

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

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

N°/SNV/2014

THÈSE

Présentée par

SOBHI Widad

Pour l'obtention du diplôme de

Doctorat en Sciences

Option: Biochimie

THÈME

Caractérisation de l'huile des graines de *Nigella sativa* et étude de son activité hypoglycémiante et son hépato-toxicité

Soutenue publiquement le 30/04/2014

DEVANT LE JURY

Président : **Pr Senator Abderrahmane**

Pr. UFA Sétif 1

Directeur : **Pr Benboubetra Mustapha**

Pr. UFA Sétif 1

Co-directeur: **Pr Atmani Djebbar**

Pr. UAM Béjaia 1

Examineurs: **Pr Benabdeslam Fadhila**

Pr. UAM Béjaia 1

Pr Kacem-Chaouche Noureddine

Pr. UMC Constantine 1

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, professeur Benboubetra, je tiens à lui exprimer ma vive reconnaissance pour m'avoir guidé durant ces années. Qu'il trouve ici l'expression de mon respect et de ma gratitude.

Mes remerciements sont adressés aussi au professeur Atmani, co-directeur de thèse. Je le remercie infiniment pour sa confiance et son soutien lors de la réalisation de cette thèse.

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

Mes remerciements sont adressés aussi à Mme le professeur Benabdesslam et Mr le professeur Kacem-Chaouche d'avoir accepté d'examiner ma thèse.

Je ne pourrai jamais remercier suffisamment Dr Khettal pour son aide, conseils et soutien inconditionné dans les moments les plus difficiles. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Aussi, je n'oublierai jamais de remercier Professeur Duez pour son aide et accueil au sein de son laboratoire. Qu'il trouve ici le témoignage de ma reconnaissance et ma profonde gratitude. Mes remerciements sont aussi adressés à Caroline, Marie, Philippe et Olivier pour la bonne ambiance et l'accueil chaleureux.

Aussi, je tiens à remercier Dr Zouani, responsable du laboratoire de pharmacotoxicologie du CRD, pour son inestimable aide. Mes remerciements sont aussi adressés à tout les membres de son équipe.

Mes remerciements et ma reconnaissance sont aussi adressés à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

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.

Je le dédie aussi à toi, mon cher mari, Ferhat. Je ne trouve pas les mots pour te remercier pour ton aide, patience et encouragements. Merci infiniment.

A mes frères Hamid et Brahim. A mes sœurs Wissam et Wafa et leurs maris. Merci pour tout, pour vos encouragements et soutien.

A Bouchra, mon amie, je te remercie pour ton amitié, ton soutien et pour ta disponibilité.

A Rachia et Fadila, pour votre amitié et confiance et aussi pour tous les bons moments.

A ma belle-famille, pour son soutien et encouragements.

Aux lumières de ma vie, à mes perles et sens de mon existence. A vous mes enfants : Salah eddine, Badre eddine et Chams eddine.

Widad

Résumé

Dans cette étude, nous avons déterminé que l'huile totale de *Nigella sativa* est la fraction responsable de l'effet hypoglycémiant. Ses caractéristiques physico-chimiques indiquent qu'elle a une grande qualité biologique. Son fractionnement par chromatographie sur colonne a permis d'obtenir deux grandes fractions : l'huile neutre, fractionnée elle-même en quatre sous fractions, et l'huile polaire. Son fractionnement par chromatographie a permis d'obtenir trois sous fractions polaires.

L'analyse fine par GC et HPLC de l'huile totale et de ses fractions neutres a permis de dévoiler leur composition en acides gras, en triglycérides et en stérols et alcools supérieurs. Ces résultats indiquent, encore une fois la richesse de cette huile en composés lipidiques bioactifs, ce qui permettrait d'expliquer les propriétés pharmacologiques en générale et hypoglycémiantes en particulier de *Nigella sativa*.

Les résultats indiquent aussi que la fraction polaire est responsable de la réduction de la glycémie chez les rats diabétiques, selon un mécanisme postprandial. La fraction neutre de l'huile permet, de son côté, la régénération des ilots de Langerhans, après leur destruction par la streptozotocine.

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'avait 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.

Summary

In this study, we determined that the total oil of *Nigella sativa* is responsible for the hypoglycaemic effect of this plant. Its physical and chemical characteristics indicate that it has a high biological quality. Fractionation of this oil by column chromatography yielded two major fractions: the neutral oil, fractionated itself into four sub-fractions, and polar oil which fractionation by chromatography yielded three polar sub-fractions.

An analysis by GC and HPLC of the total oil and its neutral fractions allowed to reveal their composition in fatty acids, triglycerides and sterols and higher alcohols. These results indicate once again the richness of this oil in bioactive lipid compounds. These compounds would explain the pharmacological properties of *Nigella sativa*.

The results also indicate that the polar fraction is responsible for the reduction of blood glucose in diabetic rats, according to a postprandial mechanism. The neutral fraction of the oil allows, for its part, the regeneration of islets of Langerhans after their destruction by streptozotocin.

The toxicity of total *Nigella sativa* oil was also evaluated on thin slices of liver (PCLS). This approach has clearly shown that *Nigella sativa* oil had no hepato-protective effect against acetaminophen (paracetamol). The total oil and its two large polar and neutral fractions were evaluated for their toxicity in vivo. The results indicate that no significant traces of liver toxicity under the conditions used, quantity of extracts administered and duration of the test.

ملخص

من خلال هذه الدراسة توصلنا إلى أن الزيت الإجمالي للحبة السوداء هو الجزء المسؤول عن خاصية تخفيض نسبة السكر في الدم. الخصائص الفيزيائية و الكيميائية لهذا الزيت تبين أنه يتميز بجودة بيولوجية عالية. عملية تجزيء زيت الحبة السوداء بواسطة تقنية الكروماتوغرافيا سمحت بالحصول على جزئين هما الزيت المحايد و التي بدورها جزأت إلى أربعة أجزاء و أيضا الجزء القطبي حيث أنه أنتج بدوره ثلاثة أجزاء قطبية.

سمح لنا بتحديد الأحماض HPLC و GC التحليل الدقيق للزيت الإجمالي وأجزائه بواسطة تقنيات الدهنية، والدهون الثلاثية والجامدة والكحول العالي المكونة له. حيث أظهرت النتائج مرة أخرى أن هذه النسبة غنية بالمكونات الدهنية الحيوية وهذا ما سمح لنا بتفسير الخاصية الدوائية بشكل عام و خاصية تخفيض نسبة السكر في الدم بشكل خاص .

وقد بينت النتائج أيضا أن الجزء القطبي للزيت مسؤول عن تخفيض نسبة السكر في الدم عند جردان التجارب المصابة بداء السكر وفقا لآلية بعد الأكل، الجزء القطبي للزيت سمح من جهته بتجديد جزر لانجرهانز بعد تدميرها من قبل الستربتوزوتوسين.

