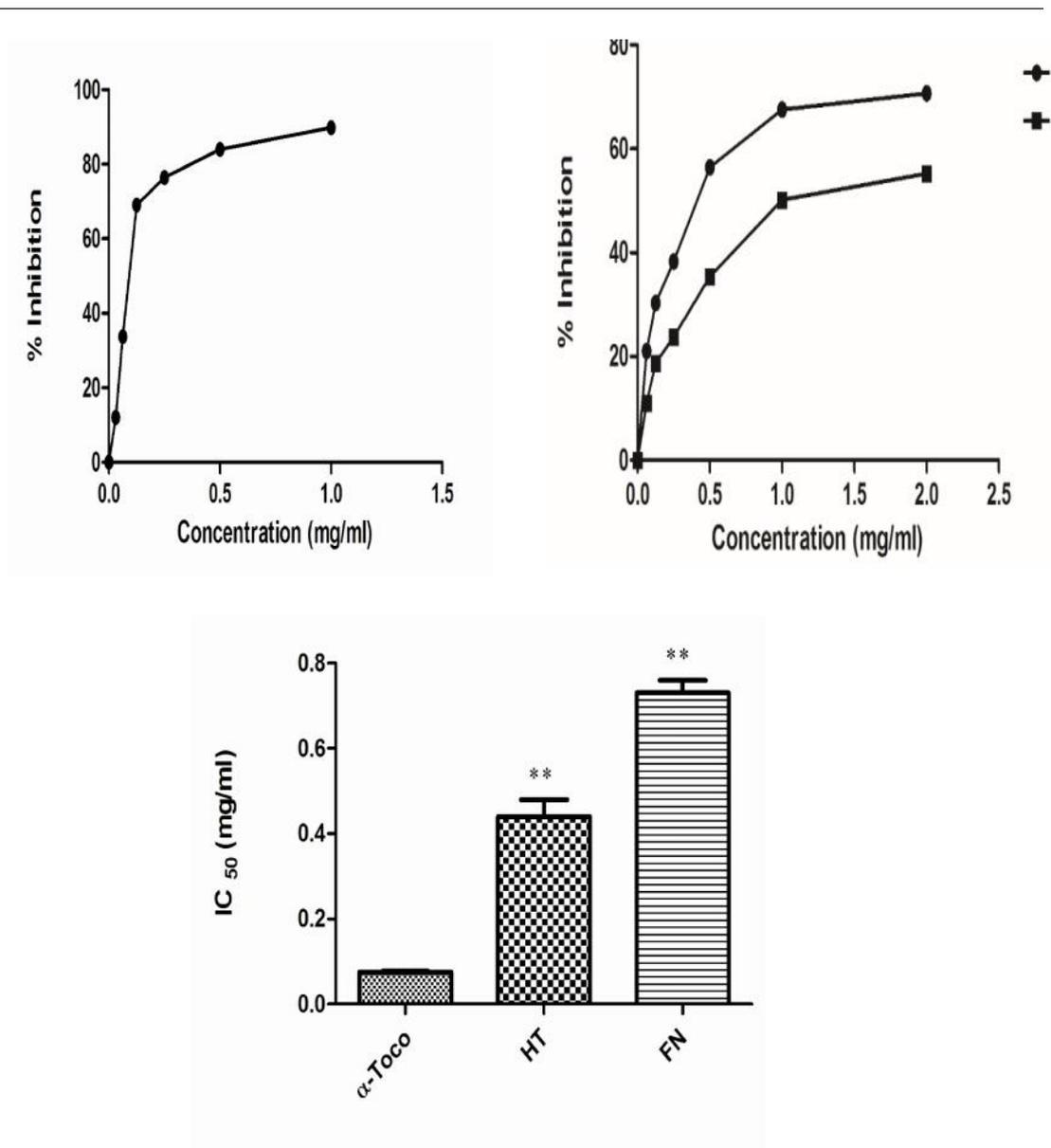
**Figure 9.** Effet piégeur du  $\text{OH}^\bullet$  par l'huile totale et la fraction neutre des graines de *Nigella sativa*, et de  $\alpha$ -Tocophérol. Les résultats sont représentés en pourcentage d'inhibition du radical hydroxyle par rapport au contrôle positif. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais  $\pm$  SD, \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ .

**Tableau 10.** Les valeurs IC<sub>50</sub> des extraits de *Nigella sativa* et le standard  $\alpha$ -Tocophérol

Fractions	IC <sub>50</sub> (mg/ml)
Huile totale	0.330 ± 0.0028*
Fraction neutre	0.460 ± 0.004**
$\alpha$ -Tocophérol	0.130 ± 0.0034

### 3.1.3. Piégeage de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Dans ce test le pourcentage d'inhibition est proportionnel à l'absorbance de la molécule H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui absorbe dans l'UV à 230 nm. Les résultats montrent que les deux fractions huile totale et fraction neutre des graines de *Nigella sativa*, à la concentration de 1mg/ml, réduisent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 67,54 % et 50,15% et avec des IC<sub>50</sub> de l'ordre de 0.440 et 0.730 mg/ml respectivement. Ainsi, l'activité anti-radicalaire des deux extraits est de loin faible par rapport à la molécule de référence,  $\alpha$ -tocophérol, utilisée où l'IC<sub>50</sub> est de l'ordre 0,075 mg/ml (figure 10, Tableau 11).



**Figure 10.** Effet piègeur du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par l'huile totale et la fraction neutre des graines de *Nigella sativa*, et de α-Tocophérol. Les résultats sont représentés en pourcentage d'inhibition du peroxyde d'hydrogène par rapport au contrôle positif. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± SD, \*\*: p≤0.01.

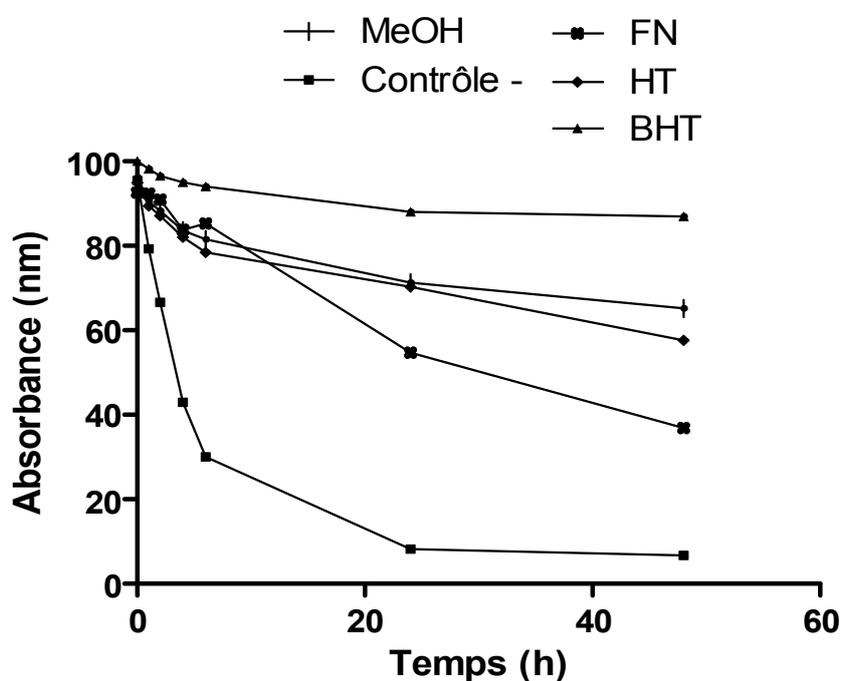
**Tableau 9.** Les valeurs IC<sub>50</sub> des extraits de graines de *Nigella sativa* et de α-Tocophérol

Fractions	IC <sub>50</sub> (mg/ml)
Huile totale	0.440 ± 0.0081
Fraction neutre	0.730 ± 0.0054
α-Tocophérol	0.075 ± 0.0022

### 3.2. Test de peroxydation lipidique

#### 3.2.1. Test du blanchissement de $\beta$ - carotène

Pour déterminer la capacité des extraits à diminuer la peroxydation lipidique causée par les radicaux libres, le test du blanchissement de la  $\beta$ - carotène a été utilisé. Ce test repose sur l'oxydation de l'acide linoléique pour générer des radicaux libres. Les pourcentages d'inhibition de la peroxydation lipidique obtenus sont présentés par la Figures (11). L'huile totale montre le meilleur pourcentage d'inhibition de 60,62% par rapport à la fraction neutre de 37,05%. Ces pourcentages d'inhibition restent inférieurs à celle du BHT de 86,93%.

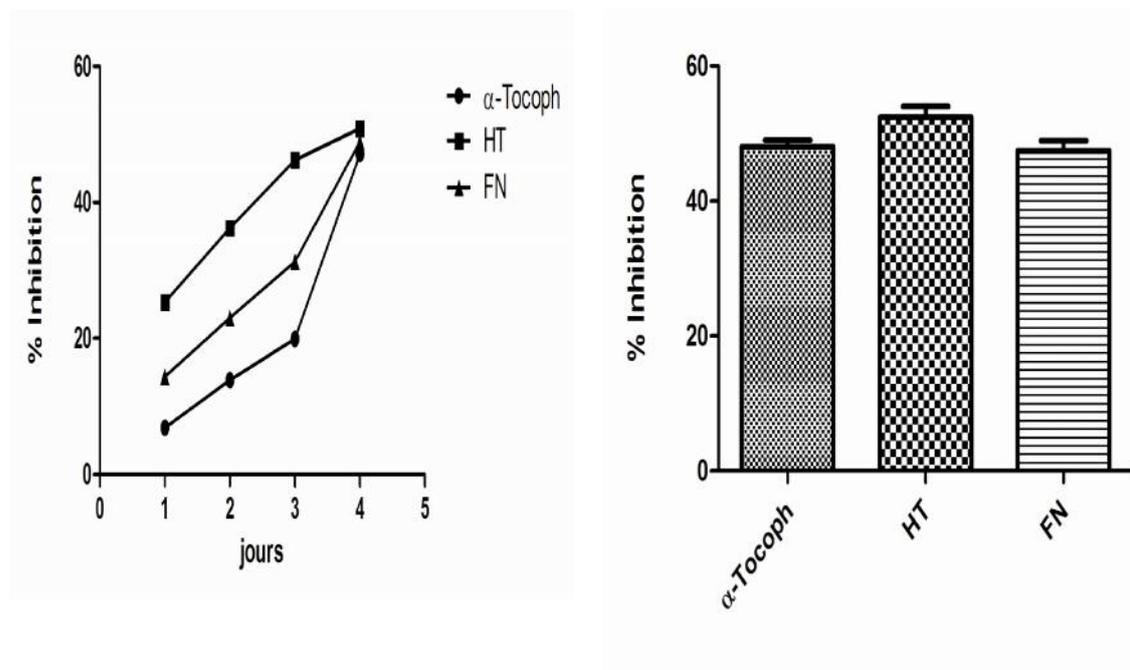


**Figure 11.** Cinétique de blanchissement du  $\beta$ -carotène à 490 nm en absence et en présence et de huile totale et la fraction neutre de graines de *Nigella sativa* par rapport au contrôles positif (BHT) qui représente une absorbance maximale et les contrôles négatifs ( $H_2O$  et MeOH) qui représentent une absorbance minimale. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais  $\pm$  SD.

#### 3.2.2. Peroxydation de l'acide linoléique

L'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique par les extraits des graines de *Nigella sativa* a été évaluée selon la méthode de thiocyanate ferrique et les résultats obtenus sont présentés par la Figure 12. D'une façon générale, l'ensemble des composés testés présentent une inhibition importante et significative ( $p \leq 0,05$ ) de la peroxydation

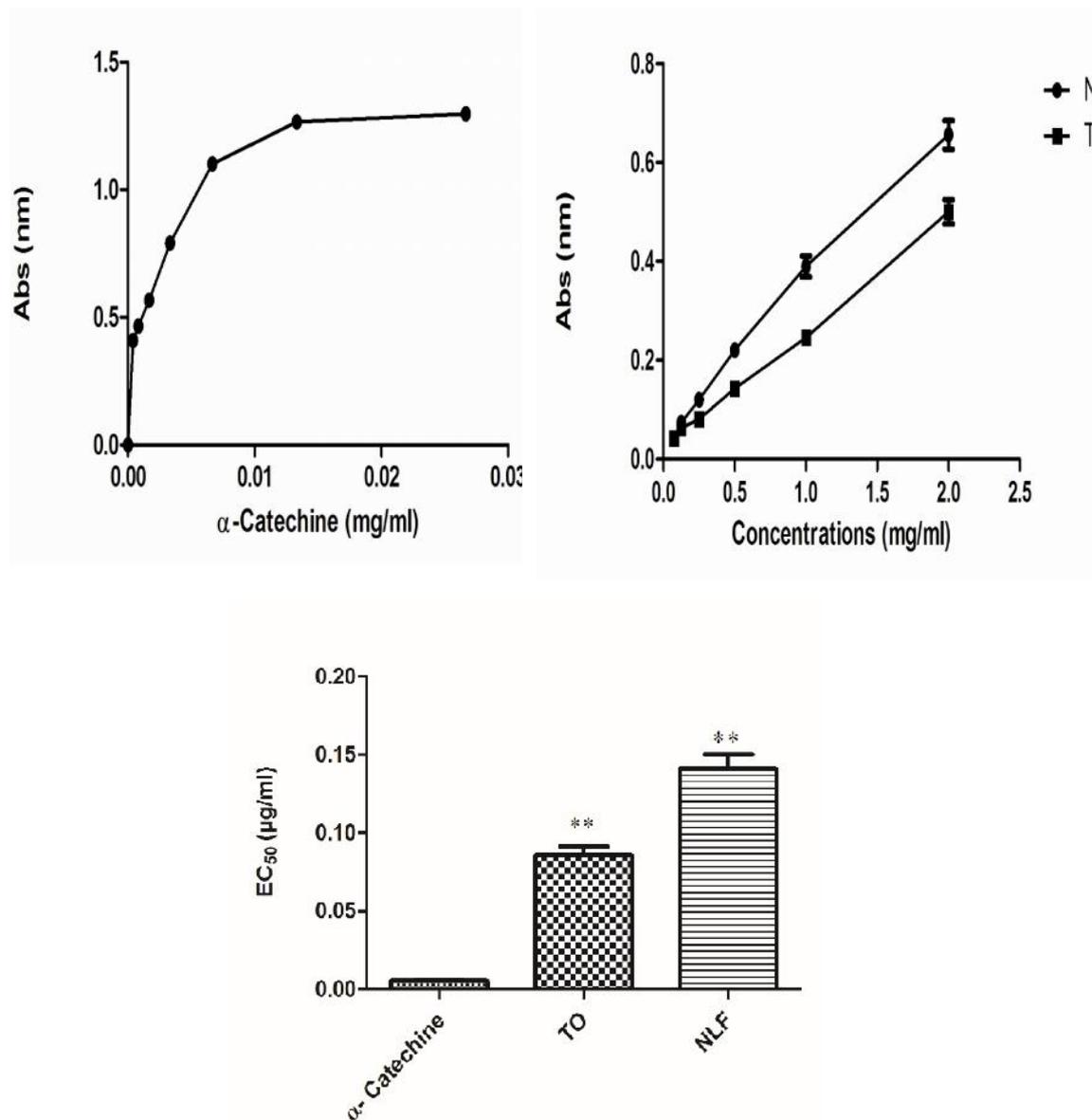
lipidique. La fraction huile totale présente l'effet inhibiteur le plus significatif avec un pourcentage d'inhibition de (50,88%) suivi par la fraction neutre (48,91%) et l' $\alpha$ -tocophérol (47,14%).



**Figure 12.** Pourcentages d'inhibition de la peroxydation lipidique par les extraits de graines de *Nigella sativa* et de l' $\alpha$ -tocophérol. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais  $\pm$  SD.

### 3.2.3. Test du pouvoir réducteur

L'aptitude d'un échantillon de donner un électron reflète leur pouvoir antioxydant, et la réduction de  $\text{Fe}^{3+}$  est un indicateur de la capacité de l'échantillon de donner un électron (Gholivand et al., 2010). Dans ce test, le pouvoir réducteur des fractions des graines de *Nigella sativa* se manifeste avec le changement de la couleur du milieu réactionnel du jaune au bleu (Figure 13). Le pouvoir réducteur est exprimé par la concentration effective à 50 % ( $\text{CE}_{50}$ ).  $\text{CE}_{50}$  et la concentration qui permet d'obtenir une absorbance de 0,5 à 700 nm. Les résultats montrent que l'huile totale présente la meilleure capacité avec une  $\text{EC}_{50}$  de 85.93 mg/ml suivi par la fraction neutre avec 141.15 mg/ml (Tableau 10).



**Figure 13.** Pouvoir réducteur de l'huile totale et la fraction neutre des graines de *Nigella sativa* par rapport au contrôle positif  $\alpha$ -catechine. Les résultats sont représentés sous forme des concentrations effectrice à 50%  $CE_{50}$ . Chaque valeur représente la moyenne de trois essais  $\pm$  SD, \*\*:  $p \leq 0.01$ .

**Tableau 10.** Les  $CE_{50}$  de l'huile totale et de la fraction neutre des graines de *Nigella sativa* et de l' $\alpha$ -Catéchine.

Fractions	$CE_{50}$ (mg/ml)
Huile totale	$85.93 \pm 0.007$
Fraction neutre	$141.15 \pm 0.0013$
$\alpha$ -Catéchine	$5.60 \pm 0.0034$

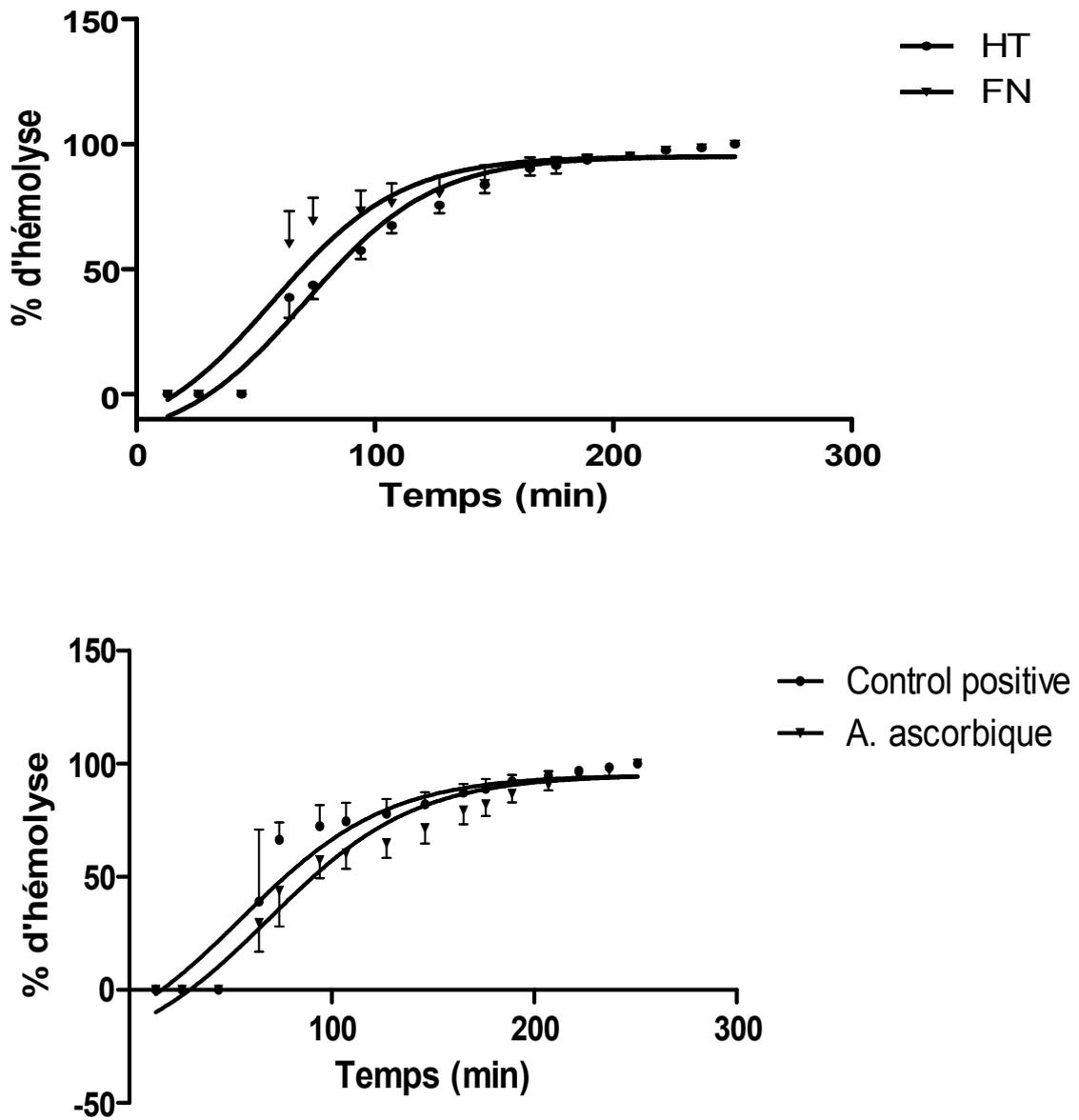
### 3.2.4. Test d'hémolyse oxydative

Dans ce test, t-BHP est utilisé pour induire une hémolyse oxydative. Le t-BHP, agent d'oxydation membranaire, provoque des endommagements par ; l'augmentation de la perméabilité membranaire au  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  et sucres de faible poids moléculaire et/ou la modification de l'ensemble du cytosquelette (Dwight et Hendry, 1996). Le paramètre utilisé pour évaluer cette capacité antioxydante est l'indice  $\text{TH}_{50}$  qui est le temps nécessaire à la lyse de 50% des érythrocytes.