من جهة أخرى تم تقييم سمية الزيت الإجمالي للحبة السوداء أيضا على شرائح رقيقة من الكبد بتقنية وقد أظهرت هذه التجربة بوضوح أن الزيت الإجمالي للحبة السوداء لا تتميز بخاصية حماية (PCLS) كما قمنا أيضا بتقييم سمية الزيت الإجمالي وكذلك الجزأين .الكبد ضد أسيتامينوفين (باراسيتامول) الهامين المكونين له الجزء القطبي و الجزء المحايدمن خلال دراسة في الجسم الحي و قد أظهرت النتائج عدم وجود آثار كبيرة لسمية الكبد وفقا للشروط المستخدمة، ونعني بهذا كمية الزيت المستخدمة ومدة الاختبار.

Liste des abréviations

GSK3 :	Glycogène synthase 3 kinase
PKB/Akt :	Protéine kinase B
4E-BP1:	4E binding protein 1
ADA:	Association Américaine du Diabète : en anglais
AGL:	Acides gras libres
ANAES:	Agence National d'Accréditation et d'Evaluation en Santé
CCK:	Cholécystokinine
CT:	Domaine C-terminal.
eNOS :	Endothelial nitric oxide synthase
ERK1 et 2:	Extracellular signal-regulated kinase
FFA:	Free Fatty acids
GIP:	Gastric inhibitory polypeptide
GLP-1:	Glucagon like peptide-1
GLP-1:	Glucagon Like Peptide-1
GLUT:	Glucose transporter
GRP:	Gastrin releasing peptide
HK:	Hexokinase (HK)
HNF:	Hepatic Nuclear Factor
IGF-1R:	Insulin-like growth factor-1 Receptor
IRS:	Insulin Receptor Substrate
JM:	Domaine juxtamembranaire
MIDD:	Maternally Inherited Diabetes and Deafness
MODY:	Maturity Onset Diabetes of the Young
mTOR:	Mammalian target of rapamycin
NPY:	Neuropeptide Y.
NSF:	N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein
PACAP:	Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide ;
PCLS:	Precision-cut liver slices
PDK1/2:	3-phosphoinositide-dependent protein kinase ½
PH:	Pleckstrine homology region
PTB:	Phosphotyrosine binding
SH2:	Src homology 2

SHC:	Src homologous and collagen protein
SHP2:	SH2 domain protein tyrosine phosphatase-2
SNAP:	SolubleNSF attachment protein
SNARE:	SNAPreceptor
SUR1:	Sulphonylurea Receptor
TK:	Domaine tyrosine kinase;
VIP:	Vasoactive intestinal peptide

Liste des figures

Figure 1 : Sécrétion biphasique de l'insuline en réponse à un stimulus constant en glucose	06
Figure 2 : Les différents sites d'actions des antidiabétiques oraux	09
Figure 3 : Structure moléculaire de la metformine	09
Figure 4 : Structure chimiques de la roziglitazone et de la pioglitazone	10
Figure 5 : mécanisme d'action des thiazolidinediones	12
Figure 6 : Structure chimique de deux sulfamides hypoglycémiants; le glibenclamide et le carbutamide	13
Figure 7 : Structure chimique de la répaglinide	13
Figure 8 : Structure chimique de l'acarbose	13
Figure 9 : Structure de l'insuline humaine	15
Figure 10: Structure de la pré-proinsuline	17
Figure 11: Principales protéines impliquées dans le processus d'exocytose	19
Figure 12: Récepteur de L'insuline	20
Figure 13: Voies de signalisation du récepteur de l'insuline	22
Figure 14: Structure chimique de l'oleuropéoside	26
Figure 15: Structure chimique de l'acide oléanolique	26
Figure 16: Structure chimique de la malvidine-3-O-glucoside	30
Figure 17: Structure chimique de l'eremanthine	31
Figure 18: Structure moléculaire de la nefrine	33
Figure 19: Inhibition de l'absorption intestinale du glucose et du fructose sous l'effet de la quercétine sur les GLUT2	34
Figure 20: Photomicrographie du pancréas d'un rat diabétique (a) et d'un autre rat diabétique traité par l'extrait riche en flavonoïdes des graines d' <i>Eugenia jambolana</i> (b)	35
Figure 21: Structure moléculaire de la quercétine (a) et de la rutine (b)	36
Figure 22: Structure chimique du cacalol (1), acétate de cacalol (1a), cacalone (2) et epicacalone (2a).	36
Figure 23: Graines de différentes espèces de <i>Nigella</i>	37
Figure 24: Aspects morphologiques de <i>Nigella sativa</i>	38
Figure 25: Structures chimiques des principaux constituants des huiles volatiles des graines de <i>Nigella sativa</i>	41
Figure 26: Structures chimiques des alcaloïdes de type dolabellane diterpeniques de <i>Nigella sativa</i>	43
Figure 27: Morphologie des graines <i>Nigella sativa</i> utilisées	57
Figure 28: Schéma d'extraction de l'huile et de l'extrait méthanolique à partir des graines de <i>Nigella sativa</i>	58

Figure 29 : Protocole utilisé pour l'étude de l'hépatotoxicité chez des rats rendus diabétiques	71
Figure 30: Autopsie de la cavité abdominale	73
Figure 31: Composition en Acides gras de l'huile totale de <i>Nigella sativa</i>	80
Figure 32: Composition en acides gras de fraction neutre F1 de l'huile totale	81
Figure 33: Composition en acides gras de fraction neutre F2 de l'huile totale	81
Figure 34: Composition en acides gras de fraction neutre F3 de l'huile totale	82
Figure 35: Composition en acides gras de fraction neutre F4 de l'huile totale	82
Figure 36: Composition en acides gras de la solution des acides gras standards	83
Figure 37: Chromatogramme HPLC-ELSD des triglycérides de la fraction neutre F1	88
Figure 38: Chromatogramme HPLC-ELSD des triglycérides de la fraction neutre F2	88
Figure 39: Chromatogramme HPLC-ELSD des triglycérides de la fraction neutre F3	89
Figure 40: Chromatogramme HPLC-ELSD des triglycérides de la fraction neutre F4	89
Figure 41: Chromatogramme des stérols et alcools supérieurs de l'huile totale	92
Figure 42: Chromatogramme des stérols et alcools supérieurs de la fraction 1	92
Figure 43: Chromatogramme des stérols et alcools supérieurs de la fraction 2	93
Figure 44: Chromatogramme des stérols et alcools supérieurs de la fraction 3	93
Figure 45: Chromatogramme des stérols et alcools supérieurs de la fraction 4	94
Figure 46: Inhibition de l'alpha glucosidase par les extraits de <i>Nigella sativa</i>	106
Figure 47: Effet des extraits des graines de <i>Nigella sativa</i> sur les ilots de Langerhans	108
Figure 48: Evaluation de l'hépto-toxicité des extraits des graines de <i>Nigella sativa</i>	112
Figure 49 : Effet des extraits des graines de <i>Nigella sativa</i> sur les tissus hépatiques des rats diabétiques	117

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les MODY est mutations	05
Tableau 2 : Autres plantes hypoglycémiantes utilisées pour le traitement du diabète de type 2	32
Tableau 3 : Composition biochimique des graines de <i>Nigella sativa</i>	39
Tableau 4 : Les principaux composés phénoliques de l'extrait méthanolique de <i>Nigella Sativa</i>	40
Tableau 5 : Les principaux flavonoïdes de <i>Nigella sativa</i>	40
Tableau 6 : Composition chimique des huiles volatiles de <i>Nigella sativa</i> Algérienne	42
Tableau 7 : Composition en acides gras des huiles de <i>Ns</i> Egyptienne, Tunisienne et Iranienne	44
Tableau 8 : Classes lipidiques de <i>Nigella sativa</i> extraite par différentes méthodes	45
Tableau 9 : Composition en acides gras des lipides de <i>Nigella sativa</i> (g/100g de lipides totaux)	46
Tableau 10: Stérols l'huile de <i>Nigella Sativa</i> d'origine Tunisienne et Iranienne	46
Tableau 11: Composition en vitamines (vitamine liposoluble) et β -carotène de l'huile fixe de <i>Nigella Sativa</i>	46
Tableau 12: Propriétés physico-chimiques des huiles de <i>Nigella sativa</i>	47
Tableau 13: Rendement d'extraction de l'huile de <i>Nigella sativa</i> et de ses fractions polaires et apolaires	75
Tableau 14: Les différents indices de l'huile de <i>Nigella sativa</i>	76
Tableau 15: Identification des acides gras dans l'huile totale de <i>Nigella sativa</i> et dans ses quatre fractions neutres	84
Tableau 16: Taux des acides gras identifiés dans l'huile de <i>Ns</i> et ses fractions neutres	85
Tableau 17: Rapports calculés des acides gras insaturés / acides gras saturé de l'huile totale (HT) et de ses quatre fractions neutres (F1, F2, F3 et F3)	86
Tableau 18: Temps de rétention des différents triglycérides	89
Tableau 19: Détermination de la teneur en triglycérides de l'huile totale des graines de <i>Nigella sativa</i> et de ses quatre fractions neutres.	90
Tableau 20: Composition en stérols et alcools supérieurs de l'huile totale des graines de <i>Nigella sativa</i> et de ses quatre fractions neutres	94
Tableau 21: Teneur globale de stérols et alcools supérieurs dans les fractions de l'huile des Graines de <i>Nigella sativa</i>	97
Tableau 22: Effet hypoglycémiant des extraits de <i>Nigella sativa</i>	99
Tableau 23: Effet de <i>Nigella sativa</i> sur les taux des triglycérides et cholestérol plasmatiques	102
Tableau 24: Effet hypoglycémiant post-prandial des extraits de <i>Nigella sativa</i>	105
Tableau 25: Analyse des marqueurs hépatiques des rats traités par les extraits de <i>Nigella sativa</i>	114

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1
Chapitre 1 : Revue bibliographique	3
1. Diabète sucré	3
1.1. Définition	3
1.2. Epidémiologie	3
1.3. Classification des diabètes	3
1.3.1. Diabète insulino-dépendant (diabète du type I)	4
1.3.2. Diabète non insulino-dépendant (diabète du type II)	4
1.3.3. Diabète gestationnel (DG)	4
1.3.4. Diabète du type MODY	5
1.3.5. Diabète mitochondrial	5
1.4. Physiopathologie du diabète du type 2	7
1.5. Complications du diabète	7
1.6. Traitement du diabète du type 2	7
1.6.1. Objectifs du traitement	8
1.6.2. Prise en charge non médicamenteuse	9
1.6.3. Traitement médicamenteux	9
1.6.3.1. Insulino-sensibilisateurs	12
1.6.3.2. Insulino-sécréteurs	13
1.6.3.3. Inhibiteurs des α -glucosidases	14
2. Phytothérapie	24
2.1. Phytothérapie du diabète	25
2.2. Plantes médicinales utilisées dans le traitement du diabète du type 2	25
2.3. Substances végétales susceptibles d'agir sur le diabète du type 2	33
3. <i>Nigella sativa</i>	37
3.1. Généralités sur la plante	37
3.2. Description botanique de la plante	38
3.3. Composition biochimique des graines de <i>Nigella sativa</i>	39
3.4. Composition chimique des huiles de <i>Nigella sativa</i>	43
3.5. Propriétés physico-chimiques des huiles de <i>Nigella sativa</i>	47
3.6. Propriétés pharmacologiques	49
Chapitre 2 : Matériel et méthodes	57
1. Matériel biologique	57
1.1. Animaux	57
1.2. Graines	57
2. Extraction et caractérisation de l'huile de <i>Nigella sativa</i>	57
2.1. Extraction de l'huile	57
2.2. Fractionnement de l'huile par chromatographie sur colonne	58

2.3. Caractérisation physico-chimique de l'huile de <i>Nigella sativa</i>	58
2.4. Détermination qualitative et quantitative des acides gras par CPG	59
2.5. Détermination qualitative et quantitative des phytostérols par CPG	63
2.6. Identification des triglycérides par HPLC-ELSD	64
3. Etude des propriétés hypoglycémiantes de <i>Nigella sativa</i>	65
3.1. Recherche de l'activité hypoglycémiant chez le rat diabétique	65
3.1.1. Induction du diabète chez le rat par la Streptozotocine et nicotinamide	65
3.1.2. Répartition des animaux	66
3.1.3. Dosage des paramètres sanguins	66
3.2. Effet hypoglycémiant post-prandial des extraits de <i>Nigella sativa</i>	66
3.2.1. Evaluation in vivo	66
3.2.2. Evaluation in vitro	67
3.3. Etude des effets des extraits sur les ilots de Langerhans	68
4. Evaluation de l'hépatotoxicité des extraits des graines de <i>Nigella sativa</i>	68
4.1. Etude de l'activité hépatoprotective des extraits par PCLS	68
4.1.1. Préparation des tranches fines de foie	69
4.1.2. Etude de la viabilité cellulaire	70
4.2. Etude de l'hépatotoxicité par les méthodes classiques	70
4.2.1. Déroulement e l'expérience	71
4.2.2. Prélèvement sanguin	72
4.2.3. Dosage des marqueurs hépatiques	72
4.2.4. Prélèvement des organes	72
5. Analyse statistique	72
Chapitre 3 : Résultats et discussion	75
1. Caractéristiques de l'huile de <i>Nigella sativa</i>	75
1.1. Rendement de l'extraction	75
1.2. Caractéristiques physico-chimiques	76
1.3. Composition en acides gras par CPG	83
1.4. Composition en triglycérides par HPLC-ELSD	87
1.5. Composition en phytostérols et alcools supérieurs par CPG	91
2. Effet hypoglycémiant des extraits de <i>Nigella sativa</i>	98
2.1. Recherche de l'activité hypoglycémiant chez le rat diabétique	98
2.2. Effet des extraits sur le taux des lipides sanguins	101
2.3. Mécanismes potentiels de l'effet hypoglycémiant de <i>Nigella sativa</i>	104
2.3.1. Effet post-prandial chez le rat	106
2.3.2. Effet des extraits de <i>Nigella sativa</i> sur l' α -glucosidase	107
2.3.3. Effet régénératif des ilots de Langerhans des extraits de <i>Nigella sativa</i>	111
3. Hépatotoxicité des extraits de <i>Nigella sativa</i>	111
3.1. Evaluation de l'hépatotoxicité des extraits de <i>Nigella sativa</i> par PCLS	115
3.2. Hépatotoxicité évaluée par les méthodes classiques	115
3.3. Histopathologie des tissus hépatiques des rats traités	120
4. Discussion générale	127
Conclusion	128
Références bibliographiques	

Introduction

Le diabète est une maladie métabolique caractérisée par une défaillance de l'organisme dans la régulation de la glycémie. Elle constitue actuellement l'une des premières causes de mortalité et de morbidité dans la plupart des pays occidentaux et son incidence devient aussi importante dans les pays en voie de développement.