Les résultats montrent que le traitement par l'huile totale et la fraction neutre entraîne un retardement de l'hémolyse qui se manifeste par un décalage des courbes sigmoïdes d'hémolyse vers la droite (Figure 14). Effectivement les valeurs du  $\text{TH}_{50}$  calculées révèlent un prolongement du temps de demie hémolyse par rapport au groupe contrôle. L'huile totale a provoqué un retardement significatif ( $p \leq 0,01$ ) de l'hémolyse ( $\text{HT}_{50}$   $76,96 \pm 1,22$  min.) suivi par la fraction neutre avec un  $\text{HT}_{50}$  de  $60,66 \pm 0,97$  min (Tableau 11).

**Tableau 11.** Temps de demi-hémolyse  $\text{HT}_{50}$  des extraits des graines de *Nigella sativa* et de l'acide ascorbique comme contrôle. Chaque valeur est représentée en tant que moyen  $\pm$  SD (n = 3). Les comparaisons sont faites par rapport au contrôle. \*\* :  $p \leq 0,01$ , \*\*\* :  $p \leq 0,001$ , ns: non significatif.

Fractions	$\text{HT}_{50}$ (min)	% HI
Contrôle positif	$58,33 \pm 1,78$	$14,23 \pm 1,12$
Acide ascorbique	$72,50 \pm 2,78^{**}$	$45 \pm 1,8^{**}$
Huile totale	$76,96 \pm 1,22^{***}$	$53,92 \pm 2,05^{***}$
Fraction neutre	$60,66 \pm 0,97^{\text{ns}}$	$21,32 \pm 1,07^{\text{ns}}$



**Figure 14.** Cinétique de l'hémolyse en présence de l'huile totale et de la fraction neutre des graines de *Nigella sativa* et de contrôle positif la vitamine. Les résultats sont représentés en temps de demi-hémolyse HT50. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais  $\pm$  SD.

Le stress oxydant est impliqué dans la physiopathologie de nombreuses maladies chez l'homme y compris les atteintes hépatiques liées à l'alcool. Pour évaluer l'activité antioxydante de nos extraits, nous avons choisis des tests *in vitro* qui ont pour spécificité de produire les mêmes radicaux libres que ceux produits dans l'organisme ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $OH^{\bullet}$ ,  $H_2O_2$ ).

Globalement, les résultats indiquent que l'huile totale est douée d'une bonne activité anti-radicalaire. Cette activité pourrait être expliquée par la richesse naturelle de l'huile végétale en lipides bioactifs tels que les phétostérols, les vitamines liposolubles notamment, les  $\alpha$ -tocophérols et les  $\beta$ -carotènes, les acides gras insaturés notamment les  $\omega$ -3 et  $\omega$ -6 (Ramadan et Morsel 2002a; 2003). De plus, l'huile totale peut aussi contenir des composés phénoliques à caractères amphiphiles (Sultan et *al.*, 2009).

L'huile totale présente aussi un meilleur pouvoir réducteur par rapport à la fraction neutre ( $CE_{50}$   $85.93 \pm 0.007$  mg/ml et  $141.15 \pm 0.013$  mg/ml respectivement). Le pouvoir réducteur de l'huile totale pourrait être expliqué par la présence de lipides polaires notamment les phospholipides caractérisés par la présence de groupements amines, tels que la phosphatidyl éthanol amine et la phosphatidyl choline, et ceux qui renferment dans leur structure un sucre réducteur comme la phosphatidylinositol,....etc. Tous ces groupes peuvent faciliter le transfert d'électrons (Hudson et Lewis, 1983 ; Hildebrand et *al.*, 1984).

L'effet de l'huile totale et de la fraction neutre contre la peroxydation lipidique *in vitro* a été évalué à travers deux tests ; blanchissement de  $\beta$ -carotène et peroxydation de l'acide linoléique. Ainsi, l'acide linoléique pourrait servir de modèle d'acides gras membranaires. Durant la peroxydation lipidique, les antioxydants agissent de différentes façons à savoir le piégeage des radicaux libres, la décomposition des peroxydes et la chélation des ions métalliques (Sandhar et *al.*, 2011). Nos résultats suggèrent que les extraits des graines de *Nigella sativa* ont une capacité considérable de réagir avec les radicaux libres pour les convertir en espèces non réactives et interrompre la chaîne de réactions radicalaires, et par conséquent, ils exercent un très bon effet sur la peroxydation lipidique.

La capacité anti-hémolytique a été évaluée *in vitro* en utilisant des érythrocytes de souris qui constituent un modèle adéquat pour l'étude du stress oxydatif sur des membranes biologiques entières (Arbos et *al.*, 2008; Çimen, 2008). Nos résultats indiquent que l'huile totale possède un effet anti-hémolytique important ( $HT_{50}$  de 76.96 min). Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par Mezité et ses collaborateurs (2012) par un

autre travail *in vivo* au niveau de notre laboratoire, ils sont démontrés un prolongement d'hémolyse considérable par l'huile fixe de *Nigella sativa* ( $HT_{50} 132,15 \pm 2,96$  min). Ceci pourrait être expliqué soit par sa capacité à inhiber la dégradation des protéines, soit par protection des globules rouges contre la perte de déformabilité. En outre, on peut expliquer cet effet protecteur par la capacité de l'huile à interférer avec le système érythrocytaire antioxydant soit en activant les enzymes antioxydants ou en augmentant la consommation de composés antioxydants tels que la vitamine E et le glutathion qui sont présents dans la membrane des érythrocytes (Stocker et *al.*, 2003; Djeridane et *al.*, 2007).

L'effet antioxydant est variable d'un test à l'autre. Pour l'effet inhibiteur de la peroxydation lipidique, l'huile totale et la fraction neutre agissent avec des effets proches, autour de 50% d'inhibition de la peroxydation (50,88%, 60,62% pour l'huile totale et 48,91%, 37,05% pour la fraction neutre) pour les deux tests utilisés (peroxydation de l'acide linoléique et blanchissement de  $\beta$ -carotène) respectivement. Alors que pour les tests anti radicalaires, on note que l'huile totale est la plus active. Pour le test du pouvoir réducteur, l'huile totale est toujours la plus puissante avec une  $EC_{50}$  de 85.93 mg/ml. Ceci suggère que les mécanismes employés dans ces actions sont différents en fonction de la nature des molécules actives. Nous rappelons que l'huile totale constituée de 96% des lipides neutres dont les vitamines liposolubles notamment  $\alpha$ -tocophérol (Ramadan et Morcel, 2002 ; Atta, 2003 ; Chikh-Rouhou et *al.*, 2008).

Il est important de signaler que l'huile totale et la fraction neutre sont dotées d'une bonne activité anti-oxydante, exercée par le biais de plusieurs mécanismes. Cependant, c'est l'effet sur l'inhibition de la peroxydation lipidique qui est le plus significatif.

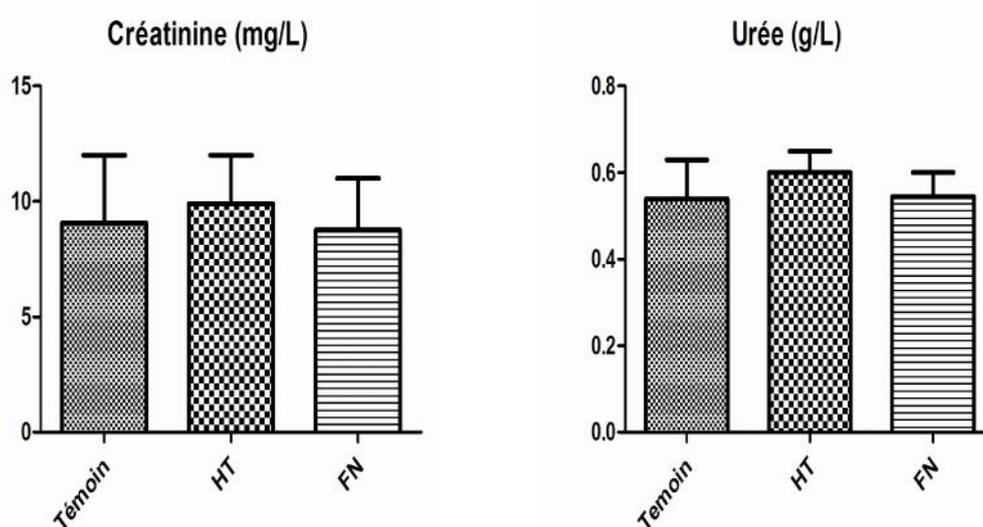
## 4. Effet hépatoprotecteur de l'huile totale et la fraction neutre

### 4.1. Évaluation de la toxicité des fractions de *Nigella sativa*

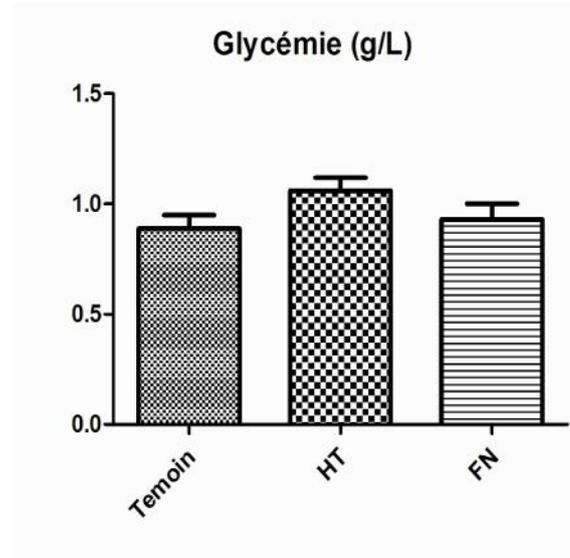
#### 4.1.1. Etude des paramètres biochimiques

La toxicité de l'huile totale et la fraction neutre des graines de *Nigella sativa* a été évaluée par le dosage des marqueurs d'intégrité hépatique (ASAT, ALAT, PAL), rénal (urée et créatinine) et lipidique (cholestérol et triglycéride). De même une étude histopathologique du foie et des reins des rats traités a été réalisée.

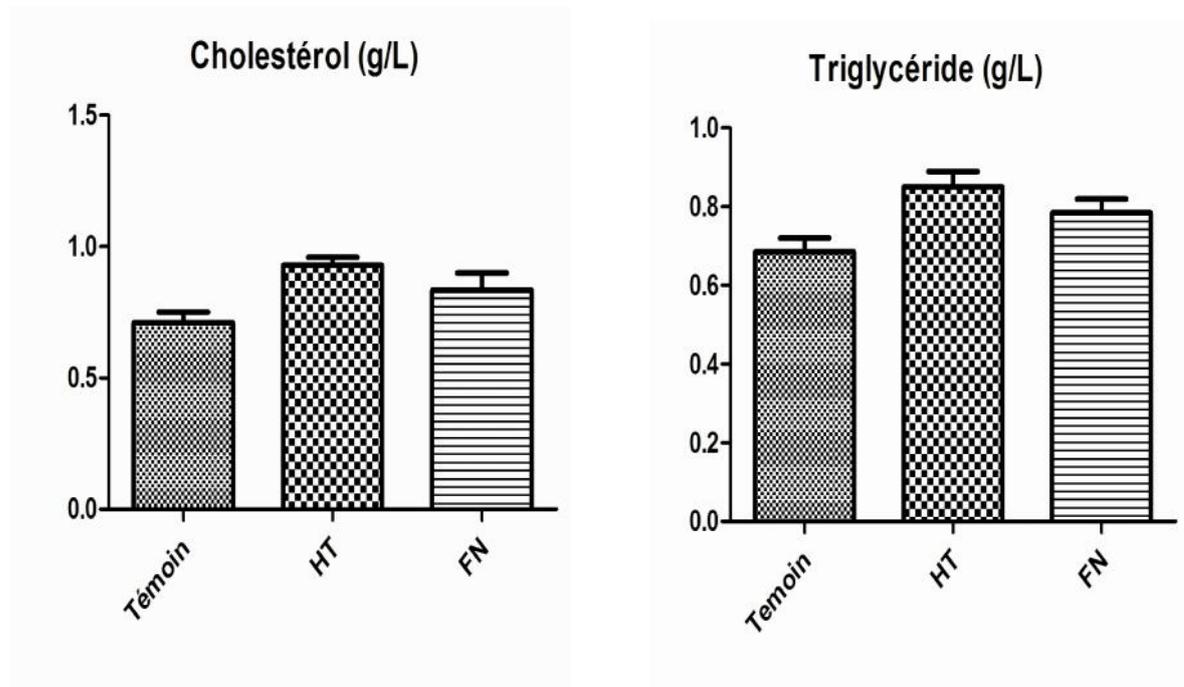
Les résultats montrent que le bilan rénal, en termes du taux de l'urée et de créatinine, ne présente aucune différence significative entre les différents groupes d'animaux traités par rapport au groupe témoin (Figure 15 et Tableau 12). Pour la glycémie et le bilan lipidique, aucune différence significative n'a été observée entre les groupes traités par l'huile totale, la fraction neutre et le groupe témoin (Figure 16, 17 Tableau 12). De même les marqueurs hépatiques révèlent, d'une manière générale, une absence de l'effet toxique. En effet, l'activité de l'ALAT, ASAT, et PAL ne présentent aucun changement significatif dans les différents groupes expérimentaux (Figure 18, Tableau 12).



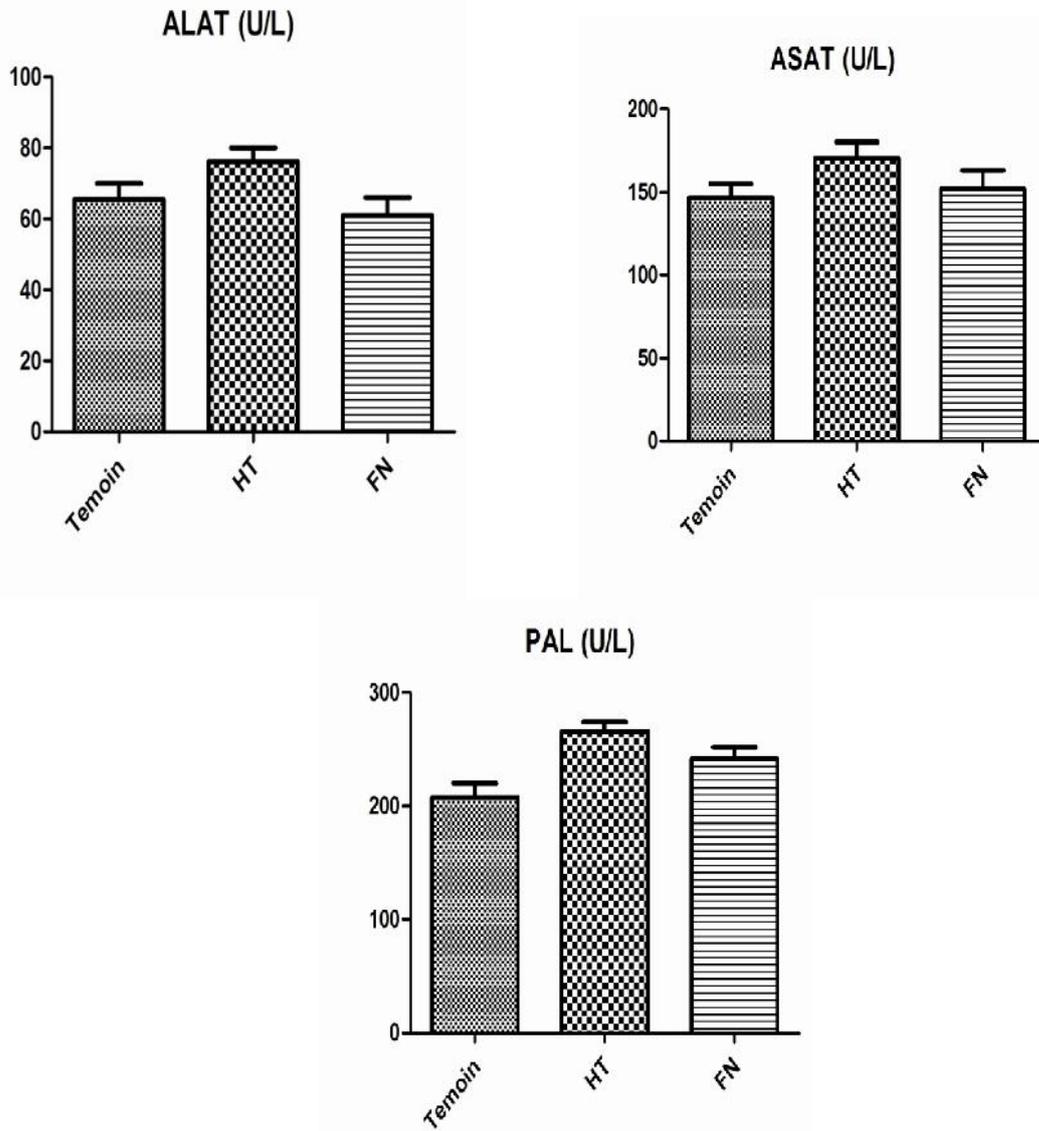
**Figure 15.** Bilan rénal (Urée et Créatinine) de groupes de rats traités avec de l'huile totale (400 mg/kg) et de la fraction neutre (300 mg/kg) des graines de *Nigella sativa* pendant 4 semaines par rapport au groupe de rats normaux. Chaque valeur est représentée en tant que moyen  $\pm$  SEM



**Figure 16.** Glycémie de groupes de rats traités avec de l'huile totale (400 mg/kg) et de la fraction neutre (300 mg/kg) des graines de *Nigella sativa* pendant 4 semaine par rapport au groupe de rats normaux. Chaque valeur est représentée en tant que moyen  $\pm$  SEM.