Selon les derniers chiffres de la Fédération internationale du diabète, cette maladie touche aujourd'hui 371 millions de personnes dans le monde. Ce chiffre devrait atteindre 522 millions personnes d'ici 2030. Le poids du diabète augmente à l'échelle mondiale, en particulier dans les pays à revenu faible ou intermédiaire, puisqu'on y compte 80% des cas de diabète. La maladie menace non seulement la santé publique mais également la prospérité économique : un diabète non traité conduit à l'apparition des complications lourdes et handicapantes, comme l'insuffisance rénale, les cardiopathies, les amputations des membres et la cécité. Les coûts engendrés par ces complications sont extrêmement élevés en termes de souffrance humaine mais aussi en poids financier, d'où l'intérêt d'une prise en charge précoce et efficace.

Selon toujours la IDF (2012), L'Algérie compte près de 1,8 million de diabétiques, dont 150 000 enfants. Selon les statistiques de la direction de la prévention contre les maladies non transmissibles au ministère de la santé, près de 12 700 décès par an en Algérie sont liés au diabète.

Le traitement moderne du diabète fait appel à plusieurs familles d'hypoglycémisants oraux comme les biguanides et les thiazolidinediones qui agissent sur l'insulino-résistance d'une part et les sulfamides et les glitinides qui agissent en stimulant l'insulino-sécrétion d'autre part. Cependant aucun des médicaments utilisés pour le traitement du diabète n'agit simultanément sur les deux facteurs pathogéniques du diabète ou améliore aussi les anomalies du métabolisme lipidique associées le plus souvent au diabète de type II.

Face à l'échec du traitement chimique dans certains cas et à cause de son coût élevé, notamment dans les pays en voie de développement, le recours à l'utilisation des plantes médicinales devient de plus en plus une pratique courante dans le traitement de cette maladie. D'ailleurs, cette démarche a été recommandée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) depuis 1970. Parmi les plantes médicinales les plus utilisées dans le traitement du diabète, mais aussi dans le traitement d'autres pathologies, on rencontre *Nigella sativa*.

Les propriétés hypoglycémiantes de *Nigella sativa* ont été démontrées dans plusieurs études scientifiques. Bien que cet effet soit bien élucidé, certaines questions n'ont pas été traitées, d'où l'objectif de la présente thèse. On s'intéressera, donc, à trois grands axes :

- 1- Déterminer les groupes ou familles de composés impliqués directement dans l'activité hypoglycémiant de *Nigella sativa*.
- 2- Identifier les cibles moléculaires de ces composés.
- 3- Evaluer l'hépatotoxicité de ces composés dans les conditions de concentrations et quantités efficaces utilisées lors de l'étude de leur effet hypoglycémiant.

1. Diabète sucré

1.1. Définition

Le diabète sucré se définit par une hyperglycémie chronique résultant de la diminution de la sécrétion de l'insuline et /ou de la diminution de son efficacité. Dans l'immense majorité des cas, sa cause reste inconnue bien que la prédisposition génétique et des facteurs liés à l'environnement sont à souligner (**Gimenez et al., 2002**). Le syndrome cardinal diabétique, comprenant une polyuro-polydipsie, une asthénie, un amaigrissement et une hyperphagie, n'apparaît que pour des glycémies nettement supérieures à 3 g/l. (**Grimaldi et al., 2005**). D'après l'organisation mondiale de la santé (OMS), une personne est considérée comme diabétique si elle présente un des éléments suivants: **i)** présence des signes cliniques du diabète et une glycémie ≥ 2 g/l (11,1 mmol /L). **ii)**-glycémie à jeun (8 heures de jeûne ou plus) $\geq 1,26$ g/l (7 mmol /L). Cette valeur doit être confirmée par une deuxième mesure un autre jour. **iii)** glycémie 2 heures après la consommation de 75 g de glucose per os est ≥ 2 g/l (**Gimenez et al., 2002**). Ce dernier élément de diagnostic n'est cependant pas recommandé (**Acad et Dent, 2007**).

1.2. Épidémiologie

Dans tous les pays du monde, le diabète sucré est un problème de santé publique majeur. À l'échelle mondiale, le nombre de patients diabétiques est en augmentation considérable. En 2001, la fédération internationale des diabètes (International diabetes Fondation ; IDF) évaluait à 177 millions le nombre de patients diabétiques. Pour 2010, plus de 6% de la population mondiale était diabétique (**IDF, 2012**). L'OMS prévoit une population de 366 millions de diabétiques pour 2030 (**Wens et al., 2007**). En Algérie, le diabète occupe la quatrième place parmi les maladies non transmissibles. D'après le registre national du Diabète de l'année 2005, l'incidence du diabète type I chez les enfants et les adolescents est de 9 pour 100 000 et des cas de diabète type II commencent à être recensés chez les enfants (**Boudiba et al., 2008**). Selon la fédération algérienne des associations des diabétiques, L'Algérie compte 2 millions de diabétiques, de tous types confondus (**Salemi , 2010**).

1.3. Classification des diabètes

Plusieurs mécanismes physiologiques distincts peuvent aboutir au syndrome biologique commun à tous les types de diabète sucré : l'hyperglycémie. La distinction entre les différentes formes du diabète repose donc sur la définition des ces entités

physiopathologiques (**Drouin et al., 1999**). Actuellement, l'OMS adopte la classification du diabète selon l'étiologie et la gravité de l'hyperglycémie.

1.3.1. Diabète insulino-dépendant (diabète de type 1)

Le diabète insulino-dépendant, appelé également le diabète maigre a cause de l'amaigrissement du patient, se déclenche avant l'âge de 40ans, lorsque 90% des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas sont détruites par le système immunitaire et cessent ainsi de produire de l'insuline (**Perlemuter et al., 2000**). Le manque de l'insuline qui en découle rend l'administration de cette hormone indispensable. Le diagnostic est souvent posé tôt suite à la présence de symptômes sévères. Ce type représente 10 à 15 % des diabètes (**Wens et al., 2007**).

1.3.2. Diabète non insulino-dépendant (diabète de type 2)

Le diabète insulino-indépendant survient le plus souvent après 50 ans représentant ainsi 85 à 90% des diabètes (**Grimaldi et al., 2005**). Il résulte de l'incapacité de l'organisme à réagir correctement à l'action de l'insuline (**Calope et al., 2008**). En absence de traitement, ce diabète se reconnaît par une augmentation chronique de la glycémie, responsable des signes cardinaux du diabète, amaigrissement ou obésité et des troubles de la conscience aboutissant à un coma mortel (**Raccach, 2004 ; Calop et al., 2008**).

1.3.3. Diabète gestationnel (DG)

Le diabète gestationnel est observé chez 3% des femmes enceintes, il peut être considéré comme transitoire. Il s'agit d'une intolérance au glucose conduisant à une hyperglycémie de sévérité variable (**Rodier, 2001**). Généralement, ce diabète guérit spontanément après l'accouchement. Il peut, cependant, constituer un facteur de risque pour un diabète de type 2 (DNID) ultérieur. Les causes de sa survenue demeurent en grande partie inexpliquées (**Buysschaert, 2006**).

1.3.4. Diabète du type MODY

Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY) ce sont des diabètes qui se développent chez l'enfant et le jeune adulte avant 30ans. Ils ressemblent au diabète type 2 dans leur expression clinique mais la surcharge pondérale n'est pas un élément déterminant. Ce sont des formes héréditaires de diabète sucré transmises sous le mode autosomique dominant conduisant à un dysfonctionnement des cellules β (**Buysschaert, 2006**). Les MODY sont monogéniques et caractérisés par une sévérité variable (**Hennen, 2001**). Les sous-variantes les plus importantes sont présentées sur le tableau suivant :

Tableau 1 : les MODY et mutations (Hennen, 2001, Buysschaert, 2006)

Type de diabète	Localisation	Gène muté
MODY1	Chromosome 20q	HNF-4 α
MODY2	Chromosome 7p	Gene de glucokinase
MODY3	Chromosome 12q	HNF-1 α
MODY4	Chromosome 4	IPFI
MODY5	Chromosome 17	HNF-1 β

HNF: hepatic Nuclear Factor

1.3.5. Diabète mitochondrial

Le diabète mitochondrial est aussi dit MIDD (Maternally Inherited Diabetes and Deafness) est un type de diabète à transmission exclusivement maternelle de l'ADN mitochondrial. Une mutation en position 3243 en est responsable. Elle conduit à un déficit en ATP. L'hyperglycémie est souvent accompagnée par d'autres signes cliniques graves (Buysschaert, 2006).

1.4. Physiopathologie du diabète de type 2

Le nom «diabète non insulino-dépendant» a été remplacé par «diabète de type 2». L'insulinothérapie n'est pas nécessaire au traitement au début de la maladie mais elle est souvent indispensable ou très utile (diabète insulino-requérant ou insulino-nécessitant) après plusieurs années d'évolution, du fait d'une insulino-pénie progressive et inéluctable (Halimi, 2005).

Chez les personnes souffrant d'un diabète de type 2, l'organisme devient résistant à l'insuline. La production de l'insuline continue, mais l'organisme ne répond plus aussi bien à ses effets. Après un certain temps, la capacité du pancréas à produire de l'insuline diminue progressivement. C'est pour cette raison que le contrôle du diabète de type 2 nécessite une augmentation graduelle des types de médicaments lors du traitement. Que ce soit en raison du manque de l'insuline ou de l'incapacité à utiliser correctement cette hormone par l'organisme (Favier et al., 2005).

Plusieurs facteurs interviennent dans l'étiopathologie du diabète de type 2. Dans cette pathologie, la composante héréditaire est bien présente, mais un ou plusieurs facteurs environnementaux sont déterminants pour son expression clinique (DeFronzo, 1997).

a) Facteurs de l'environnement

L'obésité, en particulier l'obésité androïde, la sédentarité, le tabagisme et l'âge augmentent considérablement le risque de survenue du diabète de type 2 (**Raverot, 2005**).

b) Facteurs génétiques

L'évidence de l'implication des facteurs génétiques dans le déclenchement du diabète de type 2 a été démontrée par les études familiales : la concordance se situe entre 60 et 100% pour les jumeaux monozygotes. Elle est d'environ de 40% pour les individus apparentés au premier degré des sujets diabétiques de type 2 (**Simonis-Bik et al., 2010**).

c) Troubles de la sécrétion de l'insuline

La sécrétion de l'insuline est assurée par les cellules β des îlots de Langerhans pancréatiques. Dans les conditions physiologiques, la sécrétion de l'insuline est caractérisée par une cinétique dite biphasique (Figure1). Elle est stimulée par une augmentation aiguë et transitoire de la concentration extracellulaire du glucose. Le niveau maximum de la sécrétion est atteint au bout de quelques minutes (pic précoce). Lorsque la concentration élevée est prolongée, un deuxième pic apparaît (pic tardif). Cette phase dure tant que le stimulus reste appliqué (**Magnan et Ktorza, 2005**).

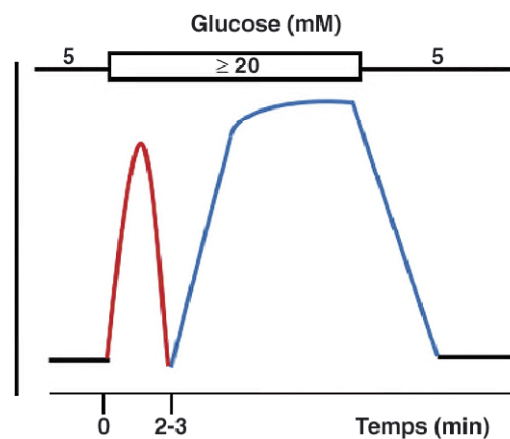


Figure 1 : Sécrétion biphasique de l'insuline en réponse à un stimulus constant en glucose
(D'après **Magnan et Ktorza, 2005**)

L'interprétation de cette réponse biphasique n'est pas encore bien élucidée. On pense que le rôle du premier pic est de sensibiliser les tissus cibles aux effets de l'hormone (**Albisser et al., 1974 ; Pfeifer et al., 1981**).

Dans le diabète de type 1, les troubles de la sécrétion de l'insuline sont en premier temps qualitatifs ; ils se traduisent par la diminution du pic de réponse précoce au glucose. Ensuite quantitatifs ; diminution des capacités insulino-sécrétoires qui se majorent

progressivement dans le temps pour aboutir de façon plus ou moins tardive à une insulino-pénie profonde (**Blicklé et al., 2000**).

d) Troubles de la sensibilité à l'insuline

Les troubles de la sensibilité à l'insuline, appelés également l'insulino-résistance est une altération de la signalisation de l'insuline, suite à une diminution de la phosphorylation du récepteur de l'insuline (**Henri, 2011**). La diminution des effets de l'insuline sur les tissus insulino-sensibles (tissus musculaires, tissus adipeux, foie) provoque une hyperproduction de glucose par le foie, expliquant l'hyperglycémie à jeun et une partie des hyperglycémies interprandiales (**Henri, 2011**). L'insulino-résistance est donc caractérisable au niveau des tissus périphériques, en particulier, du transport du glucose dans le muscle et dans le tissu adipeux et de la production hépatique de glucose. Cette insulino-résistance est aggravée par l'hyperglycémie et l'excès d'acides gras libres circulants ou de triglycérides stockés en excès dans le muscle. L'excès de la production hépatique de glucose est aussi majoré par les taux élevés d'acides gras circulants (**Halimi, 2005**).