**Figure 17.** Bilan lipidique (Cholestérol et Triglycéride) des groupes de rats traités avec de l'huile totale (400 mg/kg) et de la fraction neutre (300 mg/kg) des graines de *Nigella sativa* pendant 4 semaine par rapport au groupe de rats normaux. Chaque valeur est représentée en tant que moyen  $\pm$  SEM.



**Figure 18.** Bilan hépatique (ASAT, ALAT et PAL) des groupes de rats traités avec de l'huile totale (400 mg/kg) et de la fraction neutre (300 mg/kg) des graines de *Nigella sativa* pendant 4 semaine par rapport au groupe de rats normaux. Chaque valeur est représentée en tant que moyen  $\pm$  SEM.

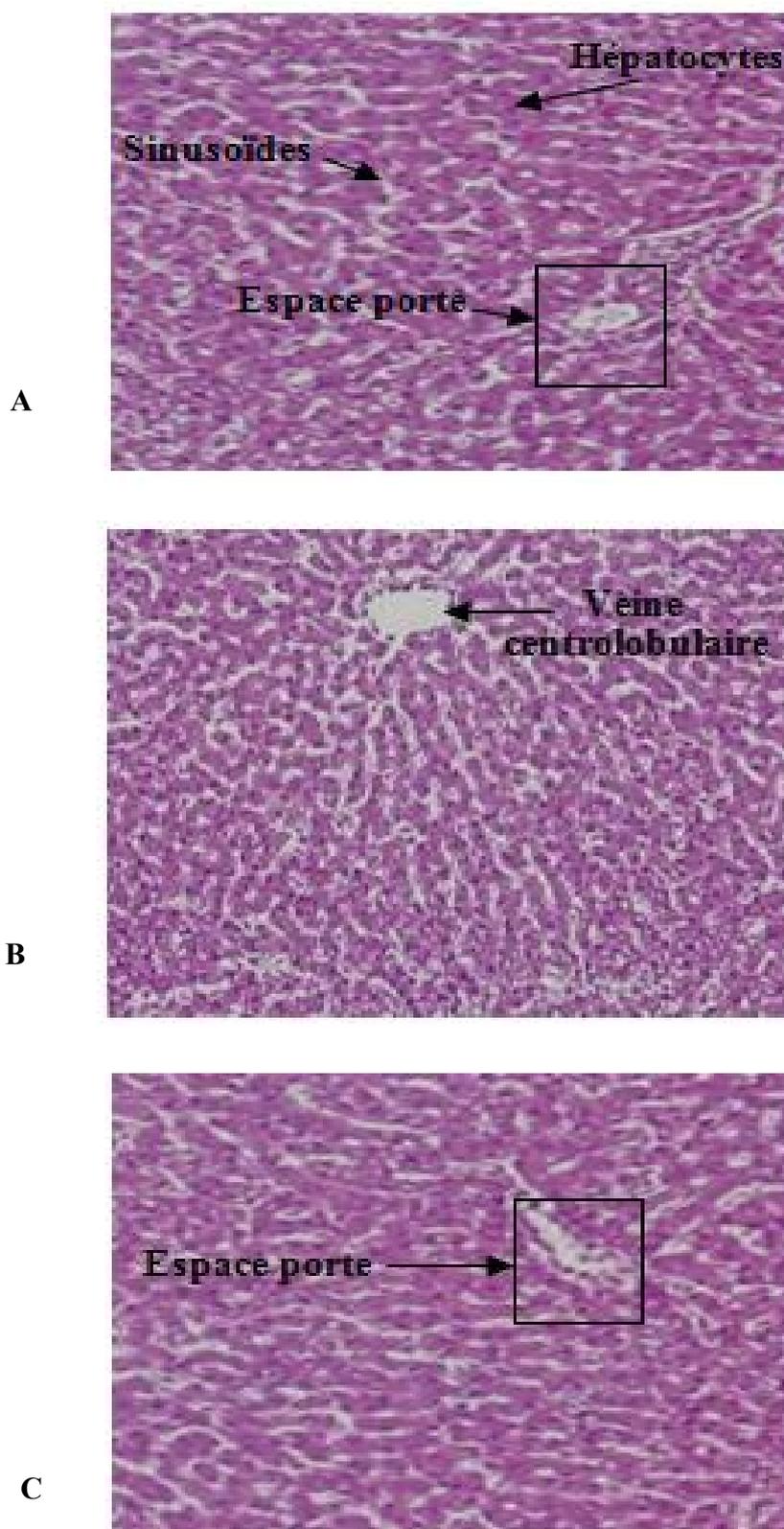
**Tableau 12.** Bilan hépatique, lipidique et rénal des groupes de rats traités avec de l'huile totale (400 mg/kg) et de la fraction neutre (300 mg/kg) des graines de *Nigella sativa* pendant 4 semaine par rapport au groupe de rats normaux. Chaque valeur est représentée en tant que moyen  $\pm$  SEM.

Paramètres	Témoin	Huile totale	Fraction neutre
ASAT	138 $\pm$ 16,36	160,66 $\pm$ 22,48	141 $\pm$ 26,62
ALAT	61 $\pm$ 5,47	72,34 $\pm$ 9,72	56,16 $\pm$ 12,38
PAL	194,83 $\pm$ 28,43	257,66 $\pm$ 27,74	230,67 $\pm$ 22,73
Glycémie	0,83 $\pm$ 0,12	1,0 $\pm$ 0,16	0,86 $\pm$ 0,19
Cholestérol	0,67 $\pm$ 0,06	0,9 $\pm$ 0,07	0,77 $\pm$ 0,18
Triglycéride	0,65 $\pm$ 0,09	0,81 $\pm$ 0,09	0,75 $\pm$ 0,11
Urée	0,45 $\pm$ 0,25	0,55 $\pm$ 0,13	0,49 $\pm$ 0,11
Créatinine	6,15 $\pm$ 0,84	7,81 $\pm$ 0,5	6,53 $\pm$ 0,69

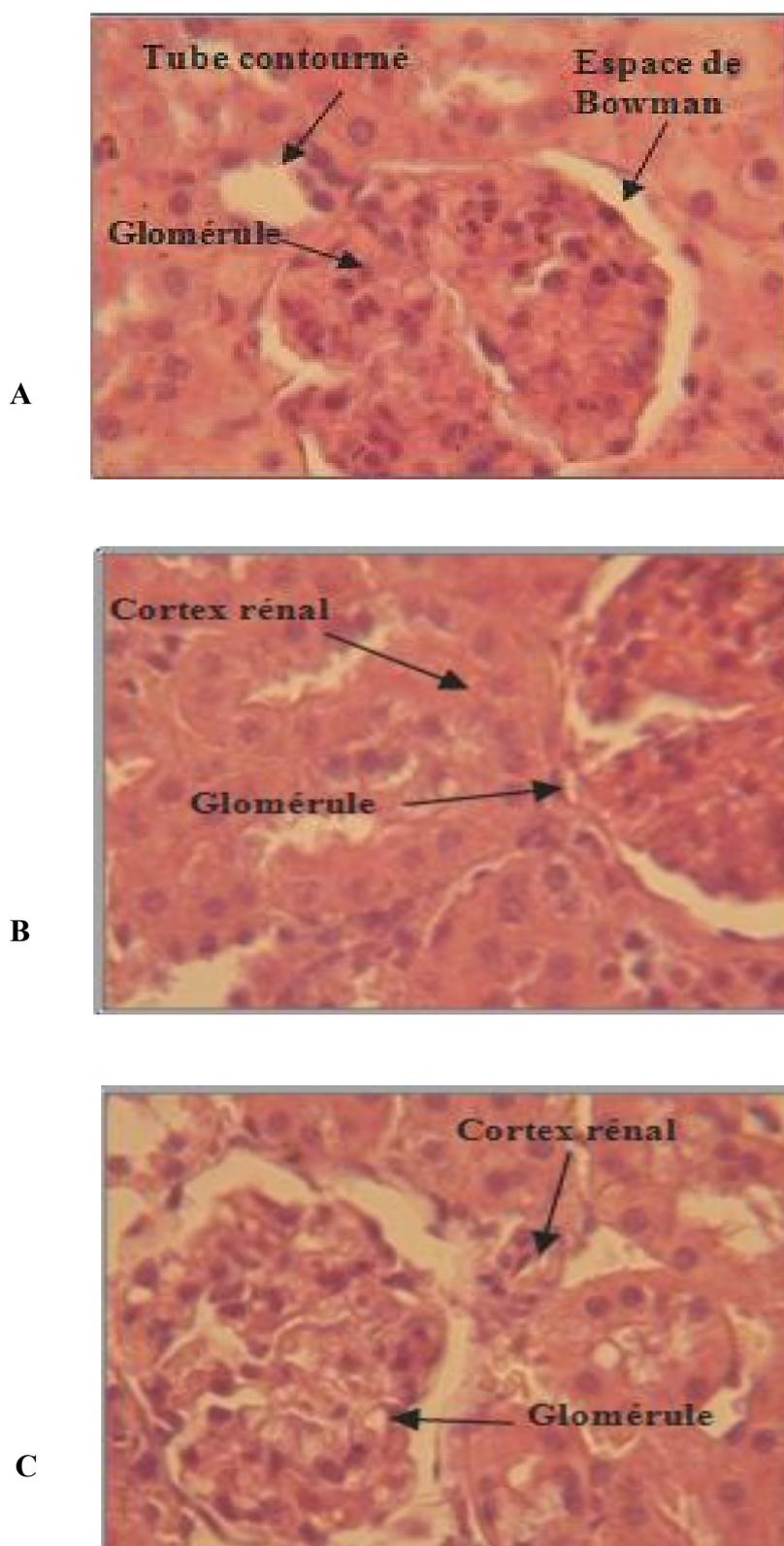
#### 4.1.2. Etude histo-pathologique

Les résultats de l'étude histo-pathologique du foie et des reins montrent que les deux extraits des graines de *Nigella sativa* utilisés n'ont aucune toxicité apparente ; ce qui manifeste par l'absence de lésions tissulaires et changement structurel par rapport au groupe témoin (Figures 19, 20 respectivement). Ceci suggère qu'il n'y'aura pas d'altération fonctionnelle liée aux changements structuraux du tissu.

D'après les résultats du dosage des paramètres biochimiques, l'huile totale et la fraction neutre de *Nigella sativa*, administrées à des concentrations de 400 mg/kg/jours et 300 mg/kg/jour respectivement pendant une période de 28 jours, ne présentent aucune toxicité sur le foie et les reins. Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par Sobhi et ses collaborateurs avec les mêmes fractions *in vivo*, sur un modèle animal et *in vitro* sur des tranche du foies (Sobhi et *al.*, 2011). Ces résultats biochimiques et histologiques concordent avec ceux rapportés par Dollah et ses collaborateurs soulignant que *Nigella sativa* ne présente aucune toxicité hépatique ou rénale (Dollah et *al.*, 2013).



**Figure 19.** Coupes histologiques du foie des groupes des rats ; A: groupe témoin, tissu hépatique normale. B: rats traités avec de l'huile totale (400mg/kg) pendant 4 semaines, tissu hépatique conservé. C: rats traités avec la fraction neutre (300 mg/kg) pendant 4 semaines, tissu hépatique conservé.



**Figure 20.** Coupes histologiques des reins des groupes des rats ; A: groupe témoin, tissu rénal normale. B: rats traités avec de l'huile totale (400mg/kg) pendant 4 semaines, tissu rénal conservé. C: rats traités avec la fraction neutre (300 mg/kg) pendant 4 semaines, tissu rénal conservé.

La DL<sub>50</sub> de l'huile fixe a été déterminée à 28.8 ml/kg (Zaoui et al., 2000b), ce qui montre une toxicité quasi nulle surtout lorsqu' on note que cette huile préserve la stabilité des enzymes hépatiques clés et l'intégrité de l'organe (Zaoui et al., 2000b). Ceci suggère une large marge de sécurité pour les doses thérapeutiques de l'huile fixe de *Nigella sativa*. Des études sur certains extraits de cette plante à savoir l'huile volatile, la thymoquinone, l'extrait aqueux et alcoolique ont montré une très faible toxicité (Houghton et al., 1995). Cependant, il existe des résultats controversés pour la DL<sub>50</sub> de thymoquinone administrés par voie intra-péritonéale (de l'ordre 100 mg/kg) et par voie orale (de l'ordre 1000 mg/kg) (Al-Ali et al., 2008).

En 2009, Khader et ses collaborateurs ont rapporté un effet cyto-toxique et génotoxique en fonction de la concentration de la thymoquinone. En effet, la thymoquinone induit un effet anti-prolifératif à une concentration de 20 µM mais à concentration plus élevée, elle provoque une cyto-toxicité aigue. La thymoquinone augmente significativement le taux des cellules nécrosées lorsqu'on l'utilise à une concentration de 2.5 et 20 µM. De plus, la thymoquinone peut être métabolisée en espèces réactive et augmente le stress oxydatif qui contribue à la déplétion des enzymes antioxydantes et provoque l'oxydation de l'ADN dans les hépatocytes traités avec des concentrations élevées (Khader et al., 2009).

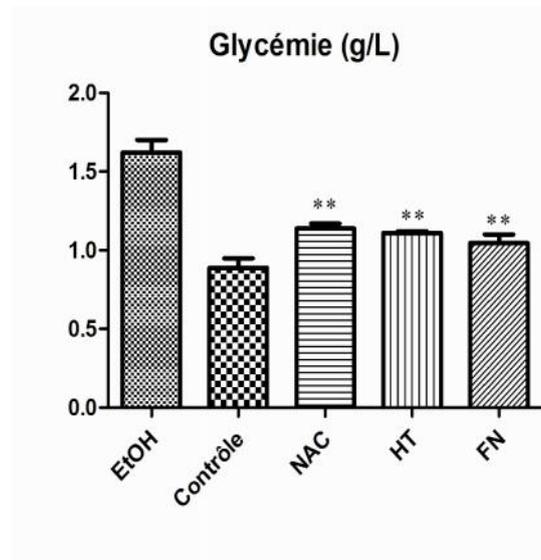
## **4.2. Effet des fractions de *Nigella sativa* sur l'hépatotoxicité alcoolique**

### **4.2.1. Effet sur les paramètres biochimiques**

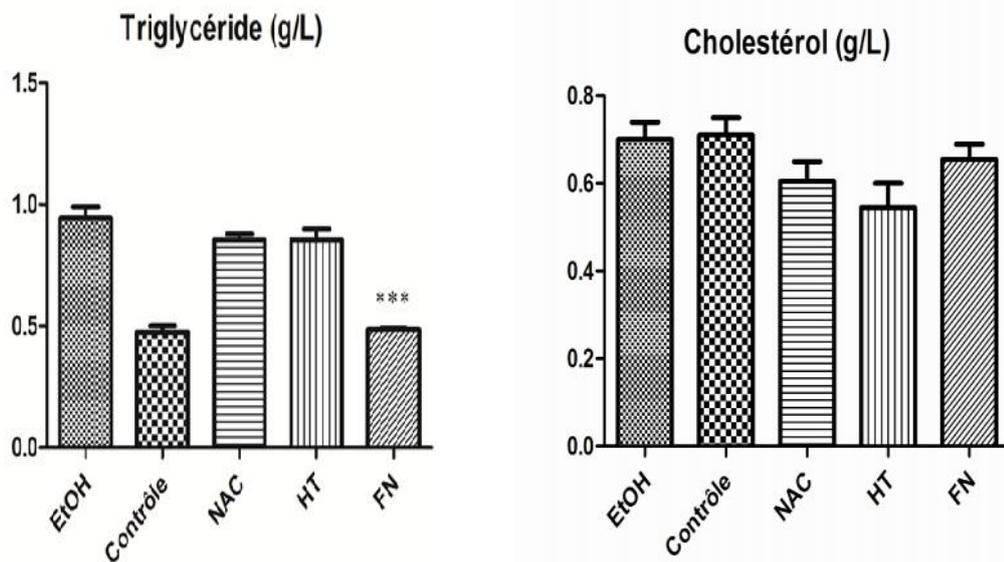
Après l'évaluation du statut du stress oxydant tissulaire et plasmatique, on a vérifié le bilan biochimique. Ce bilan consiste en un bilan hépatique (dosage des enzymes hépatiques ASAT, ALAT et PAL), bilan rénal (Urée et Créatinine), bilan lipidique (Triglycéride et Cholestérol) et la Glycémie. Le tableau 13 illustre les effets de l'huile totale et de la fraction neutre de *Nigella sativa* sur le bilan biochimique chez les rats traités avec l'éthanol pendant 4 semaines.

Après six semaines du traitement sur les rats atteints de l'hépatotoxicité alcoolique, les résultats montrent que les fractions de *Nigella sativa* ont montré une diminution significative ( $p \leq 0.05$ ) de la glycémie et de l'activité des enzymes hépatiques (Figure 21 et 23). Aussi, on note que la fraction neutre a diminué d'une manière significative ( $p \leq 0.05$ ) le taux du triglycéride (Figure 22). Par contre, pour le cholestérol et le bilan rénal (Figure 22

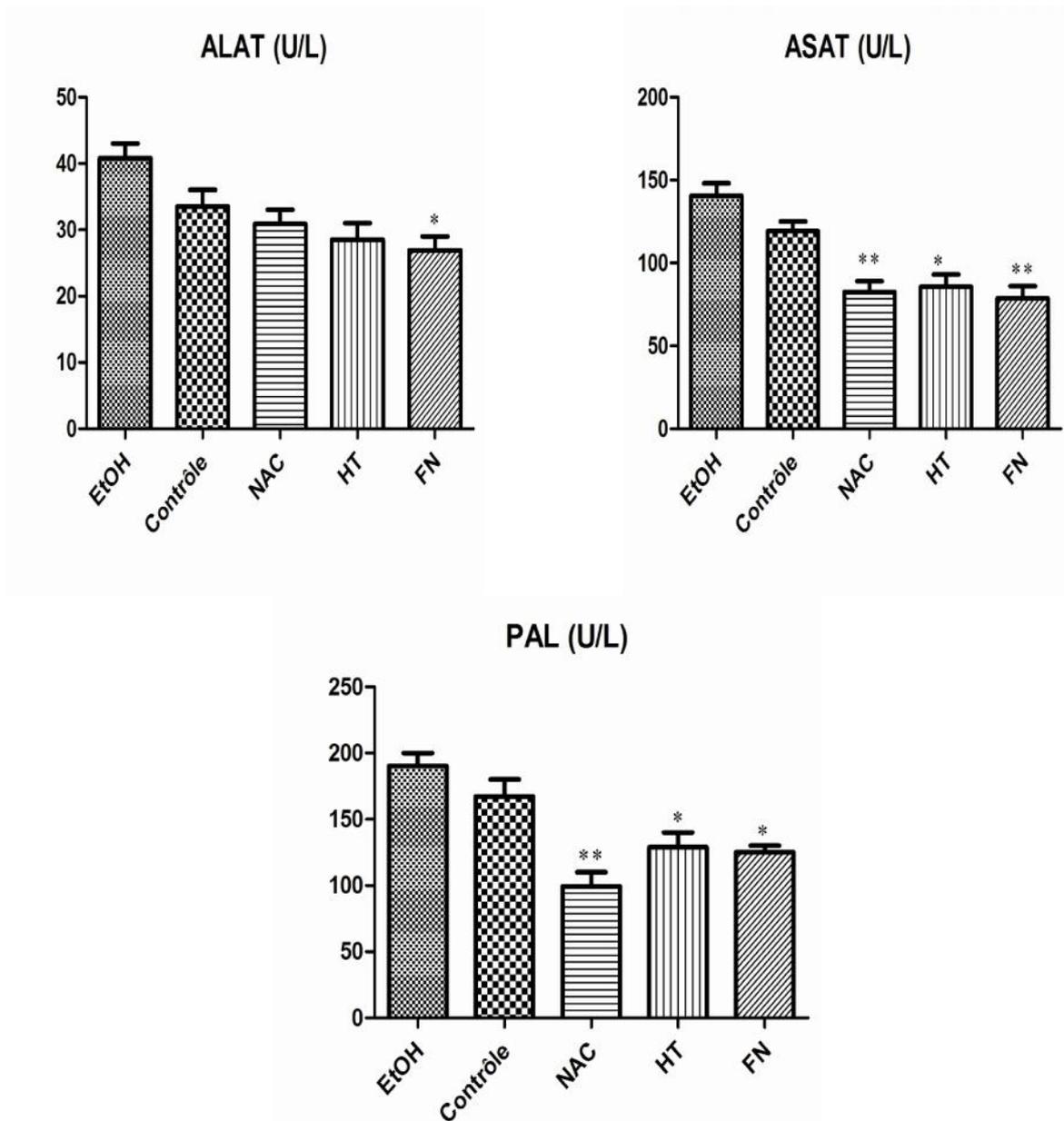
et 24), il n'y a aucune différence significative entre les différents groupes de rats traités et le groupe de rats témoins.