1.5. Complications du diabète de type 2

Les complications du diabète apparaissent généralement plusieurs années après l'installation de la pathologie. Ces complications sont les résultats de l'hyperglycémie. Les patients développent des complications macro et micro-vasculaires, principales causes de décès des diabétiques atteints de diabète de type 1 et type 2 (**Böhme et Chamagne, 2006**). Ces complications sont :

- a)** Les complications micro-vasculaires (micro-angiopathiques) telles que la rétinopathie, la néphropathie et la neuropathie ; elles sont liées en majeure partie à l'hyperglycémie. (**Grimaldi et al., 2005**). L'hypertension artérielle joue un rôle important dans l'aggravation de la micro angiopathie diabétique (**Grimaldi, 2005**).
- b)** Les complications macro-vasculaires (macro-angiopathiques) telles que la maladie coronarienne, l'athérosclérose et l'artériopathie périphérique (**Girard et al., 2007**). Elles sont favorisées par plusieurs facteurs, principalement l'élévation de la glycémie (**Halimi, 2005**).

1.6. Traitements du diabète du type 2

1.6.1. Objectifs du traitement

Les experts de l'Association Américaine du Diabète (ADA, 2007), de l'Agence National d'Accréditation et d'Evaluation en Santé (France) (ANAES, 1999) et l'étude prospective du Royaume Uni sur le diabète (UKPDS pour United Kingdom Prospective Diabetes

Study, 1998), proposent de planifier les objectifs du traitement autour de la prévention de la microangiopathie et de la macroangiopathie diabétique.

- a) **Prévention ou la stabilisation de la microangiopathie :** Elle nécessite une normalisation de la glycémie avec une HbA1c (hémoglobine glyquée) inférieure à 6,5 % (glycémie <1,20 g/l), un contrôle strict de la pression artérielle dont l'objectif est de maintenir la pression artérielle inférieure à 140/80 mmHg et un arrêt du tabac (**Philippe et al., 2009**).
- b) **Prévention ou la stabilisation de la macroangiopathie :** Elle impose, à côté du contrôle glycémique, la correction des facteurs de risque vasculaires associés qui jouent un rôle déterminant dans sa survenue à savoir la pression artérielle (< 140/80 mmHg), le cholestérol total (< 2 g/l ou 5,2 mmol/l), LDL-cholestérol (< 1 g/l ou 2,5 mmol/l), HDL-cholestérol ($\geq$ 0,45 g/l ou 1,2 mmol/l), triglycérides (< 1,5 g/l ou 1,7 mmol/l), exercice physique régulier, arrêt du tabac, HbA1c (< 6,5 %) et un indice de masse corporelle (IMC) inférieur à 25 kg/m² pour les deux sexes (**Grimaldi et al., 2005**).

1.6.2. Prise en charge non médicamenteuse

La prise en charge non médicamenteuse du diabète de type 2 peut avoir un effet favorable sur le contrôle glycémique. Elle se résume en deux actions essentielles ; les mesures diététiques et l'exercice physique :

- *Les mesures diététiques*

Chez les diabétiques nouvellement diagnostiqués et souffrant d'une obésité, le contrôle adéquat de la glycémie peut être obtenu par une réduction de l'apport calorique. La perte de poids engendrée conduit à une réduction de la glycémie et un meilleur métabolisme des lipides. Ces régimes hypocaloriques doivent favoriser un apport en graisses insaturées au détriment des graisses saturées et un apport suffisant en glucides complexes (**Chandalia et al., 2000 ; Wens, et al., 2007**).

- *L'exercice physique*

Plusieurs études ont révélé le rôle positif de l'activité physique dans l'amélioration de la glycémie des diabétiques de type 2. L'exercice physique modéré (aérobie, fitness ou entraînement en résistance progressive) pratiqué durant des périodes allant de deux semaines à 12 mois et imposé à 377 patients atteints de diabète de type 2, a permis de réduire significativement l'HbA_{1c} indépendamment de la perte de poids (**Thomas et al.,**

2006). L'exercice physique seul peut favoriser la diminution L'HbA_{1c} de 0.5% (Sigal et al., 2006).

1.6.3. Traitement médicamenteux

Les hypoglycémisants oraux sont nécessaires lorsque la diététique et l'activité physique combinées ne suffisent pas (Vincent et al., 2001). Le traitement médicamenteux débute généralement par une monothérapie, puis un recours, selon les besoins, à une association de plusieurs molécules, voir à l'insuline si elle s'avérer nécessaire (Blumer, 2009).

Les médicaments destinés aux diabétiques de type 2, afin de normaliser leur glycémie, sont les antidiabétiques oraux. Ces derniers augmentent la sensibilité des tissus périphériques à l'insuline (insulino-sensibilisateurs), déclenchent la sécrétion de l'insuline (insulino-sécréteurs) ou diminuent la résorption intestinale des sucres d'origine alimentaire (Archambeaud, 2008). Les sites d'action des antidiabétiques oraux sont résumés sur la figure suivante :

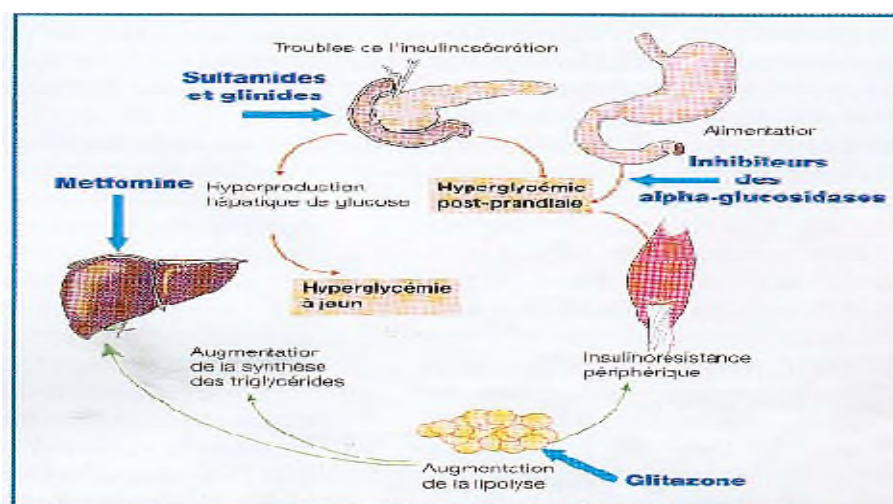


Figure 2: Différents sites d'actions des antidiabétiques oraux (D'après Halimi, 2005)

1.6.3.1. Insulino-sensibilisateurs

a) **Biguanides** : la metformine est le seul représentant de cette classe. Elle est identifiée comme principale drogue dans le traitement du diabète de type 2 (Gras et al., 2006).