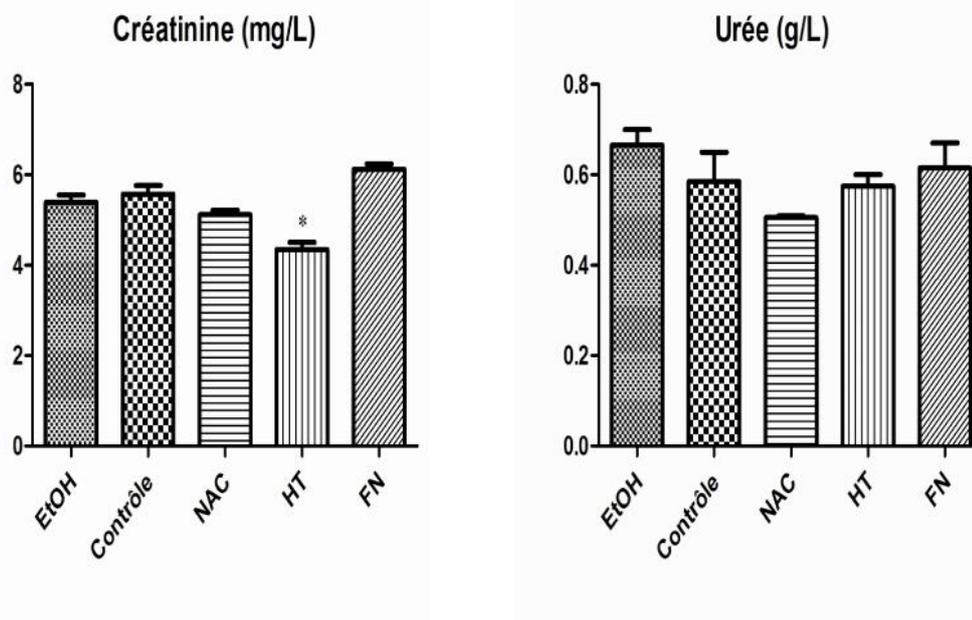
**Figure 21.** Glycémie des groupes de rats alcooliques traités avec de l'huile totale (400 mg/kg) et de la fraction neutre (300 mg/kg) des graines de *Nigella sativa* pendant 4 semaine par rapport au groupe de rats normaux. Chaque valeur est représentée en tant que moyen  $\pm$  SEM.



**Figure 22.** Bilan lipidique des groupes de rats alcooliques traités avec de l'huile totale (400 mg/kg) et de la fraction neutre (300 mg/kg) des graines de *Nigella sativa* pendant 4 semaine par rapport au groupe de rats normaux. Chaque valeur est représentée en tant que moyen  $\pm$  SEM



**Figure 23.** Bilan hépatique des groupes de rats alcooliques traités avec de l'huile totale (400 mg/kg) et de la fraction neutre (300 mg/kg) des graines de *Nigella sativa* pendant 4 semaine par rapport au groupe de rats normaux. Chaque valeur est représentée en tant que moyen  $\pm$  SEM.



**Figure 24.** Bilan rénal Bilan des groupes de rats alcooliques traités avec de l'huile totale (400 mg/kg) et de la fraction neutre (300 mg/kg) des graines de *Nigella sativa* pendant 4 semaine par rapport au groupe de rats normaux. Chaque valeur est représentée en tant que moyen  $\pm$  SEM.

**Tableau 13.** Effets des fractions de *Nigella sativa* sur les paramètres biochimiques chez les groupes expérimentaux.

Paramètres biochimiques	Contrôle	EtOH	NAC	Huile totale	Fraction neutre
ASAT (U/L)	113,38 $\pm$ 16,36	133,33 $\pm$ 63,73	76,33 $\pm$ 8,45	78,66 $\pm$ 12,48	71,61 $\pm$ 18,49
ALAT(U/L)	31 $\pm$ 5,47	38,63 $\pm$ 5,97	28,83 $\pm$ 5,45	26 $\pm$ 5,72	24,90 $\pm$ 2,40
PAL (U/L)	154,83 $\pm$ 28,43	180,83 $\pm$ 57,92	89 $\pm$ 17,23	117,66 $\pm$ 38,74	120,17 $\pm$ 7,98
Glycémie (g/L)	0,83 $\pm$ 0,12	1,54 $\pm$ 0,33	1,11 $\pm$ 0,11	1,10 $\pm$ 0,16	0,99 $\pm$ 0,20
Cholestérol (g/L)	0,67 $\pm$ 0,06	0,66 $\pm$ 0,08	0,56 $\pm$ 0,09	0,49 $\pm$ 0,07	0,62 $\pm$ 0,14
Triglycéride (g/L)	0,45 $\pm$ 0,09	0,90 $\pm$ 24	0,83 $\pm$ 0,05	0,81 $\pm$ 0,09	0,49 $\pm$ 0,09
Urée (g/L)	0,52 $\pm$ 0,13	0,63 $\pm$ 0,13	0,51 $\pm$ 0,099	0,55 $\pm$ 0,14	0,67 $\pm$ 0,7
Créatinine (mg/L)	5,23 $\pm$ 0,33	5,38 $\pm$ 0,52	5,01 $\pm$ 1,75	4,2 $\pm$ 0,93	6,24 $\pm$ 0,18

#### 4.2.2. Etude histopathologique

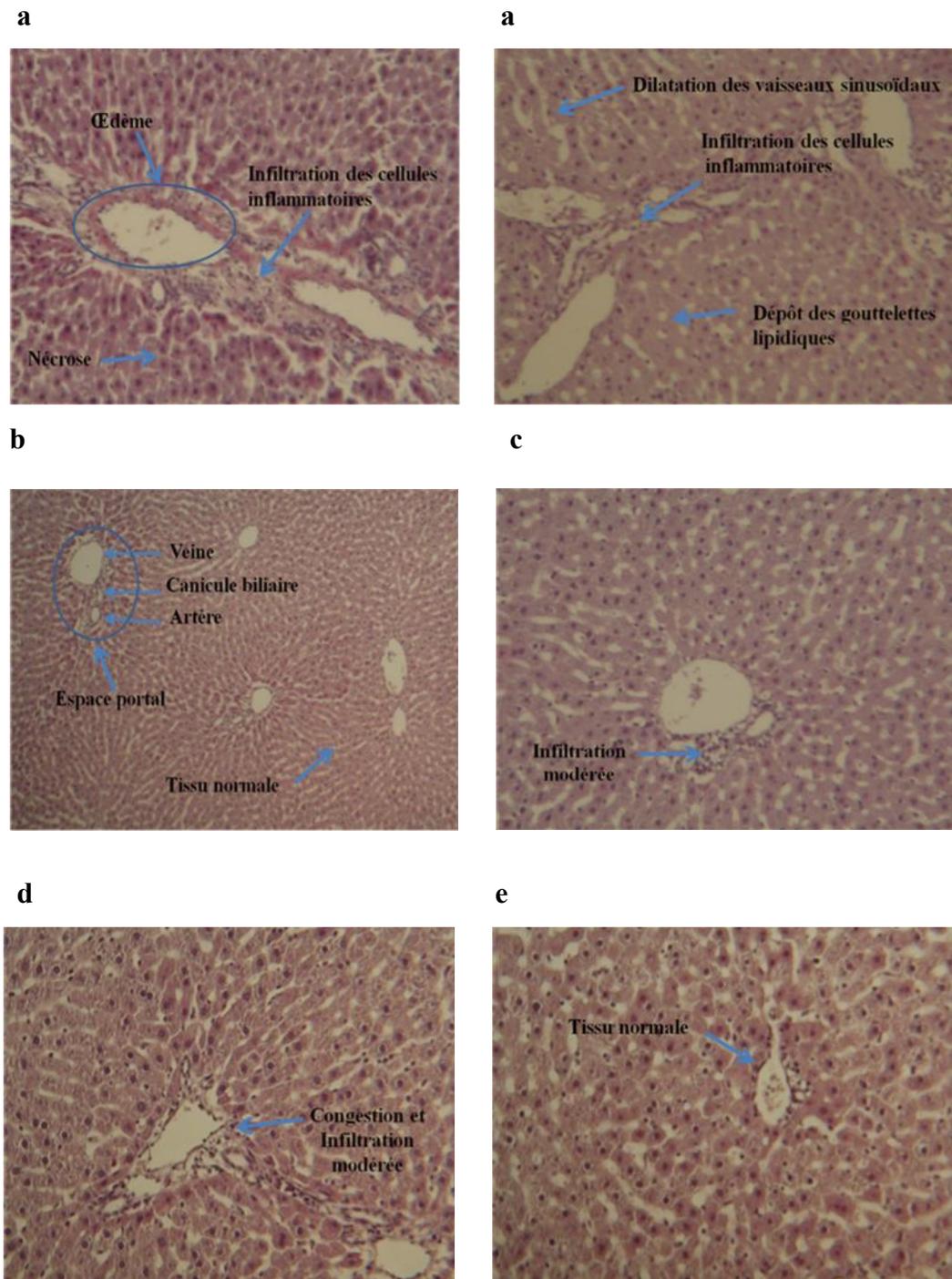
Le tissu hépatique des rats du groupe témoin présente un aspect normal, composé de plusieurs lobules. Chaque lobule est composé des hépatocytes séparés par des capillaires sinusoïdaux convergeant vers une veine centro-lobulaire. L'espace porte d'un foie normale est composé de trois lumières : veine, artère, et canalicule biliaire.

L'observation histopathologique du groupe traité par l'éthanol, pendant une période de 6 semaines, a montré une hépatotoxicité sévère traduite par l'apparition de la nécrose centro-lobulaire, la dégénérescence hépatocellulaires avec l'altération du parenchyme hépatique, la congestion dans les sinusoides, l'infiltration des cellules inflammatoires principalement autour de la veine centrale (Figure 25a et Tableau 14).

L'observation des coupes histologiques des rats soumis au traitement avec l'huile totale, la fraction neutre et le contrôle positif NAC ont révélé une amélioration significative de l'inflammation portale, des altérations du parenchyme et de la nécrose avec une diminution de l'infiltration des cellules inflammatoires et de la congestion (Figures 25b-25d). Il est important de noter que le groupe de rats traités par la fraction neutre montre un aspect comparable à celui du témoin, ce qui signale le meilleur effet protecteur du tissu hépatique (Figure 25e).

**Tableau 14.** Effets des extraits de *Nigella sativa* sur les changements histologiques du foie, n=8.

<b>Groupes</b>	<b>Tissu hépatique</b>
Contrôle	Tissu normale.
Ethanol	Congestion sévère dans la veine centrale et sinusoides, stéatose, infiltration des cellules inflammatoires, nécrose sévère.
EtOH + NAC	Congestion et nécrose légère.
EtOH+ TO (400 mg/ml)	Congestion et nécrose légère.
EtOH + NLF (300 mg/ml)	Tissu normale.



**Figure 25.** Effet des fractions des graines de *Nigella sativa* sur les tissus hépatiques des rats traités avec de l'éthanol. a : tissu hépatique de rat traité avec de l'alcool, b : tissu Hépatique de rats normal, c : tissu hépatique de rat traité avec NAC, d : tissu hépatique de rat traité avec l'huile totale, e : tissu hépatique de rat traité avec la fraction neutre.

### 4.2.3. Effet des extraits sur les marqueurs du stress oxydatif

Les marqueurs du stress oxydatif utilisés dans ce travail sont le glutathion réduit (GSH) le malondialdéhyde (MDA), la catalase (CATA) et la superoxyde dismutase (SOD). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 15, figure 26 (résultats au niveau tissulaire) et le tableau 16, figure 27 (résultats au niveau plasmatique) ci-dessous.

L'hépatotoxicité induite par l'éthanol pendant six semaines est caractérisée par une augmentation significative dans le taux de MDA et une diminution du taux de GSH. Par ailleurs, une diminution de l'activité des enzymes antioxydant (SOD et CATA) a été observée chez le groupe de rats traité par l'éthanol par rapport au groupe contrôle.

Après quatre semaines du traitement avec l'huile totale, la fraction neutre et le contrôle positif, les résultats ont montré une diminution statistiquement significative ( $p \leq 0.001$ ) du taux de MDA au niveau tissulaire et plasmatique. De même une augmentation significative ( $p \leq 0.01$ ) du taux de GSH réduit dans les mêmes groupes a été signalée par rapport au groupe traité avec l'éthanol.

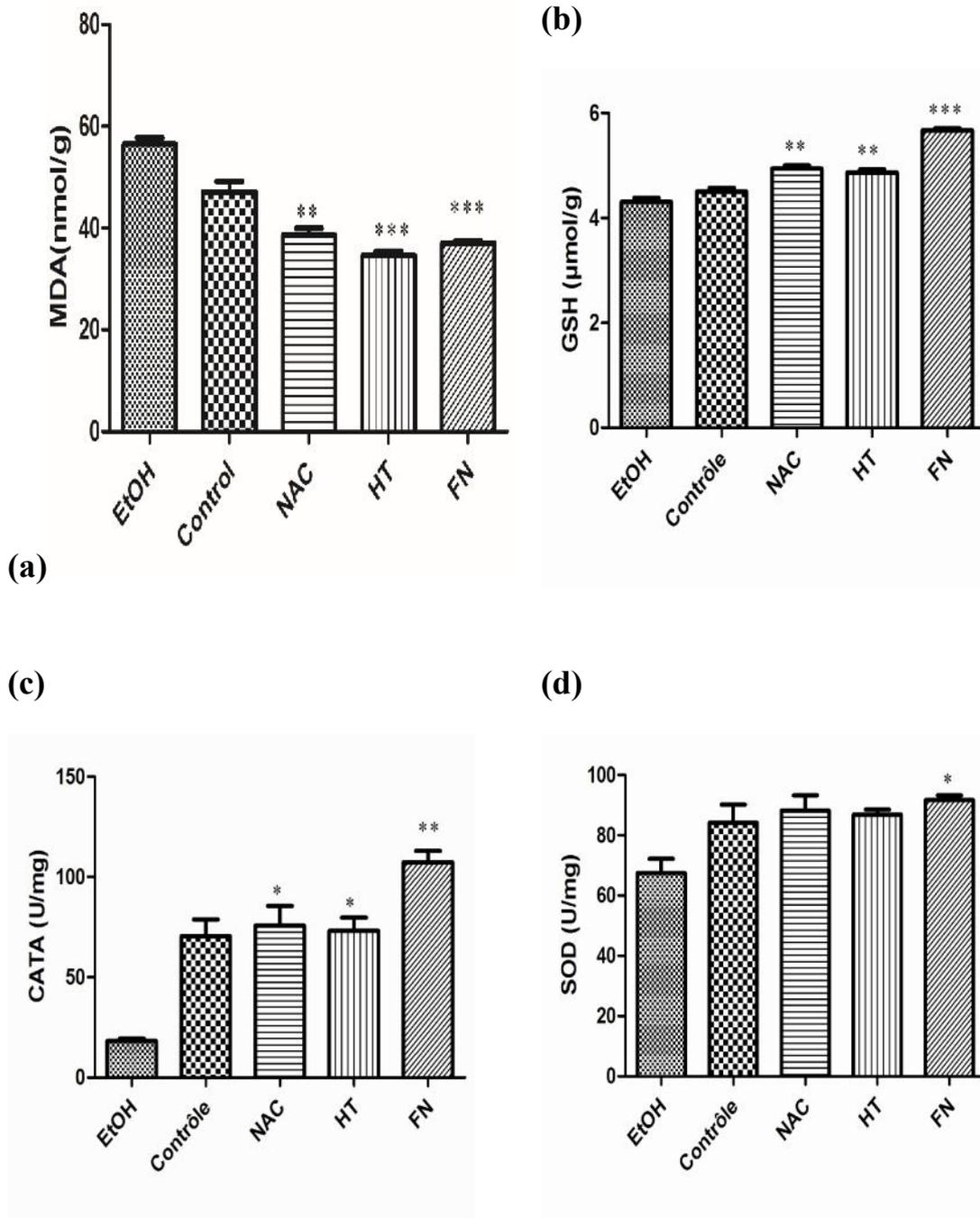
Pour les enzymes antioxydants, au niveau tissulaire et plasmatique, nous avons observé une augmentation significative ( $p \leq 0.01$ ) de l'activité de la CATA chez les rats traités avec l'huile totale et la fraction neutre. Pour l'enzyme SOD, seulement le groupe de rats traités par la fraction neutre a montré une augmentation significative par rapport au groupe de rats traités avec l'éthanol.

**Tableau 15.** Effet des fractions de *Nigella sativa* sur certains marqueurs du stress oxydatif tissulaire chez les rats atteints de l'hépatotoxicité. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM, (N = 8); \*  $p < 0.05$  différence significative contre le groupe contrôle traité par l'éthanol.

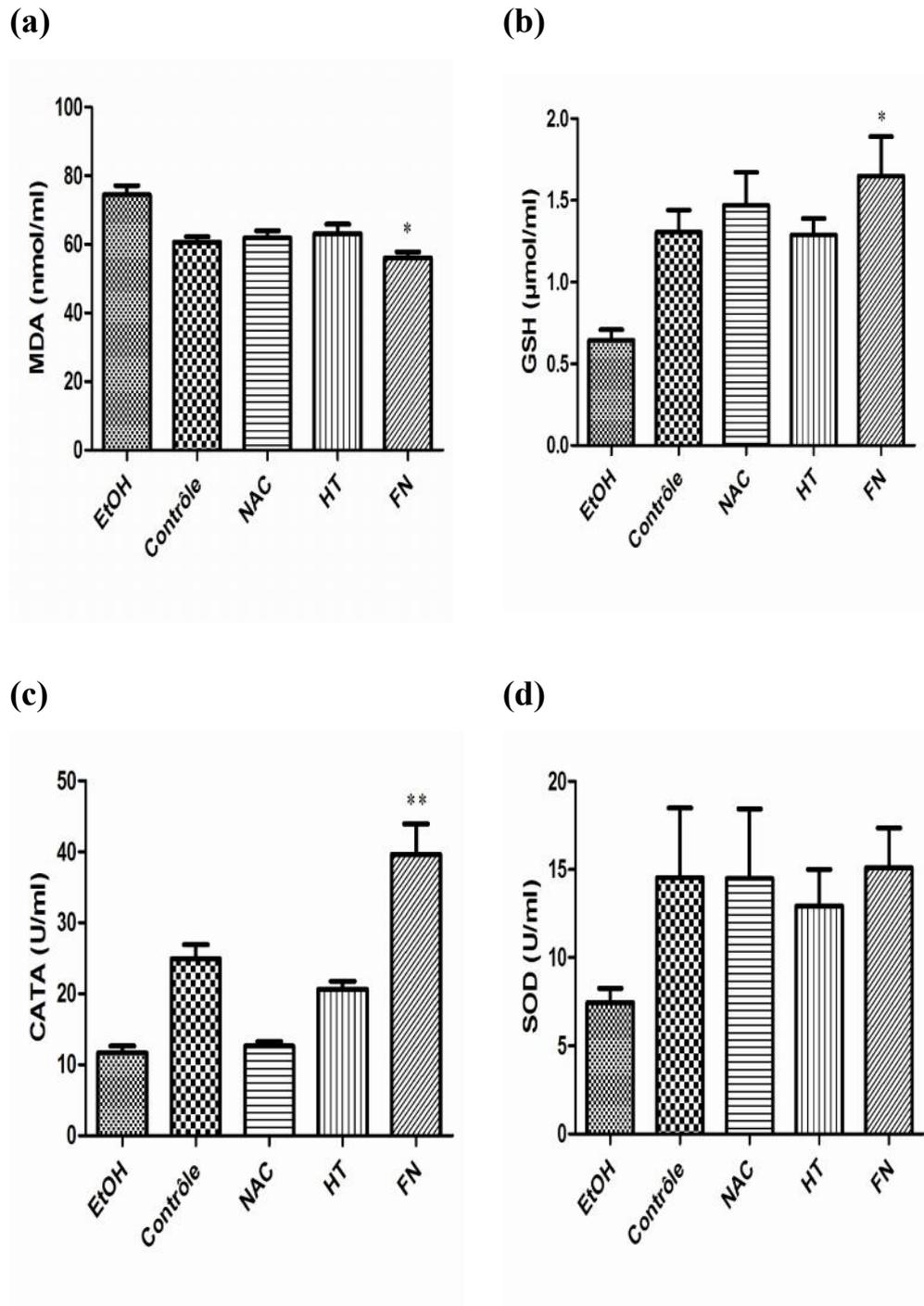
Groupes	Paramètres			
	GSH ( $\mu\text{mol/g}$ )	MDA (nmol/g)	CATA (U/mg)	SOD (U/mg)
Ethanol	4,24 $\pm$ 0,135	55,28 $\pm$ 2,49	17,01 $\pm$ 2,43	72,12 $\pm$ 10,67
Contrôle	4,43 $\pm$ 0,140	44,97 $\pm$ 4,23	61,94 $\pm$ 16,87	78,23 $\pm$ 11,60
NAC	4,89 $\pm$ 0,111**	37,32 $\pm$ 2,66**	65,74 $\pm$ 19,88*	83,00 $\pm$ 10,17
HT	4,82 $\pm$ 0,091**	33,77 $\pm$ 1,67***	66,67 $\pm$ 12,97*	85,25 $\pm$ 3,17
FN	5,63 $\pm$ 0,080***	36,74 $\pm$ 0,76***	101,64 $\pm$ 11,32**	90,07 $\pm$ 3,17*

**Tableau 16.** Effet des fractions de *Nigella sativa* sur certains marqueurs du stress oxydatif plasmatique chez les rats atteints d'hépatotoxicité. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM, (N = 8); \* p<0.05 différence significative contre le groupe contrôle traité par l'éthanol.

Groupes	Paramètres			
	GSH ( $\mu\text{mol/ml}$ )	MDA (nmol/ml)	CATA (U/ml)	SOD (U/ml)
Ethanol	0,58 $\pm$ 0,13	59,01 $\pm$ 3,18	10,68 $\pm$ 1,91	6,67 $\pm$ 1,58
Contrôle	1,17 $\pm$ 0,27	71,73 $\pm$ 5,38	22,91 $\pm$ 4,00	10,59 $\pm$ 7,90
NAC	1,27 $\pm$ 0,40	59,87 $\pm$ 4,05	12,00 $\pm$ 1,23	10,54 $\pm$ 7,90
Huile totale	1,19 $\pm$ 0,20	60,33 $\pm$ 5,52	19,54 $\pm$ 2,19	10,85 $\pm$ 4,16
Fraction neutre	1,41 $\pm$ 0,48*	54,34 3,46*	35,43 $\pm$ 8,45**	12,86 $\pm$ 4,49



**Figure 26.** Effet des fractions de *Nigella sativa* sur les marqueurs du stress oxydatif au niveau tissulaire. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM, (N = 8); \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\* :  $p \leq 0.001$  une différence significative contre le groupe de rats traités par l'éthanol.



**Figure 27.** Effet des fractions de *Nigella sativa* sur les marqueurs du stress oxydatif au niveau plasmatique. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM, (N = 8); \*  $p < 0.05$  une différence significative contre le groupe d'animaux traités par l'éthanol.

Nos résultats indiquent que les groupes de rats alimentés quotidiennement pendant six semaines par l'éthanol avec le régime (Lieber-DeCarli liquid diet) montrent une augmentation significative ( $p \leq 0,05$ ) de l'activité des enzymes hépatiques ALAT, ASAT, et PAL par rapport au groupe contrôle. Par ailleurs, l'activité des enzymes antioxydants SOD et CATA a diminué ainsi que le taux du glutathion réduit GSH. Cependant, la peroxydation des lipides a augmenté de façon significative. En plus, nous avons observé des altérations histologiques au niveau du tissu hépatique. Ces résultats concordent bien avec les résultats rapportés sur les mêmes modèles de la toxicité hépatique (Fang et al., 2007; Adeline et al., 2013).

L'alcoolisation expérimentale provoque un stress oxydatif qui se reflète par une augmentation de la peroxydation lipidique au niveau hépatique. Les produits de la peroxydation sont des aldéhydes tels que le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxy-2-nonénal (HNE) qui sont impliqués dans la plupart des effets physiopathologiques associés au stress oxydatif (Uchida, 2000). Ces aldéhydes sont stables, diffusent à l'intérieur et hors de la cellule et peuvent réagir avec des cibles éloignées de leur site de formation. La plupart de ces aldéhydes présentent une forte réactivité *vis-à-vis* de biomolécules telles que les protéines, l'ADN et les phospholipides. Lors de l'alcoolisation, l'acétaldéhyde généré durant le métabolisme de l'éthanol réagit également avec les protéines pour former malondialdéhyde.

Un deuxième paramètre qui révèle le stress oxydant est le GSH. La quantité de GSH mitochondrial totale hépatique joue un rôle vital dans le système antioxydant. Les mitochondries, n'ayant pas la capacité de synthétiser le GSH, l'importent du cytosol grâce à des transporteurs spécifiques. Une diminution du GSH mitochondrial déclenche une accumulation de radicaux libres, cette déplétion mitochondriale étant létale alors que celle du cytosol n'affecte pas la viabilité cellulaire (Sagara et al., 1998). L'intoxication alcoolique entraîne une diminution du GSH mitochondrial par une inhibition de son transporteur membranaire (Fernandez Checa et al., 1997; Garcia-Ruy et al., 1994). La diminution de GSH mitochondrial a un impact significatif sur la fonction des mitochondries et la survie des cellules (Verzola et al., 2004).

D'autre part, ce régime alimentaire avec l'éthanol entraîne une diminution de l'activité des enzymes antioxydants de l'organisme ; incluant la SOD et la CATA. Ces enzymes ont pour mission de minimiser le stress oxydatif, protégeant ainsi les membranes cellulaires, les protéines essentielles et l'ADN. Le rôle de SOD est de catalyser la

dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Ce dernier est transformé en H<sub>2</sub>O et O<sub>2</sub> par la CATA.

De faibles niveaux de SOD sont également observés dans un très grand nombre de pathologies dégénératives incluant le diabète, le cancer, la sclérose en plaque, les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Giustarini et al., 2009; Peña-Silva et al., 2009; Chaitanya et al., 2010).

Le traitement avec l'huile totale et la fraction neutre de *Nigella sativa* quotidiennement pendant quatre semaines avec des doses de 400 mg/kg et 300 mg/kg respectivement a montré des changements remarquables dans le statut redox, soit au niveau plasmatique ou tissulaire. Ces changements se manifestent par une augmentation de l'activité des enzymes antioxydants ; SOD et CAT, la diminution du taux de MDA et l'augmentation du taux de GSH. Ainsi, les huiles de graines de *Nigella sativa* a pu maintenir les systèmes de défense cellulaire antioxydants (GSH, CATA et SOD) à leur niveau cellulaire physiologique pour empêcher la perte de l'équilibre redox prooxydants / antioxydants. Nos résultats concordent bien avec ceux publiés, il y'a quelques années, sur des rats ayant une toxicité hépatique traités par les huiles de *Nigella sativa* où il y'a eu une augmentation du niveau de GSH, une diminution des taux de MDA et une amélioration de l'activité enzymatique de la SOD (Kim et al., 2007; Seval et al., 2014; Hamed et al., 2014).

En outre, le niveau sérique des enzymes hépatiques ASAT, ALAT et PAL augmente significativement chez le groupe de rats traités par l'éthanol entraînant un dysfonctionnement cellulaire et une perte de l'intégrité fonctionnelle de la membrane cellulaire des hépatocytes (Thangathirupathi et al., 2013). Après l'application du traitement avec l'huile totale et la fraction neutre de *Nigella sativa*, nous avons observé une diminution significative du niveau des enzymes ASAT, ALAT et PAL jusqu'à l'obtention de leurs valeurs physiologiques. Ces résultats concordent bien avec ceux qui ont été publiés récemment (Gani et John, 2013; Hamed et al., 2014).

Par la suite, nous avons évalué les changements histologiques des tissus hépatiques après l'application du traitement avec l'huile totale et la fraction neutre chez les rats traités par l'alcool. Le tissu hépatique des rats du groupe témoin présente un aspect normal et celui des rats traités par l'éthanol montrent une hépatotoxicité sévère. Pour les groupes traités par l'huile totale et la fraction neutre de *Nigella sativa*, les résultats ont montré une amélioration significative dans la structure du tissu hépatique. De nombreuses études ont souligné l'effet protecteur des extraits des graines de *Nigella sativa* à partir de dommages

histologiques induites par l'éthanol et le stress oxydant (Al-Ghamdi, 2001 ; Hamed et al., 2014).

L'effet protecteur des fractions de *Nigella sativa* peut être attribué à l'inhibition de la peroxydation des lipides qui conduisent à la stabilisation de membranes plasmiques (Darwish et al., 2012; Gani et al., 2013). Cette activité peut être expliquée par les niveaux des insaponifiables ainsi que les lipides polaires dans les huiles de *Nigella sativa* et aussi par les antioxydants endogènes (Ramadan et al., 2002a).

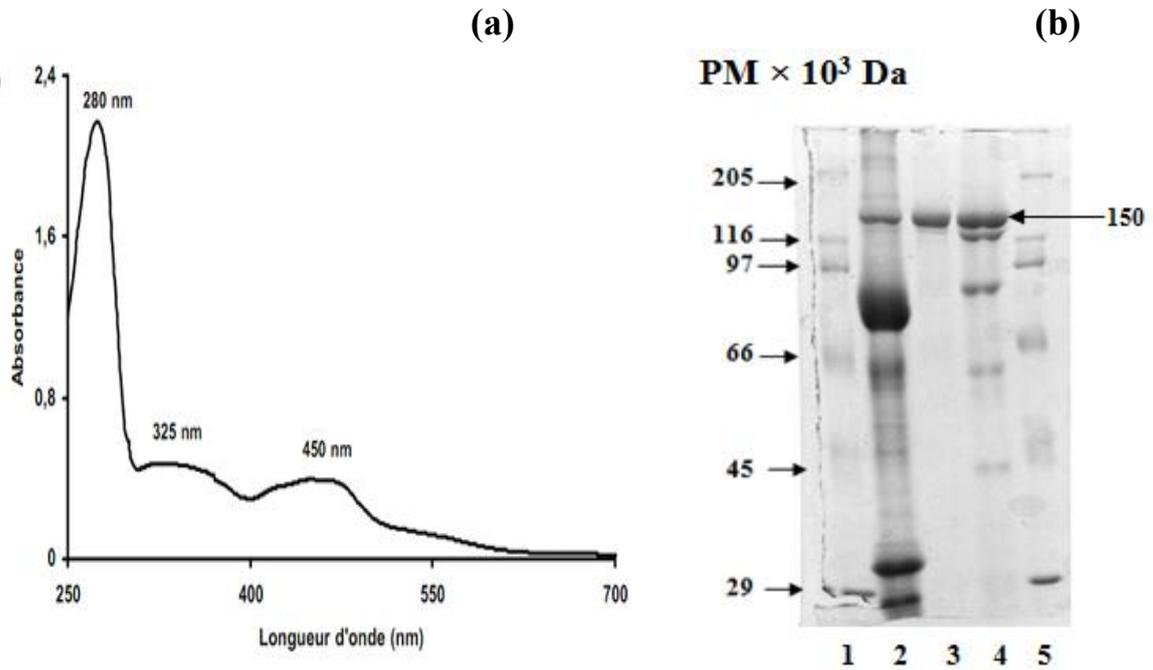
Le travail expérimental, *in vivo*, montre que la fraction neutre présente la meilleure activité antioxydante en comparaison avec l'huile totale. Cela pourrait être expliqué par ; *(i)* la présence des lipides bioactifs 'les insaponifiables' dans cette fraction et *(ii)* l'absence de la fraction polaire qui présente certaine toxicité. L'analyse des coupes histologiques des tissus hépatiques a montré en revanche que l'huile totale et sa fraction polaire induisent des lésions légères avec ou sans état inflammatoire (Sobhi et al., 2011). Cependant, le dosage des paramètres enzymatiques et non enzymatiques hépatiques n'ont montré aucun signe de lésion hépatique.

#### **4.2.4. Effet des extraits taux de la XOR et les anticorps anti-XOR**

##### **4.2.4.1. Purification de la XOR et les anticorps anti-XOR**

Le rendement de la purification de la XOR obtenu à partir du lait humain est de 5.7 mg/litre. Ce rendement est comparable à ceux rapportés par d'autres auteurs soit pour l'enzyme humaine (Benboubetra et al., 1997; Godber, 1998 ) ou pour l'enzyme bovine (Hunt et Massey, 1992). Le contrôle de la pureté de cette enzyme est estimé par le spectre d'absorption caractéristique de la XOR qui se caractérise par trois pics majeurs à 280, 325 et à 450 nm (Figure 28 a). La pureté de l'enzyme est confirmée par une électrophorèse (SDS-PAGE 10%). Le chemin électrophorétique présente une bande majeure de poids moléculaire d'approximativement 150 KDa (Figure 28 b). Ces résultats sont compatibles aux résultats rapportés par d'autre travaux (Sanders et al., 1997; Benboubetra et al., 1997).

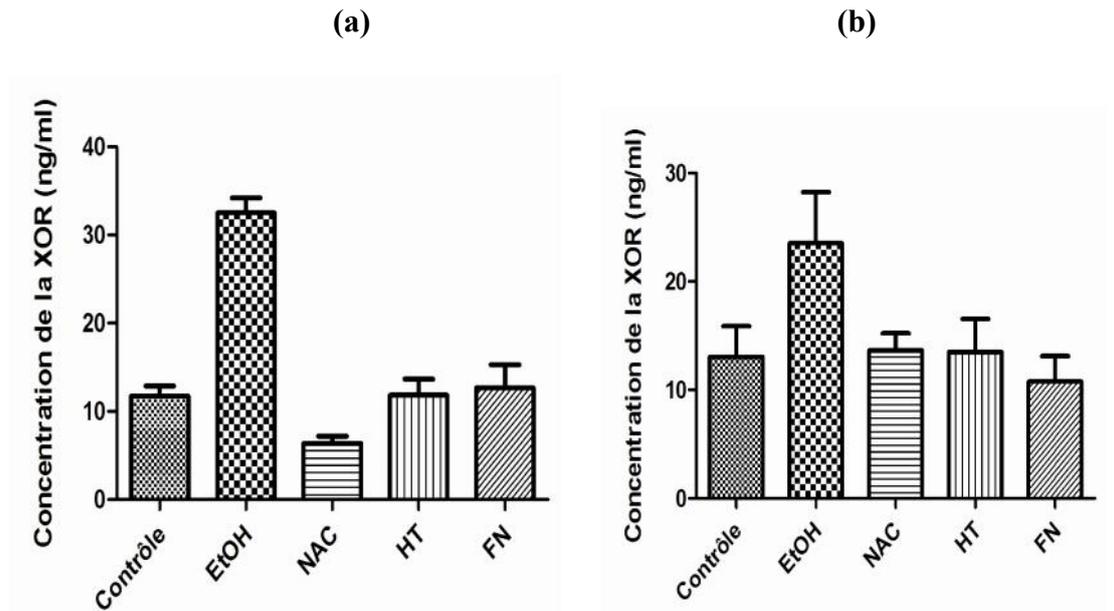
La purification des anticorps anti-XOR présents dans le sérum est effectuée par une précipitation au sulfate de sodium suivi d'une chromatographie d'immunoaffinité sur gel de protéine A. La fraction des IgG obtenue a une concentration de 2.1 mg/ml.



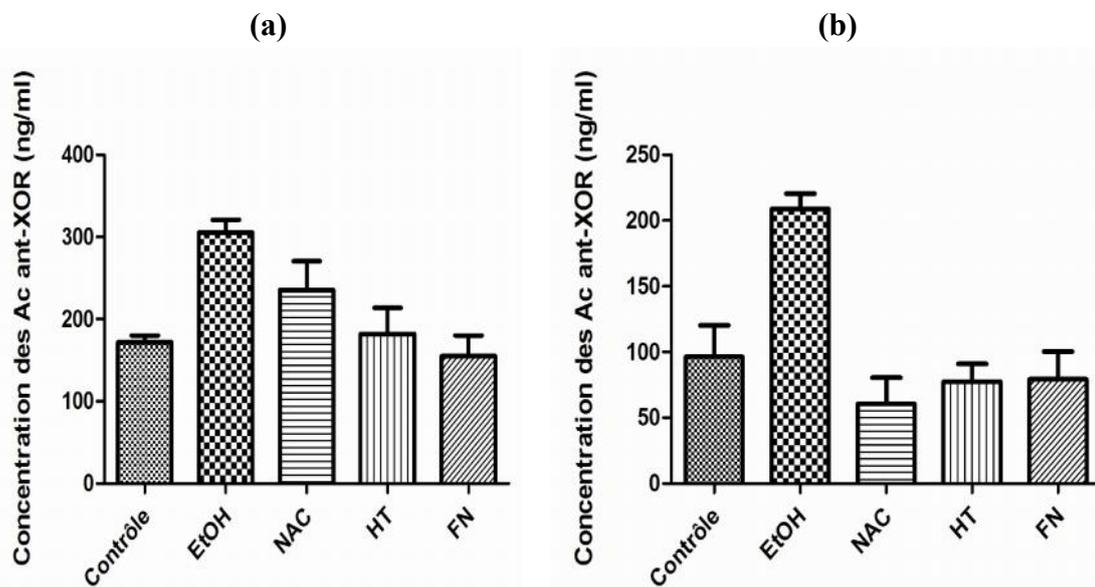
**Figure 28.** Caractérisation de la XOR purifiée à partir du lait humain. (a) Spectre d'absorption en UV-Vis (250 – 700) de la XOR purifiées par chromatographie d'affinité sur héparine-agarose. (b) SDS-PAGE (10%) de la XOR purifiée par chromatographie d'affinité sur le Gel d'héparine: 2- fractions brute de la XOR, 3- XOR après la chromatographie, 4- XOR avant la chromatographie, 1et 5- protéines standards de poids moléculaires (Myosinne: 205 KDa, B- galactosidase: 116 KDa, phosphorylase: 97 KDa, BSA: 66 KDa, albumine d'œuf: 45 KDa et anydrase carbonique: 29 KDa).