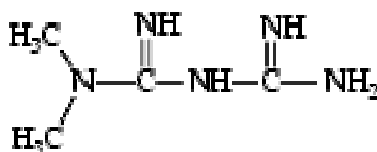


Figure 3 : Structure moléculaire de la metformine

L'effet principal de la metformine est la réduction de la production hépatique du glucose en supprimant l'activité de l'enzyme glucose 6 phosphatase (G6Pase), une enzyme cruciale pour la gluconéogenèse et la glycogénolyse, et prolonge l'amélioration de la sensibilité périphérique à l'insuline (**Massin et al., 2003**). Le mode d'action précis de la metformine dans les états d'insulinorésistance reste débattu. Le modèle classique met en route l'activation par la metformine de l'AMP-activated protein kinase (AMPK). L'AMPK va phosphoryler et inactiver l'acétyl CoA carboxylase ce qui aura pour effet une diminution de la synthèse de malonyl CoA à partir d'acétyl CoA. Or, le malonyl CoA est d'une part un puissant inhibiteur de la carnitine palmitoyl transférase qui assure le transport transmembranaire des acides gras dans la mitochondrie où le processus de beta-oxydation a lieu. D'autre part, le malonyl CoA est l'un des précurseurs de la synthèse des acides gras (AG). L'activation donc de l'AMPK par la metformine aura donc un double effet, la diminution de la lipogenèse et l'augmentation de la dégradation des AG par beta-oxydation. Ces deux actions convergeant vers une réduction de la surcharge tissulaire en graisses (**Ratzin et al., 2006**).

D'autres études ont montré que la metformine n'entraîne aucune stimulation de la sécrétion d'insuline. C'est pourquoi aucune hypoglycémie n'a jamais été constatée en monothérapie ou en association aux autres antidiabétiques oraux ne stimulant pas le pancréas endocrine : glitazones ou inhibiteurs des alpha-glucosidases (**Halimi, 2006**).

b) Thiazolidinediones (TZD) ou glitazones : Parmi les molécules les plus connues de cette classe de traitements on retrouve la rosiglitazone et la pioglitazone (**Figure 4**) (**Halimi et al., 2008**).

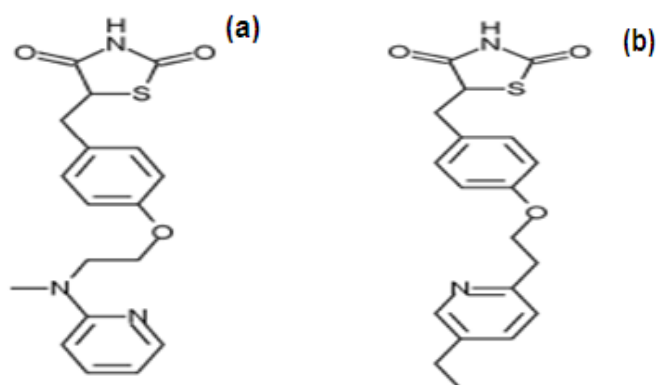


Figure 4 : Structure chimiques de la rosiglitazone (a) et de la pioglitazone (b)

Les thiazolidinediones (TZD) ou glitazones sont des agonistes des récepteurs nucléaires PPAR γ (peroxisome proliferator activated receptor γ). Ces récepteurs sont présents dans plusieurs tissus et dans le tissu adipeux principalement, surtout exprimés durant la différenciation des préadipocytes en adipocytes (**Blicklé, 2003**).

Les PPAR γ existent sous forme d'hétérodimères avec le récepteur des rétinoïdes (RXR α). Tout ligand agoniste de ce récepteur entraîne une reconfiguration du complexe PPAR γ -RXR α (**Lehman et al., 1995**). Le complexe ainsi activé va aboutir à la transcription de gènes essentiels dans les métabolismes glucidiques et lipidiques, perturbés chez la plupart des diabétiques de type 2. Le rôle des PPAR γ s'exerce sur la différenciation des adipocytes avec induction de gènes tels que celui de la lipoprotéine lipase (LPL) (**Figure 5**). Ceci conduit à une lipolyse des triglycérides (TG) plasmatiques et leur stockage dans les adipocytes. Les TZD augmentent l'expression d'enzymes de stockage des AG dans l'adipocyte (glycérol kinase), réduisant la sécrétion d'AG par les adipocytes (**Tan, 2000**). Ces phénomènes contribuent à réduire les AGL et les TGC. La baisse des AGL entraîne au niveau du muscle un accroissement de la captation et de l'utilisation du glucose et au niveau du foie une réduction de la production du glucose (**Kendall, 2006 ; Halimi et al., 2008**).

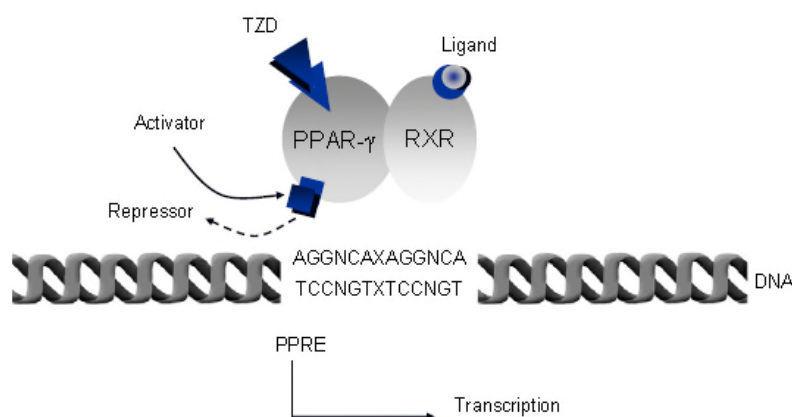


Figure 5 : Mécanisme d'action des thiazolidinediones (D'après **Elte et Blicklé, 2011**)

Sous l'effet des TZD, les adipocytes réduisent leur production de cytokines dont certaines participent de l'insulinorésistance et des états pro-inflammatoires (TNF α , IL6, leptine, résistine). L'administration de TZD induit une baisse de TNF α et de leptine (**Elte et Blicklé, 2011**). Parallèlement on note un accroissement des taux d'une protéine fortement exprimée dans le tissu adipeux qui est l'adiponectine (protéine insulinosensibilisatrice) dont des taux sont abaissés chez les diabétiques de type 2. L'adiponectine induit une meilleure oxydation des AG dans le muscle squelettique, la baisse de production de

glucose et de TG par le foie, la baisse de synthèse de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales, réduirait la réponse inflammatoire et le processus d'athérogénèse (**Miyazaki et al., 2002 ; Bays et al., 2004**).