#### 4.2.4.2. Dosage l'enzyme XOR et les anticorps anti-XOR

Les concentrations de la XOR et les anticorps anti-XOR contenues dans le sérum et l'homogénat des rats étudiés sont déterminées en se basant sur des courbes standards des absorbances contre des concentrations connues dont les équations sont :  $y = 0,049x + 0,089$  pour la XOR et  $y = 0,063x + 0,247$  pour les anticorps anti-XOR. Les résultats du dosage de la XOR et les anticorps anti-XOR sont représentés dans les figures 29 et 30 respectivement et le tableau 17.



**Figure 29.** Taux de la XOR (a) dans l'homogénat du foie, (b) dans le sérum de rats traités par l'EtOH, par NAC, par HT et par FN. Le lot de rats non traités est utilisé comme contrôle, \*\* :  $p \leq 0.01$ , \*\*\* :  $p \leq 0.001$ .



**Figure 30.** Taux des anticorps anti-XOR (a) dans l'homogénat du foie, (b) dans le sérum de rats traités par l'EtOH, par NAC, par HT et par FN. Le lot de rats non traités est utilisé comme contrôle. \*\* :  $p \leq 0.01$ .

**Tableau 17.** Taux de la XOR et les Ac anti-XOR plasmatique et tissulaire chez les groupes expérimentaux.

Concentrations	Homogénat (ng/mg)		Sérum (ng/ml)	
	XOR	Ac anti-XOR	XOR	Ac anti-XOR
Contrôle	10,65± 2,22	180,00± 16,46	10,23 ±5,64	120,27±47,90
EtOH	30,81± 3,42	320,77± 30,21	18,81± 9,42	220,5± 23,30
NAC	5,6± 1,60	200,27± 70,33	10,09 ±3,11	80,55±40,01
HT	10,03± 3,64	150,22 ±63,68	10,43± 6,11	90,88± 26,99
FN	10,08± 5,24	130,44± 49,68	8,4± 4,72	100,22 ±41,78

Les résultats du dosage montrent que les concentrations des anticorps anti-XOR et celle de la XOR dans l'homogénat du foie sont plus élevée que dans le sérum. Ceci peut être expliqué par la distribution naturellement élevée de cette enzyme dans le foie (Harrison, 2002). L'ARNm de la XOR est détecté dans la plupart des tissus, et les niveaux de transcription les plus élevés se trouvent dans le foie et l'intestin (Kurosaki *et al.*, 1995). Sur la base de ses niveaux d'ARNm et l'expression des protéines, la plus haute activité de la XOR est détectée dans le foie (Stirpe *et al.*, 2002).

De même les résultats du dosage montrent une augmentation significative (\*\*\*) :  $p \leq 0.001$ ) de la concentration des anticorps anti-XOR et de la XOR chez les rats traités par l'éthanol par rapport à celles du contrôle. Après l'application du traitement avec l'huile totale et la fraction neutre des graines de *Nigella sativa*, les concentrations des anticorps anti-XOR et de la XOR ont diminué d'une manière significative.

Le foie est la principale source de la XOR sérique en raison de la forte teneur en XOR, et cet organe peut être la source d'une forte élévation du taux de la XOR sérique après une lésion tissulaire large, ce qui induit une libération de l'enzyme dans la circulation sanguine à partir de cellules endommagées, ces résultats indiquent que l'éthanol serait un facteur important de surproduction de la XOR cytosolique (Sergent *et al.*, 2001).

Une fois libéré dans le plasma, la XOR est rapidement converti en la forme oxydase XO génératrice potentielle des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Martín *et al.*, 2004). La XOR circulante peut atteindre les organes distants et elle à la capacité s'adhérer aux cellules vasculaires. Nos résultats suggèrent que la quantité des ERO produits en circulation par la XOR, libérés par les cellules hépatiques endommagées par l'éthanol, pourrait produire une lésion tissulaire généralisée (Yokoyama *et al.*, 1990). De même

l'augmentation de la concentration des anticorps anti-XOR peut être due à une stimulation du système immunitaire par la XOR à cause de l'exposition importante à l'éthanol. Il a été suggéré que les anticorps anti-XOR peuvent être générés par l'exposition de la XOR intrinsèque au système immunitaire (Bruder et *al.*, 1984). Cette enzyme peut être libérée au cours des lésions tissulaires de l'endothélium capillaire qui est riche en XOR (stimulation endogène).

## 7. Discussion générale

L'étude actuelle vise à déterminer l'effet de l'huile totale et la fraction neutre de *Nigella sativa* sur l'hépatotoxicité induite par l'éthanol. Le rôle d'un stress oxydant dans l'hépatotoxicité alcoolique a donné lieu à de nombreuses controverses ; plusieurs études ont dévoilé le rôle du stress oxydant dans les alcoolopathies dont la plupart montrent une association entre les marqueurs biologiques du stress oxydant et les atteintes hépatiques secondaires à l'alcoolisation (Aleynik et al., 1998; Yang et al., 2012). Il est donc probable que le stress oxydant représente un facteur pathogénique essentiel dans les alcoolopathies. Il s'accompagne d'une augmentation de la peroxydation lipidique, de l'oxydation des protéines et la production des radicaux libres. Ces altérations oxydatives agissent en synergie et déterminent une cytotoxicité (Lieber et DeCarli, 1989; Yang et al., 2012).

Nous avons procédé à l'évaluation de l'effet hépatoprotecteur des extraits de *Nigella sativa*, *in vitro*, à travers les différents mécanismes responsables de la production des radicaux libres et qui se produisent, *in vivo*, lors d'une hépatopathie alcoolique. Parmi ces radicaux libres l'anion superoxyde, le radical hydroxyle et le peroxyde d'hydrogène. Les résultats des études expérimentales, *in vitro*, montrent que les extraits de *Nigella sativa* ont une capacité considérable de réagir avec les radicaux libres pour les convertir en espèces non réactives et interrompre ainsi la chaîne de réactions radicalaires, et par conséquent, ils exercent un effet positif sur la peroxydation lipidique.

Dans une étape suivante, nous avons entamé le travail, *in vivo*, sur des rats Albino Wister en utilisant un régime alimentaire spécifique. Le modèle le plus utilisé pour provoquer des lésions tissulaires typiques du foie est l'alimentation avec le régime Lieber-DeCarli liquide contenant de l'éthanol pendant une période de 4 à 6 semaines. Ce protocole d'alimentation chronique d'éthanol induit des lésions hépatiques et d'inflammation. En outre, ce régime d'éthanol conduit à des niveaux élevés d'alcool dans le sang. Ce modèle simple sera très utile pour l'étude de la maladie alcoolique du foie et d'autres organes endommagés par la consommation d'alcool (Lieber et DeCarli, 1982; Lieber et al., 1989).

L'exposition à l'éthanol peut entraîner la peroxydation des acides gras polyinsaturés et la dégradation des phospholipides en causant des dommages cellulaires. Le suivi des altérations est effectué à travers les marqueurs du stress oxydant au niveau plasmatique et tissulaire, le bilan biochimique et l'étude histopathologique de tissu hépatique. Les résultats

obtenus supportent l'hypothèse que le stress oxydatif et les radicaux libres jouent un rôle important dans l'hépatotoxicité alcoolique (Shirpoor et *al.*, 2009; Hamed et *al.*, 2014).

Les espèces réactives de l'oxygène sont susceptibles d'épuiser l'activité des systèmes enzymatiques antioxydants de la cellule (SOD, CATA...etc), aboutissant finalement à un déséquilibre du système redox cellulaire au profit des prooxydants. Cet état de stress oxydatif favorise les réactions en cascade des radicaux libres avec les molécules biologiques. L'oxydation des acides gras insaturés des phospholipides membranaires est susceptible de déformer la structure des membranes et provoquer en conséquence sa perméabilité et la mort cellulaire (Lopez-Lazaro, 2006 ; Servais, 2003 ; Dhanabal et *al.*, 2006).

Le traitement avec les huiles de *Nigella sativa* montre un effet hépatoprotecteur qui se manifeste par une augmentation de l'activité des systèmes de défense antioxydants GSH, MDA, SOD et CATA dans le plasma et le foie, maintient les taux de l'ASAT, ALAT et la PAL à un niveau physiologique. Le traitement avec ces extraits de *Nigella sativa* a, également, amélioré l'histologie du tissu hépatique (Gani et *al.*, 2013; Seval et *al.*, 2014). Ces résultats sont cohérents avec ceux publiés antérieurement surtout par notre équipe de recherche en 2011. les travaux ont été effectués *in vivo* sur les rats et *in vitro* avec le modèle de PCLS de couches tissulaires (Sobhi et *al.*, 2011).

L'étape finale consiste à évaluer un autre mécanisme par lequel ces fractions (huile totale et fraction neutre) exercent leur effet hépatoprotecteur ; en estimant le taux de l'enzyme génératrice de radicaux libres, la XOR, et les anticorps produits contre cette enzyme dans le sérum et l'homogénat du foie des rats en utilisant la technique ELISA. Les résultats indiquent que les deux extraits ont un potentiel important comme agents protecteurs du foie contre hépatotoxicité, induite par l'alcool, en diminuant d'une manière significative le taux de la XOR et les anticorps anti- XOR au niveau plasmatique et tissulaire.

L'élévation des taux de la XOR est due à la richesse du foie en cette enzyme. Des travaux effectués sur des sujets humains ont montrés une nette augmentation sérique du taux de cette enzymes dans plusieurs pathologies humaines, en particulier dans celles mettant en jeu les lésions hépatiques (Battelli et *al.*, 2001; Martin et *al.*, 2004).

L'augmentation significative des taux de la XOR chez les sujets ayants des lésions hépatiques permet de proposer cette enzyme comme un paramètre biologique complémentaire

pour le dépistage des lésions hépatiques alcooliques. Ces résultats concordent bien avec les résultats préliminaires réalisés par l'équipe du Professeur Harrison à l'université de Bath en Angleterre qui a montré que la XOR sérique est un meilleur paramètre pour le suivi de la fonction hépatique. D'autres travaux sur des sujets humains atteints de maladies hépatiques chroniques (alcoolique et non alcoolique) ont montré une augmentation significative de cette enzyme (Battelli et *al.*, 2001; Zhang et *al.*, 2014).

À notre connaissance, cette étude est la première investigation sur l'effet hépatoprotecteur de la fraction des lipides neutres de *Nigella sativa* contre l'hépatotoxicité induite par l'éthanol sur un modèle expérimental de rat. Les résultats soulignent que la fraction neutre a un potentiel important comme un agent de protection hépatique contre ce genre d'hépatotoxicité. De plus et à travers les résultats obtenus, on peut suggérer l'utilisation de l'enzyme xanthine oxydoréductase comme un nouveau marqueur complémentaire de lésions hépatique.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de l'étude développée dans la présente thèse est de déterminer l'effet hépatoprotecteur des huiles de graines de *Nigella sativa* contre la toxicité induite par l'éthanol. L'étude est mise en œuvre par des tests *in vivo* et d'autres *in vitro*.

Dans une première étape, nous avons procédé à l'extraction de l'huile totale à partir des graines de *Nigella sativa*, puis à son fractionnement sur une colonne de chromatographie. Ensuite, l'étude de l'activité antioxydante *in vitro* de ces deux fractions a été entreprise en ciblant différents mécanismes ; **(i)** la capacité de piéger les radicaux libres, **(ii)** la capacité à réduire  $Fe^{+3}$  en  $Fe^{+2}$ , **(iii)** l'aptitude à inhiber la peroxydation lipidique et **(iv)** la capacité de préserver les cellules sanguines hémolysées dans des conditions accélérées. Les résultats montrent un effet antioxydant intéressant et l'huile totale possède la meilleure capacité antioxydante *in vitro*.

L'étude *in vivo* est effectuée en induisant l'hépatotoxicité alcoolique, suivie par l'application du traitement avec les deux fractions de *Nigella sativa*. Les résultats montrent une amélioration considérable de l'activité des enzymes hépatiques (ASAT, ALAT et PAL) et le statut des enzymes et molécules antioxydants (SOD, CATA, GSH, MDA) au niveau plasmatiques et tissulaires. Une amélioration du tissu hépatique a été, également, observée. L'étape finale avait pour but l'étude du taux de l'enzyme Xanthine Oxidoreductase (XOR) et les anticorps anti-XOR plasmatique et tissulaire. La diminution du taux de la XOR et des anticorps anti-XOR dans les tissus hépatiques endommagés ou dans le sang semble un autre mécanisme de l'activité anti-oxydante exercé par l'huile totale et la fraction neutre de *Nigella sativa*.

À notre connaissance, cette étude est la première qui s'intéresse à l'effet hépatoprotecteur de la fraction neutre de l'huile totale des graines de *Nigella sativa* via l'estimation des taux de la XOR et des anticorps anti-XOR. Il est important de signaler que l'étude de la toxicité réalisée *in vivo* dans les conditions expérimentales, en termes de quantités administrées et de durée du test, utilisés dans ce travail montre que les deux fractions utilisées sont dépourvues de toxicité hépatique. Au vu des effets obtenus chez l'animal, les perspectives médicinales de l'huile de Nigelle sont donc très prometteuses mais les essais cliniques manquent. Cette étude pourrait être complétée par d'autres essais afin de développer des approches appropriées dans le but d'une éventuelle application chez l'homme.

## **Références bibliographiques**

- Abdel-Aal E and Attia R (1993). Characterization of Black cumin (*Nigella sativa*) seeds. *Alexandria Science Exchange Journal*. **14**, 497-482.
- Aebi H (1984). Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*. **105**, 121-126.
- Ahmad S and Beg ZH (2014). Mitigating role of thymoquinone rich fractions from *Nigella sativa* oil and its constituents, thymoquinone and limonene on lipidemic oxidative injury in rats. *Springer Plus*. **3**, 316.
- Akash MSH, Rehman K, Rasool F, Sethi A, Abrar MA, Irshad A, Murtaza G and Sherazi TA (2011). Alternate therapy of Type 2 diabetes mellitus (T2DM) with *Nigella* (Ranunculaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*. **5**, 6885-6889.
- Albertini MC, Chibelli L, Ricciotti R, Fumelli C, Canestrari F, Galli F, Rovidati S, Bonannoand E and Fumelli P (1996). Morphological alterations and increased resistance to hemolysis in t-butyl hydroperoxide incubated rbc from elderly subjects. *Archives of Gerontology and Geriatrics*. **22**, 423-428.
- Aleynik SI, Leo MA, Aleynik MK and Lieber CS (1998). Increased circulating products of lipid Peroxidation in patients with alcoholic liver disease. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. **22**, 192-196.
- Al-Gaby A (1998). Amino acid composition and biological effects of supplementing broad bean and corn proteins with *Nigella sativa* cake protein. *Die Nahrung*. **42**, 290-294.
- Al-Ghamdi MS (2001). The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of *Nigella sativa*. *Journal of Ethnopharmacology*. **76**, 45-48.
- Al-saleh I, Billedo G and El-Doush I (2006). Levels of selenium, DL- $\alpha$ - tocopherol, DL- $\gamma$ -tocopherol, all-trans-retinol, thymoquinone and thymol in different brands of *Nigella sativa* seeds. *Journal of Food Composition and Analysis*. **19**, 167-175.
- Arbos KA, Claro LM, Borges L, Santos CAM and Weffort-Santos AM (2008). Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. *Nutrition Research*. **28**, 457-463.
- Atkin JD, Farg MA, Turner BJ, Tomas D, Lysaght JA, Nunan J, Rembach A, Nagley P, Beart PM, Cheema SS and Horne MK (2006). Induction of the unfolded protein response in familial amyotrophic lateral sclerosis and association of protein-disulfide isomerase with superoxide dismutase. *The journal of Biological Chemistry*. **281**, 30152-30165.
- Atta MB (2003). Some characteristics of nigella (*Nigella sativa* L.) seed cultivated in Egypt and its lipid profile. *Food Chemistry*. **83**, 63-68.

- Atta-ur-rahman M, Cun-heng H and Clardy J (1985a). Isolation and structure determination of nigellicine, a novel alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Tetrahedron letters*. **23**, 2759-2762.
- Atta-ur-rahman M, Ahmed S, Choudhary M and Habib-ur-rahman I (1985b). Nigellimine-N-oxide a new isoquinoline alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Heterocycles*. **23**, 953-955.
- Atta-ur-rahman M and Zaman K (1992). Nigellimine: a new isoquinoline alkaloid from *Nigella sativa*. *Journal of Natural Products*. **55**, 676-678.
- Atta-ur-rahman M, Hassan S, Coudhary M and Clardy J (1995). Nigellidine: a new indazole alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Tetrahedron letters*. **36**, 1993-1996.
- Avissar N, Whitin JC and Allen PZ (1989). Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. *The Journal of Biological Chemistry*. **2**, 15850-15855.
- Badary OA, Taha RA, Gamal El-Din AM and Abdel-Wahab MH (2003). Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug and Chemical Toxicology*. **26**, 87-98.
- Bahorun T, Gressier B, Trotin F, Brunete C, Dine T, Vasseur J, Gazin JC, Pinkas M, Luycky M and Gazin M (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*. **46**, 1086-1089.
- Bakathir H and Abbas N (2011). Detection of the antibacterial effect of *Nigella sativa* ground seeds with water. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. **8**, 159-164.
- Bamosa AO (2015). A Review on the Hypoglycemic Effect of *Nigella Sativa* and Thymoquinone. *Saudi Journal of Medicine & Medical Sciences*. **3**, 2-7.
- Baraona E and Lieber CS (1979). Effects of ethanol on lipid metabolism. *Journal of Lipid Research*. **20**, 289-315.
- Barros L, Ferreira MJ, Queiros B, Ferreira ICFR and Baptista P (2007). Total phenols, ascorbic acid, b-carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry*. **103**, 413-419.
- Bataller R and Brenner DA (2005). Liver fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*. **115**, 209-218.
- Battelli MG, Musiani S, Valgimigli M, Gramantieri L, Tomassoni F, Bolondi L and Stirpe, F (2001). Serum xanthine oxidase in human liver disease. *The American Journal of Gastroenterology*. **96**, 1194-1199.

- Benboubetra M, Gleeson A, Harris CPD, Khan J, Arrar L, Brennand D, Reid J, Reckless JD, Harrison R (1997). Circulating anti-xanthine oxidoreductase antibodies in healthy human adults. *European Journal of Clinical Investigation*. **27**, 611-619.
- Bentes de Souza AM, Rogers MS, Wang CC, Yuen PM and Ng PS (2003a). Comparison of peritoneal oxidative stress during laparoscopy and laparotomy. *The Journal of the American Association of Gynecologic Laparoscopists*. **10**, 65-74.
- Borg JM, Reeber A (2008). Biochimie métabolique, Ellipses, France, pp: 257-269.
- Boudiaf K, Houcher Z, Sobhi W and Benboubetra M (2010). Evaluation of Antioxidant and Anti-Xanthine Oxidoreductase Activities of *Nigella sativa* L seeds' extracts. *Journal of Applied Biological Sciences*. **4**, 7-16.
- Boueiz A, Damarla M and Hassoun PM (2008). Xanthine oxidoreductase in respiratory and cardiovascular disorders. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*. **294**, 830-840.
- Bray RC (1975). In *The Enzymes*, vol. 12, 3rd edn. Molybdenum iron-sulfur flavin hydroxylases and related enzymes, ed Boyer P. D. (Academic Press, New York), pp 299-419.
- Bruder G, Jarasch ED and Heid HW (1984). High concentrations of antibodies to xanthine oxidase in human and animal sera. Molecular characterization. *Journal of Clinical Investigation*. **74**, 783-794.
- Burits M and Bucar F (2000). Antioxydant activity of *Nigella sativa* L. essential oil. *Phytotherapy Research*. **14**, 323-328.
- Buldak L, Łabuzek K, Bułdak RJ, Kozłowski M, Machnik G, Liber S, Suchy D, Duława-Bułdak A and Okopien B (2014). Metformin affects macrophages' phenotype and improves the activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase and decreases malondialdehyde concentration in a partially AMPK-independent manner in LPS-stimulated human monocytes/ macrophages. *Pharmacological Reports*. **66**, 418-429.
- Cantin PA (1999). Oxidant and antioxidants in lung injury. In: *Lam and Other Diseases Characterized By Smooth Muscle Proliferation*. Moss J (Ed) New York, USA. pp: 519-531.
- Cederbaum AI (2001). Introduction-serial review: alcohol, oxidative stress and cell injury. *Free Radical Biology & Medicine*. **31**, 1524-1526.
- Cederbaum AI (2006). Cytochrome P450 2E1-dependent oxidant stress and upregulation of anti-oxidant defense in liver cells. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. **21**, 22-25.

- Chaitanya KV, Pathan AAK, Mazumdar SS, Chakravarthi GP, Parine N and Bobbarala V (2010). Role of oxidative stress in human health: An overview. *Journal of Pharmacy Research*. **3**, 1330-1333.
- Chakrabarty A, Emerson MR and LeVine SM (2003). Heme oxygenase-1 in SJL mice with experimental allergic encephalomyelitis. *Multiple Sclerosis*. **9**, 372-381.
- Cheikh-rouhou S, Besbes S, Lognay G, Blecher VC, Deroanne C and Atti H (2008). Sterol composition of black cumin (*Nigella sativa*) and Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) seed oils. *Journal of Food Composition and Analysis*. **21**, 162-168.
- Christen S, Bifrare YD, Siegenthaler C, Leib SL and Täuber MG (2001). Marked elevation in cortical urate and xanthine oxidoreductase activity in experimental bacterial meningitis. *Brain Research*. **900**, 244-251.
- Çimen MYB (2008). Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clinica Chimica Acta*. **39**, 1-11.
- Clairborne A (1985). Catalase activity. In: Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. Greenwald, RA. Ed, Boca Raton, Fla: CRC Press.; pp: 283-284.
- Clayton GD and Clayton FE (2001). Patty's industrial hygiene and toxicology. *John Wiley and sons*. **6**, 382-394.
- Cohen JI, Roychowdhury S, McMullen MR, Stavitsky AB and Nagy LE (2010). Complement and alcoholic liver disease: role of C1q in the pathogenesis of ethanol-induced liver injury in mice. *Gastroenterology*. **139**, 664-674.
- Dalton TP, Shertzer HG and Puga A (2002). Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Signalling*. **14**, 879.
- Darwish HA, Abd-Raboh NR and Mahdy A (2012). Camel's milk alleviates alcohol-induced liver injury in rats. *Food and Chemical Toxicology*. **50**, 1377-1383.
- Desmet VJ, Van Eyken P and Roskams T (1999). Embryology of the liver and intra hepatic biliary tract. *Clinical Hepatology Journal*. **1**, 51-64.
- Desmeules J, Bonnabry P and Dayer P (1999). Hepatic metabolism of drugs. *Clinical Hepatology Journal*. **1**, 145-164.
- Dhanabal SP, Syamala G, Satish Kumar MN and Suresh b (2006). Hepatoprotective activity of the Indian medicinal plant *Polygala arvensis* on d-galactosamine-induced hepatic injury in rats. *Fitoterapia*. **77**, 472-474.
- Dollah MA, Parhizkar S, Abdul Latiff L and Bin Hassan MH (2013). Toxicity Effect of *Nigella Sativa* on the Liver Function of Rats. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. **3**, 97-102.
- Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Vidal N, Lesgards JF and Stocker P (2007). Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and

- their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*. **224**, 801-809.
- Dwight JFJ and Hendry BM (1996). The effects of tert-butyl hydroperoxide on human erythrocyte membrane ion transport and the protective actions of antioxidants. *Clinica Chimica Acta*. **249**, 167-181.
- Ellman GL (1959). Tissue sulphhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **82**, 70-77.
- Enomoto N, Ikejima K, Yamashina S, Hirose M, Shimizu H, Kitamura T, Takei Y, Sato A and Thurman RG (2001). Kupffer cell sensitization by alcohol involves increased permeability to gut-derived endotoxin. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. **25**, 51-54.
- Evans JR (2006). Antioxidant vitamin and mineral supplements for slowing the progression of age-related macular degeneration. *Cochrane Database System Review*. **19**, 254.
- Favier A (2003). Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique-novembre. 108-115.
- Fernandez-checa JC, Kaplowit ZN, Garcia-ruy ZC, Colell A, Miranda M, Mari M, Ardite E and Morales A (1997). SH transport in mitochondria: Defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol induced defect. *American Journal of Physiology*. **273**, 7-17.
- Frederiks WM and Vreeling-Sindelárová H (2002). Ultrastructural localization of xanthine oxidoreductase activity in isolated rat liver cells. *Acta Histochemica*. **10**, 29-37.
- Friedman SL (2008). Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*. **134**, 1655-1669.
- Fukunari A, Okamoto K, Nishino T, Eger BT, Pai EF, Kamezawa M, Yamada I and Kato N (2004). Y-700 {1-[3-Cyano-4-(2,2-dimethylpropoxy) phenyl]-1H-pyrazole-4-carboxylic Acid}: A Potent Xanthine Oxidoreductase Inhibitor with Hepatic Excretion. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **311**, 519-528.
- Fulbert JC and Cals MJ (1992). Les Radicaux libres en biologie clinique. *Pathologie Biologie*. **49**, 66-77.
- Galli A, Svegliati-Baroni G, Ceni E, Milani S, Ridolfi F, Salzano R, Tarocchi M, Grappone C, Pellegrini G, Benedetti A, Surrenti C and Casini A (2005). Oxidative stress stimulates proliferation and invasiveness of hepatic satellite cells via a MMP2-mediated mechanism. *Hepatology*. **41**, 1074-1084.

- Gani MS and John AS (2013). Evaluation of hepatoprotective effect of *Nigella sativa* L. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. **5**, 428-430.
- Garcia-ruyz C, Morales A, Ballesta A, Rodes J, Kaplowitz N and Fernandez-checha JC (1994). Effect of chronic alcohol feeding on glutathion and functional integrity of mitochondria in periportal and perivenous rat hepatocytes. *Journal of Clinical Investigation*. **94**, 193-201.
- Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z and Jore D (2003). Espèces réactives de l'oxygène: Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique*, -novembre-décembre. 91-96.
- Germain E, Bonnet P, Aubourg L, Grangeponne MC, Chajès V and Bougnoux P (2003). Anthracycline-induced cardiac toxicity is not increased by dietary omega-3 fatty acids. *Pharmacological Research*. **47**, 111-117.
- Gilani A, Jabeen Q and Khan M (2004). A review of medicinal uses and pharmacological activities of *Nigella sativa*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. **7**, 441-451.
- Giustarini D, Dalle-Donne I, Tsikas D and Rossi R (2009). Oxidative stress and human diseases: origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. **46**, 241-281.
- Godber B, Sanders S, Harrison R, Eisenthal R and Bray RC (1998). > or = 95% of xanthine oxidase in human milk is present as the demolybdo form, lacking molybdopterin. *Journal of Biochemical Society Transaction*. **25**, 519.
- Govindarajan R, Vijayakumar M, Rao CV, Kumar V, Rawat AK and Pushpangadan S (2004). Action of *Asparagus racemosus* against streptozotocin-induced oxidative stress. *Journal of Natural Product Sciences*. **10**, 177-181.
- Greenish HG (1880). Contribution to the Chemistry of *Nigella sativa*. *Journal of Pharmacy*. **10**, 909-911.
- Haq A, Adbullatif M, Labo P, Khabar K, Sheth K and Al-Sedairy S (1995). *Nigella sativa*: effect on human lymphocytes and polymorphonuclear leucocyte phagocytic activity. *Immunopharmacology*. **30**, 147-55.
- Haq A, Lobo PI, Al-Tufail M, Rama NR and Al-Sedairy ST (1999). Immunomodulatory effect of *Nigella sativa* proteins fractionated by ion exchange chromatography. *International Journal of Immunopharmacology*. **21**, 283-295.
- Halliwell B and Gutteridge JMC (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed. Oxford university Press. pp: 20-31.
- Hamed P, Elahe T, Khalil A, Alireza TH, Sayed Masoud H and Hossein H (2014). Effect of *Nigella sativa* fixed oil on ethanol toxicity in rats. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. **17**, 1020-1031.

- Hamrouni-Sellami I, Kchouk ME and Marzouk B (2008). Lipid and aroma composition of black cummin (*Nigella sativa* L.) seeds from Tunisia. *Journal of Food and Biochemistry*. **32**, 335-352.
- Hannah R, Vitullo L and Cipolla MJ (2005). Preexisting hyperglycemia during stroke is associated with enhanced reactive oxygen species (ROS) production and worsened stroke outcome. *The FASEB Journal*. **19**, 1230.
- Harrison R (2002). structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we no?. *Free Radical Biology & Medicine*. **33**, 774-797.
- Harrison R (2006). Milk xanthine oxidase: properties and physiological roles. *International Dairy Journal*. **16**, 546-554.
- Hildebrand DH, Terao J and Kito M (1984). Phospholipids plus tocopherols increase soybean oil stability. *Journal of The American Oil Chemists Society*. **61**, 552-525.
- Hille R (1996). The Mononuclear Molybdenum Enzymes. *Chemical Reviews*. **96**, 2757-2816.
- Hmza AJ, Osman MT, Adnan A and Omar E (2013). Immunomodulatory effect of *Nigella sativa* oil in the disease process of type 1 diabetic rats. *Research journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical sciences*. **4**, 980-988.
- Hoare C (2002). Xanthine oxidoreductase: cellular distribution and role in NO production. Ph. D. Thesis. University of Bath, UK. Houghton PJ, Heras PD and Houlst JRS (1995). Fixed oil of (*Nigella sativa*) and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Medica*. **61**, 33-36.
- Huang P, Feng L, Oldham EA, Keating MJ and Plunkett W (2000). Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. *Nature*. **407**, 390-395.
- Hudson BJB and Lewis JI (1983). Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible oils: Phospholipids as synergists. *Food Chemistry*. **10**, 111-120.
- Hunt J and Massey V (1992). Purification and properties of milk xanthine dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*. **267**, 21479-21485.
- Israel Y, Orrego H and Niemela O (1988). Immune responses to alcohol metabolites: Pathogenic and diagnostic implications. *Seminars in Liver Disease*. **8**, 81-90.
- Juza-ryan M and Pauli Eric M (2014). Clinical and surgical anatomy of the liver. *A review for clinicians. Clinical anatomy*. **27**, 764-769.
- Kartal N, Sokmen M, Tepe B, Daferera D, Polissiou M and Sokmen A (2007). Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry*. **100**, 584-589.

- Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL and Jameson JL (2008). *Harrison's Principles of Internal Medicine*. New York: McGraw-Hill.
- Kato S, Ishii H, Aiso S, Yamashita S, Ito D and Tsuchiya M (1990). Histochemical and immunohistochemical evidence for hepatic zone 3 distribution of alcohol dehydrogenase in rats. *Hepatology*. **12**, 66-69.
- Keenan TW (2001). Milk lipid globules and their surrounding membrane: a brief history and perspectives for future research. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. **6**, 365-371.
- Kera Y, Sippel HW, Penttila KE and Lindros KO (1987). Acinar distribution of glutathione-dependent detoxifying enzymes. Low glutathione peroxidase activity in perivenous hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*. **36**, 2003-2006.
- Khader M, Bresgen N and Eckl PM (2009). *In vitro* toxicological properties of thymoquinone. *Food and Chemical Toxicology*. **47**, 129-133.
- Kim HJ, Barajas B, Chan RC and Nel AE (2007). Glutathione depletion inhibits dendritic cell maturation and delayed-type hypersensitivity: Implications for systemic disease and immunosenescence. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **119**, 1225-1233.
- Koller A (1984). Total serum protein. In Kaplan LA, Presce AJ, eds. *Clinical Chemistry, Theory, Analysis, and Correlation*. St. Louis: Mosby Company. pp: 1316-1319.
- Kruk I, Michalska T, Lichszteid K, Kladna A and Aboul- Enein HY (2000). The effect of thymol and its derivatives on reactions generating reactive oxygen species. *Chemosphere*. **41**, 1059-1064.
- Kumar V, Fausto N and Abbas A (2004). "Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease." 7th edition, *Elsevier Saunders*.
- Kurosaki M, Li Calzi M, Scanziani E, Garattini E and Terao M (1995). Tissue and cell-specific expression of mouse xanthine oxidoreductase gene *in vivo*: regulation by bacterial lipo polysaccharide. *Biochemical Journal*. **306**, 225-234.
- Kurose I and Granger DN (1994). Evidence implicating xanthine oxidase and neutrophils in reperfusion-induced microvascular dysfunction. *Annals of The New York Academy of Sciences*. **723**, 158-179.
- Li H, Samouilov A, Liu X and Zweier JL (2004). Characterization of the effects of oxygen on xanthine oxidase-mediated nitric oxide formation. *The Journal of Biological Chemistry*. **279**, 16939-16946.
- Li HB, Cheng KW, Wong CC, Fan KW, Chen F and Jiang Y (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemistry*. **102**, 771-776.

- Liau KH, Blumgart LH and DeMatteo RP (2004). Segment-oriented approach to liver resection. *Surgical Clinics of North America*. **84**, 543-561.
- Lieber CS and DeCarli LM (1974). An experimental model of alcohol feeding and liver injury in the baboon. *Journal of Medical Primatology*. **3**, 153-163.
- Lieber CS (2004). Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol*. **34**, 9-19.
- Lieber CS, DeCarli L M and Sorrell MF (1989). Experimental methods of ethanol administration. *Hepatology*. **10**, 501-510.
- López-Lázaro M (2006). HIF-1: hypoxia-inducible factor or dysoxia-inducible factor?. *The FASEB Journal*. **20**, 828-832.
- Martin G, Duez H, Blanquart C, Berezowski V, Poulain P, Fruchart JC, Najib-Fruchart J, Glineur C and Staels B (2001). Statin-induced inhibition of the Rho-signaling pathway activates PPAR alpha and induces HDL apo A-I. *Journal of Clinical Investigation*. **107**, 1423-1432.
- Martin HM, Hancock JT, Vyv Salisbury and Harrison R (2004). Role of Xanthine Oxidoreductase as an Antimicrobial Agent. *Infection and Immunity*. **72**, 4933-4939.
- Massey V and Harris CM (1997). Milk xanthine dehydrogenase: the first one hundred years. *Biochemical Society Transaction*. **25**, 750-755.
- Mates JM, Perez-Gomez C and De Castro IN (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*. **32**, 595-603.
- Mather IH and Keenan TW (1998). Origin and secretion of milk lipids. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. **3**, 259-273.
- McCord JM, Roy RS and Schaffer SW (1985). Free radicals and myocardial ischemia. The role of xanthine oxidase. *Advanced Myocardiol*. **5**, 183-189.
- McCuskey RS and Sipes IG (1997). Introduction to the liver and its response to toxicants. *Comprehensive Toxicology Journal*. **9**, 1-10.
- Meneshian A and Bulkley GB (2002). The physiology of endothelial xanthine oxidase: from urate catabolism to reperfusion injury to inflammatory signal transduction. *Microcirculation*. **9**, 161-175.
- Merfort I, Wray V, Barakat H, Hussein S, Nawwar M and Willuhn G (1997). Flavonoid triglycerides from seeds of *Nigella sativa*. *Phytochemistry*. **46**, 359-363.
- Mezey E (1984). Commentary on the hypermetabolic state and the role of oxygen in alcohol-induced liver injury. *Recent Development in Alcoholism*. **2**, 135-141.

- Meziti A, Meziti H, Boudiaf K, Mustapha B and Bouriche H (2012). Polyphenolic profile and antioxidant activities of *Nigella sativa* seed extracts *in vitro* and *in vivo*. *World Academy of Science, Engineering and Technology*. **64**, 24-32.
- Milane H (2004) La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèses de doctorat, Université Louis Pasteur.
- Mitsuda H, Yuasumoto K and Iwami K (1996). Antioxidation action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Eiyo to Shokuryo*. **19**, 210-214.
- Mollazadeh H and Hosseinzadeh H (2014). The protective effect of *Nigella sativa* against liver injury: a review. *Iranian journal Basic Medical Sciences*. **17**, 958-966.
- Moller P, Wallin H and Knudsen LE (1996). Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chemico-Biological Interaction*. **102**, 17-36.
- Morita Y (2001). Identification of xanthine dehydrogenase/oxidase as a rat Paneth cell zinc-binding protein. *Biochimica Biophysica Acta*. **1540**, 43-49.
- Mozzafari FS, Ghorbanli M, Babai A and FarzamiScpehrM (2000). The effect of water stress on the seed oil of *Nigella sativa* L. *Journal of Essential Oil Research*. **12**, 36-38.
- Nagi MN, Alam K, Badary OA, al-Shabanah OA, Al-Sawaf HA and Al-Bekairi AM (1999). Thymoquinone protects against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice via an antioxidant mechanism. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. **47**, 153-159.
- Nakajima K, Nakano T and Tanaka A (2006). The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: The comparison of atherogenic effects on oxidized LDL and remnant lipoproteins in plasma. *Clinica Chimica Acta*. **367**, 36-47.
- Nath B, Levin I, Csak T, Petrasek J, Mueller C, Kodys K, Catalano D, Mandrekar P and Szabo G (2011). Hepatocyte-specific hypoxia-inducible factor-1alpha is a determinant of lipid accumulation and liver injury in alcohol-induced steatosis in mice. *Hepatology*. **53**, 1526-1537.
- Nehar S (2014). Hepatoprotective Effect of *Nigella sativa* Seed Oil on Rat Model of Alcoholic Liver Disease. *International Journal for Pharmaceutical Research Scholars*. **3**, 2277-7873.
- Nergiz C and Otlis S (1993). Chemical composition of *Nigella sativa* seeds. *Food Chemistry*. **48**, 259-261.
- Nishino T (1994). The conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase and the role of the enzyme in reperfusion injury. *The Journal of Biochemistry*. **116**, 1-6.

- Okado-Matsumoto A and Fridovich I (2001). Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*. **276**, 38388-38393.
- Okamoto K, Eger BT, Nishino T, Kondo S, Pai EF and Nishino T (2003). An extremely potent inhibitor of xanthine oxidoreductase. Crystal structure of the enzyme-inhibitor complex and mechanism of inhibition. *The Journal of Biological Chemistry*. **278**, 1848-1855.
- Okamoto K, Matsumoto K, Hille R, Eger BT, Pai EF and Nishino T (2004). The crystal structure of xanthine oxidoreductase during catalysis: implications for reaction mechanism and enzyme inhibition. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. **101**, 7931-7936.
- Okamoto K and Nishino T (2008). Crystal Structures of Mammalian Xanthine Oxidoreductase Bound with Various Inhibitors: Allopurinol, Febuxostat, and FYX-051. *Journal of Nippon Medical School*. **75**, 2-3.
- Okhawa H, Ohishi N and Yagi K (1979). Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*. **95**, 351-358.
- Packer L (1997). Vitamin C and redox cycling antioxidants. In: Vitamin C in health and disease. Eds Packer L and Fuchs J. Marcel Dekker Inc, New York. pp: 95-121.
- Packer L, Weber SU and Rimbach G (2001). Molecular aspects of  $\alpha$  tocotrienol antioxidant action and cell signalling. *Journal of Nutrition*. **31**, 369-373.
- Peña-Silva RA, Miller JD, Chu Y and Heistad DD (2009). Serotonin produces monoamine oxidase dependent oxidative stress in human heart valves. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. **297**, 1354-1360.
- Petrasek J, Dolganiuc A, Csak T, Nath B, Hritz I, Kodys K, Catalano D, Kurt-Jones E, Mandrekar P and Szabo G (2011). Interferon regulatory factor 3 and type I interferons are protective in alcoholic liver injury in mice by way of crosstalk of parenchymal and myeloid cells. *Hepatology*. **53**, 649-660.
- Pincemail J, Meurisse M, Limet R and Defraigne J (1999). Evaluation du stress oxydant: une réalité pour le médecin généraliste. *Vaisseaux, Cœur, Poumon*. **4**, 148-154.
- Pincemail J, Siquet J and Chappelle JP (2000). Evaluation des concentrations plasmatiques en antioxydants anticorps contre les LDL oxydées et homocysteine dans un échantillon de la population liégeoise. *Annales de Biologie Clinique*. **58**, 178-185.
- Plaa GL and Charbonneau M (2001). Detection and Evaluation of Chemically Induced Liver Injury. *Methamphetamine Toxicity Journal*. **4**, 1145-1187.
- Powers SK and Lennon SL (1999). Analysis of cellular response to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *The Nutrition Society*. **58**, 1025-1033.

- Prasad KN, Yang B, Dong X, Jiang G, Zhang H, Xie H and Jiang Y (2009). Flavonoid contents and antioxidant activities from *Cinnamomum* species. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. **10**, 627-632.
- Quantanilha AT, Packer L, Szyszlo, DJA, Racnelly TL and Davies KJA (1982). Membrane effects of vitamin E deficiency bioenergetic and surface charge density of skeletal muscle and liver mitochondria. *Annals of The New York Academy of Sciences*. **393**, 32-47.
- Ramadan MF and Mörsel TJ (2002a). Direct isocratic normal-phase HPLC assay of fat-soluble vitamins and  $\beta$ -carotene in oilseeds. *European Food Research and Technology*. **214**, 521-527.
- Ramadan MF and Morsel TJ (2003). Analysis of glycolipids from black cumin (*Nigella sativa* L), coriander (*Coriandrum sativum* L.) and niger (*Guizotia abyssinica* cass.) oil seeds. *Food Chemistry*. **80**, 197-204.
- Ramadan MF (2007). Nutritional value, functional properties and nutraceutical applications of black cumin (*Nigella sativa* L.): an overview. *International Journal of Food Science and Technology*. **42**, 1208-1218.
- Robak J and Gryglewski RJ (1988). Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochemical pharmacology*. **37**, 837-841.
- Ruch RJ, Cheng SJ and Klaunig JE (1989). Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*. **10**, 1003-1008.
- Saad AF, Virella G, Chassereau C, Boackle RJ and Lopes-Virella MF (2006). OxLDL immune complexes activate complement and induce cytokine production by MonoMac 6 cells and human macrophages. *Journal of Lipid Research*. **47**, 1975-1983.
- Sagara Y, Dargusch R, Chamber SD, Davis J, Schuber TD and Maher P (1998). Cellular Mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. **24**, 1375-1389.
- Salem ML. Immunomodulatory and therapeutic properties of *Nigella sativa* L (2005). *seed. International Immunopharmacology*. **5**, 1749-1770.
- Sanders S, Eisenthal R and Harrison R (1997). NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase. Generation of superoxyde anion. *European Journal of Biochemistry*. **245**, 541-548.
- Sandhar HK, Kumar B, Prasher S, Tiwari P, Salhan M and Sharma P (2011). A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *Internationale Pharmaceutical Scientia*. **1**, 25-41.

- Schuppan D and Afdhal NH (2008). Liver cirrhosis. *Lancet*. **371**, 838-851.
- Sentman ML, Granstrom M, Jakobson H, Reaume A, Basu S and Marklund SL (2006). Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*. **281**, 6904-6909.
- Sergent O, Griffon B, Cillard P, Cillard J (2001). Alcool et stress oxydatif. *Pathologie Biologie*. **49**, 689-695.
- Servais S, Couturier K, Koubi H, Rouanet JL, Desplanches D, Sornay-Mayet MH, Sempore B, Lavoie JM and Favier R (2003). Effect of voluntary exercise on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release by subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine*. **35**, 24-32.
- Seval D, Betül E, Esra BK, Necla KT and GülÖzdemirler E (2014). Protective effect of *Nigella sativa* oil against binge ethanol induced oxidative stress and liver injury in rats. *Chinese Journal of Natural Medicines*. **12**, 495-499.
- Shirpoor A, Minassian S, Salami S, Khadem-Ansari MH, Ghaderi-Pakdel F and Yeghiazaryan M (2009). Vitamin E protects developing rat hippocampus and cerebellum against ethanol-induced oxidative stress and apoptosis. *Food Chemistry*. **113**, 115-120.
- Sibulesky L (2013). Normal liver anatomy. *Clinical Liver Disease*. **2**, 1-3.
- Smalpley RV, Guaspari A, Haase-Statz S, Anderson SA, Cederberg D and Hohneker JA (2000). Allopurinol: Intravenous Use for Prevention and Treatment of Hyperuricemia. *Journal of Clinical Oncology*. **18**, 1758-1763.
- Smirnoff N and Cumbes QJ (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*. **28**, 1057-1060.
- Sobhi Widad, Khettal Bachra, Belmouhoub Messaoud, Atmani Djebbar, Duez Pierre and Benboubetra Mustapha (2011). Hepatotoxicity and Langerhans Islets Regenerative Effects of Polar and Neutral Lipids of *Nigella sativa* L. in Nicotinamide/streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Pteridines*. **22**, 97-104.
- Soler L, Delingette H, Malandain G, Montagnat J, Ayache N, Koehl C, Dourthe O, Malassagne B, Smith M, Mutter D and Marescaux J (2001). Fully automatic anatomical, pathological, and functional segmentation from CT scans for hepatic surgery. *Computer Aided Surgery*. **6**, 131-142.
- Sorrell MF and Tuma DJ (1987). The functional implications of acetaldehyde binding to cell constituents. *Annals of The New York Academy of Sciences*. **492**, 50-62.
- Stevens CR, Millar TM, Clinch JG, Kanczler JM, Bodamyali T and Blake DR (2000). Antibacterial properties of xanthine oxidase in human milk. *Lancet*. **356**, 829-830.

- Stirpe F, Ravaioli M, Battelli MG, Musiani S and Grazi GL (2002). Xanthine oxidoreductase activity in human liver disease. *American Journal of Gastroenterology*. **97**, 2079-2085.
- Stocker P, Lesgards JF, Vidal N, Chalier F and Prost M (2003). ESR study of a biological assay on whole blood: antioxidant efficiency of various vitamins. *Biochimica Biophysica Acta*. **1621**, 1-8.
- Sturtz LA, Diekert K, Jensen LT, Lill R and Culotta VC (2001). A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *Journal of Biological Chemistry*. **276**, 38084-38089.
- Sultan MT, Butt MS, Anjumi FM, Jamil A, Akhtar S and Nasir M (2009). Nutritional profile of indigenous cultivar of black cumin seeds and antioxidant potential of its fixed and essential oil. *Pakistan Journal of Botany*. **41**, 1321-1330.
- Sun VI, Larry W, Oberley and Ving U (1988). A Simple Method for Clinical Assay of Superoxide Dismutase. *Clinical Chemistry*. **34**, 497-500.
- Swamy SM and Tan BK (2000). Cytotoxic and immunopotentiating effects of ethanolic extract of *Nigella sativa* L seed. *Journal of Ethnopharmacology*. **70**, 1-7.
- Takano Y, Hase-Aoki K, Horiuchi H, Zhao L, Kasahara Y, Kondo S and Becker MA (2005). Selectivity of febuxostat, a novel non-purine inhibitor of xanthine oxidase/xanthine dehydrogenase. *Life Sciences*. **76**, 1835-1847.
- Tanhehco EJ, Yasojima K, McGeer PL, Washington RA and Lucchesi BR (2000). Free radicals upregulate complement expression in rabbit isolated heart. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. **279**, 195-201.
- Thangathirupathi A, Saraswathi A, Muruges N and Aushad-Ali N (2013). Hepatoprotective activity of various extracts of *Cayratia carnosa* (Wall. Ex.Weight) Gagnep. In paracetamol induced hepatotoxicity in Albino rats. *International Journal of Pharmacy and pharmaceutical Sciences*. **5**, 957-960.
- Tilg H and Diehl AM (2000). Cytokines in alcoholic and non alcoholic steatohepatitis. *The New England Journal of Medicine*. **343**, 1467-1476.
- Tsukamoto H and Xi XP (1989). Incomplete compensation of enhanced hepatic oxygen consumption in rats with alcoholic centrilobular liver necrosis. *Hepatology*. **9**, 302-306.
- Tsukamoto H, Horne W, Kamimura S, Niemela O, Parkkila S, Yla-Herttula S and Brittenham GM (1995). Experimental liver cirrhosis induced by alcohol and iron. *Journal of Clinical Investigation*. **96**, 620- 630.

- Tuter M, Aksoy HA, Ustun G, Riva S, Secundo F and Ipekler S (2003). Partial Purification of *Nigella sativa* L. Seed Lipase and Its Application in Hydrolytic Reactions. Enrichment of  $\gamma$ -Linolenic Acid from Borage Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **80**, 237-241.
- Uchida K (2000). Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radical Biology and Medicine*. **28**, 1685-1696.
- Valiollah H, Alireza G and Hadi J (2004). Black cumin seed essential oil, as a potent analgesic and anti-inflammatory drug. *Phytotherapy Research*. **18**, 195-199.
- Valko M, Morris H and Conin MTD (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*. **12**, 1161-1208.
- Verzola D, Bertolotto MB, Villaggio B, Ottonello L, Dallegri F, Salvatore F, Berruti V, Gandolfo MT, Garibotto G and Deferrari G (2004). Oxidative stress mediates apoptotic changes induced by hyperglycemia in human tubular kidney cells. *Journal of the American Society of Nephrology*. **15**, 85-87.
- Von Sonntag C (1987). New aspects in the free-radical chemistry of pyrimidine nucleobases. *Free Radical Research Communication*. **2**, 217-224.
- Vorbach C, Harrison R and Capecchi MR (2003). Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system. *Trends in Immunology*. **24**, 512-517.
- Wang J, Van Praagh A, Hamilton E, Wang Q, Zou B, Muranjan M, Murphy NB and Black SJ (2002). Serum xanthine oxidase: origin, regulation, and contribution to control of trypanosome parasitemia. *Antioxidant & Redox Signaling*. **4**, 161-178.
- Warrier PK, Nambiar VPK and Ramankutty (2004). Indian medicinal plants - a compendium of 500 species. Chennai: Orient Longman Pvt Ltd. **4**, 139-142.
- Whitfield JB, Zhu G, Heath AC, Powell LW and Martin NG (2001). Effects of alcohol consumption on indices of iron stores and of iron stores on alcohol intake markers. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. **25**, 1037-1045.
- Woo C, Kumar A, Sethi G and Tan K (2012). Thymoquinone: Potential cure for inflammatory disorders and cancer. *Biochemical Pharmacology*. **83**, 443-451.
- Wu D and Cederbaum AI (2003). Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Research & Health*. **27**, 277-284.
- Yan AW, Fouts DE, Brandl J, Stärkel P, Torralba M, Schott E, Tsukamoto H, Nelson KE, Brenner DA and Schnabl B (2011). Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease. *Hepatology*. **53**, 96-105.

- Yang HY, Lin HS, Chao JC, Chien YW, Peng HC and Chen JR (2012). Effects of soy protein on alcoholic liver disease in rats undergoing ethanol withdrawal. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. **23**, 679-684.
- Zaoui A, Cherrah Y, Mahassini N, Alaoui K, Amarouch H and Hassar M (2002b). Acute and chronic toxicity of *Nigella sativa* fixed oil. *Phytomedicine*. **9**, 69-74.
- Zhang J, Xu C, Zhao Y and Chen Y (2014). The significance of serum xanthine oxidoreductase in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical Laboratory*. **60**, 1301-1307.
- Zhao XJ, Dong Q, Bindas J, Piganelli JD, Magill A, Reiser J and Kolls JK\_(2008). TRIF and IRF-3 binding to the TNF promoter results in macrophage TNF dysregulation and steatosis induced by chronic ethanol. *Journal of Immunology*. **181**, 3049-3056.

---

## ANNEXE 1

### - Purification de la xanthine oxydoréductase

La purification de la xanthine oxydase du lait humain (XOR) est réalisée selon la méthode décrite par les membres de l'équipe du professeur Harrison (Sanders *et al.*, 1997; Benboubetra *et al.*, 1997), la XOR est préparée à partir du lait maternel congelé. Le lait humain est centrifugé à 5000 rpm pendant 20 min (centrifugeuse 3-K30, Sigma), la crème flottante est dissoute dans un volume double de phosphate de potassium ( $K_2 HPO_4$ , 0.2 M) contenant 1 mM d'EDTA. Le mélange est soumis à une agitation douce pendant 2 heures puis centrifugé à 6000 rpm pendant 20 min. Le surnageant récupéré est filtré sur laine de verre et additionné progressivement de 15 % (V/V) du butanol froid (-20 °C) et de sulfate d'ammonium 15 % (P/V) sous agitation douce pendant 1 heure, puis centrifugé à 10000 rpm pendant 20 min. Après filtration du surnageant sur laine de verre, la XOR est précipitée par ajout progressif de sulfate d'ammonium 20 % (P/V) sous agitation douce pendant 1 heure et 30 min, puis centrifugation à 11000 rpm pendant 30 min. Le précipité (couche supérieure brunâtre) est récupéré doucement et resuspendu dans un petit volume de tampon héparine ( $NaH_2 PO_4 / Na_2 HPO_4$  25 mM, contenant 1 mM d'EDTA, pH 6.2) et dialysé contre ce même tampon pendant une nuit sous agitation. Afin d'éliminer les impuretés insolubles, le dialysat est centrifugé à 18000 rpm pendant 60 min. Après filtration à travers un filtre de 45  $\mu m$  de diamètre, le produit final est l'extrait brut de la XOR.

### - Purification de l'enzyme sur colonne d'héparine-agarose

L'extrait brut obtenu est déposé sur une colonne chromatographique contenant un gel d'héparine-agarose équilibré et lavé par le tampon héparine. La colonne est ensuite lavée par le même tampon renfermant 0.1 M de NaCl. La XOR est récupérée de la colonne par le tampon héparine contenant 0.2 M de NaCl et dialysée contre un tampon Bicine 50 mM, pH 8.3, pendant une nuit. Enfin, l'enzyme est répartie en aliquotes de 0.5 ml et conservée à -20 °C jusqu'à son utilisation. La colonne est régénérée par lavage avec une solution de NaCl 1 M puis avec le tampon d'héparine pour une nouvelle utilisation.

## ANNEXE 2

### - Tests de pureté de la XOR

La pureté de l'enzyme purifiée est estimée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE) et par le rapport protéine /flavine (RPF), correspondant à la lecture de l'absorbance aux longueurs d'ondes 280 nm et 450 nm (A280nm/A450nm) (Spectrophotomètre UV-Vis à double faisceau, Techcomp). Une valeur proche de 5 est un bon signe de pureté (Bray, 1975).

#### a- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) est réalisée selon la méthode de Laemmli (1970); le gel de séparation (10 % d'acrylamide et 2.74 % de bis-acrylamide) est préparé dans un tampon Tris-HCl (0.125 M, pH 6.8) contenant 0.1 % de SDS (P/V) et polymérisé par ajout de 0.042 % de N,N,N'N' Tetraméthylène diamine (TEMED) (V/V) et 0.1% de persulfate d'ammonium (P/V). Le gel de concentration est préparé dans le même tampon Tris-HCl (0.125 M, pH 6.8) contenant 0.1% de SDS (P/V) et polymérisé par ajout de 0.1% de TEMED (V/V) et 0.1% de persulfate d'ammonium (P/V). Les échantillons ; XOR, environ 1 mg / ml ainsi que les standards des poids moléculaires (1 mg / ml) sont préparés dans une solution échantillon, 2 % de SDS (P/V), 20 % de glycérol (V/V) et 0.005 % de bleu de bromophénol (P/V). Ensuite, ils sont chauffés à 100 °C pendant 5 min. Les standards des poids moléculaires (Sigma) utilisés sont de 29000 Da à 205000 Da.

La migration électrophorétique est réalisée dans un tampon Tris-HCl (25 mM) contenant 0.192 M de glycine et 0.1 % de SDS (P/V) par application d'un courant électrique de 10 mA jusqu'à ce que les protéines pénètrent dans le gel de séparation, l'ampérage est ensuite augmenté jusqu'à 37- 45 mA. Les protéines séparées sont colorées pendant au moins une heure dans une solution de bleu de Coomassie 0.2 % (P/V) contenant 10 % d'acide acétique (V/V), 45 % de méthanol (V/V) dans de l'eau distillée. Le gel est ensuite décoloré par une solution d'acide acétique 5-10 % (V/V).

## **ANNEXE 3**

### **- Préparation des antisérums de lapin**

#### **a- Immunisations des lapins**

Les immunisations des lapins blanc sont réalisées à l'Institut Pasteur d'Alger, une primo-immunisation est réalisée par l'inoculation par voie sous cutanée de 100 µg de la XOR purifiée diluée dans 500 µl de tampon PBS et 500 µl d'adjuvant complet de Freund. Des quantités égales d'enzyme diluée dans du PBS et l'adjuvant incomplet de Freund sont ensuite utilisées pour les différents rappels. Des saignées sont effectuées, en général, une semaine après chaque rappel par des piqûres au niveau de la veine périphérique de l'oreille. Une semaine après le dernier rappel, les lapins sont égorgés pour récupérer la totalité possible du sang. Après une centrifugation de 20 min à 3000 rpm, le sérum est congelé à -20 °C jusqu'à son utilisation (Benboubetra, 1997)..

#### **b- Purification des anticorps anti-xanthine oxydoréductase**

##### **- Précipitation au sulfate de sodium**

A 10 ml de sérum de lapin immunisé sont ajoutés 18g de sulfate de sodium. Après une agitation durant 1h 30 min à la température du laboratoire, le mélange est laissé au repos pendant 1h 30 min avant d'être centrifugé pendant 30 min à 3000 rpm. Deux lavages au sulfate de sodium 18% (p /v) sont effectués puis le précipité obtenu est dissout dans un tampon approprié (selon l'utilisation des IgG purifiées) et dialysé contre le même tampon pendant une nuit à 4°C (Benboubetra, 1997).

##### **- Chromatographie d'immunoaffinité sur gel de protéine A sépharose**

La fraction d'IgG obtenue par précipitation au sulfate de sodium est purifiée d'avantage par passage sur une colonne de protéine A sépharose. Suite à un passage et un recyclage d'environ 4h avec un débit de 6-8 ml / h et un lavage suffisant, l'élution des IgG est effectuée avec un tampon de citrate de sodium 0,2 M pH 3,0 (ou avec un tampon de glycine-HCl 0,2 M pH 2,7). Les IgG sont collectées en fractions de 2.5 ml dans des tubes renfermant 0.5 ml de Tris-HCl 1M pH 8.0 afin d'éviter une éventuelle dégradation des anticorps à pH acide (Benboubetra, 1997).