1.6.3.2. Insulinosécréteurs

a) Sulfamides hypoglycémiant (SH ou Sulfonylurées)

Cette classe est la plus ancienne des agents antidiabétiques oraux. Les molécules de cette classe se caractérisent par la formule générale $R_1-SO_2-NH-CO-NHR_2$ où les radicaux R_1 et R_2 diffèrent d'après les médicaments (**Figure 6**). Les SH actuels se différencient, entre autres, par leur demi-vie plasmatique, leur durée d'action et leurs métabolites. Ils sont métabolisés par le foie et éliminés par les reins et /ou les voies biliaires (**Buysschaert, 2006**). Certains SH possèdent de longues durées d'action, augmentant le risque d'accumulation et l'hypoglycémie (**Perlmutter et al., 2000**).

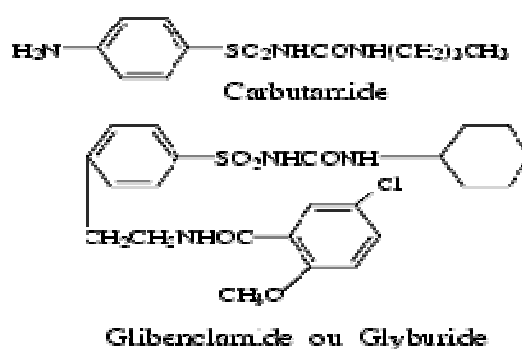


Figure 6 : Structure chimique de deux sulfamides hypoglycémiant; le glibenclamide et le carbutamide.

Les sulfonylurées agissent en se fixant sur le récepteur SUR 1 (Sulphonylurea Receptor) (site A et/ou B) lié aux sous unités protéiques du canal potassique (K^+) ATP sensible (Kir 6.2) des cellules β du pancréas. Ceci mène à la fermeture du canal potassique, un effet physiologique induit par l'augmentation du rapport d'ATP/ADP résultant du métabolisme du glucose. La réduction du flux de K^+ dépolarise la membrane des cellules β ayant pour résultat une ouverture des canaux calciques (Ca^{++}) voltage-dépendant. L'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{++} déclenche l'exocytose des granules de l'insuline. L'effet hypoglycémiant des sulfonylurées est rapide et efficace, et ils permettent une diminution absolue de 1 à 1.5% de HbA1c (**Virally et al., 2007**).

b) Glinides

Les glinides sont des molécules ayant un pouvoir hypoglycémiant proche de celui des sulfamides hypoglycémiant. La répaglinide est actuellement, le seul représentant de cette classe (**Figure 7**). Elle possède une action rapide et brève réduisant le risque hypoglycémique mais oblige à plusieurs prises quotidiennes (**Blicklé ,2003**). Les glinides sont des substances non-sulfonylurées. Comme les SH, ils se lient aux sites A et B du récepteur SUR 1 à la surface des cellules β du pancréas et stimulent, via une fermeture des canaux potassiques ATP sensible, un influx de calcium qui induit la libération de l'insuline (**Buysschaert, 2006**).

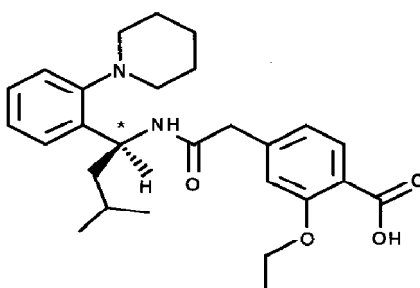


Figure 7 : Structure chimique de la répaglinide

1.6.3.3. Inhibiteurs des α -glucosidases

Les glucides sont dégradés par l'amylase salivaire et pancréatique en disaccharides (saccharose, lactose, maltose), puis en monosaccharides par les α -glucosidases intestinales (maltase, lactase, saccharase ou invertase) (**Bhartham et al., 2008**). Seuls les monosaccharides (glucose, galactose, fructose) peuvent franchir la barrière intestinale (**Laviolle, 2008**). Les inhibiteurs des α -glucosidases, comme l'acarbose (**Figure 8**), retardent ainsi l'absorption des glucides alimentaires conduisant à une réduction de l'hyperglycémie postprandiale (**Gimenez et al., 2002**). Cette classe contient également des molécules qui présentent divers effets secondaires, principalement, les flatulences, le ballonnement et la diarrhée (**Halimi et al., 2008**).

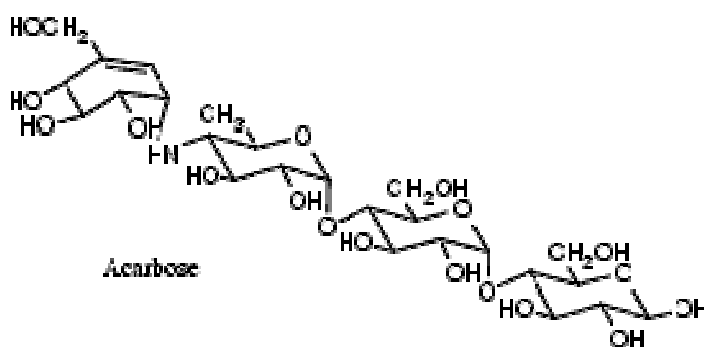


Figure 8 : Structure chimique de l'acarbose

1.6.3.4. Insulinothérapie

Le but primaire de l'insulinothérapie est d'optimiser la glycémie, réduisant de ce fait les complications à long terme du diabète **(Caballero, 2009)**. Généralement, le passage à l'insulinothérapie des diabétiques de type 2 se fait lorsqu'il y a un échec du traitement oral **(Halimi et al., 2006)**. Dans le diabète de type 2, le pancréas a tendance à réduire sa sécrétion de l'insuline au fil du temps. L'administration de l'insuline constitue, donc, un outil de traitement, utilisée en monothérapie ou en association avec les autres antidiabétiques oraux **(Blicklé, 2003)**.

Le timing de l'introduction de l'insuline dans le traitement du diabète type 2 est toujours discuté. Dans une étude chinoise, réalisée sur 382 patients chinois non obèses atteints de diabète type 2 récemment diagnostiqués, le traitement consistait en l'administration d'une manière intensive des antidiabétiques oraux ou de l'insuline jusqu'à l'obtention d'un taux normal de glycémie persistant pendant 2 semaines. Les traitements médicamenteux étaient alors arrêtés et les patients étaient suivis par le biais d'un régime alimentaire et d'exercices physiques. Dans une évaluation après un an, le nombre de patients en rémission s'avérait significativement plus grand dans le groupe de patients traités par l'insuline **(Weng et al., 2008)**.

a) Synthèse et sécrétion de l'insuline

L'insuline occupe une place cruciale dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. Les trois grands métabolismes (glucidique, lipidique, protéique) sont sous le contrôle de cette hormone, qui les oriente dans le sens de l'anabolisme et s'oppose aux effets cataboliques de nombreux autres facteurs **(Magnan et Ktorza 2005)**. L'insuline favorise la mise en réserve du glucose sous forme de glycogène dans le foie et dans le muscle, stimule le stockage des lipides dans le tissu adipeux blanc et contribue fortement à la rétention protéique dans tous les tissus. Ces effets résultent de la liaison de l'insuline à un récepteur membranaire spécifique exprimé principalement sur ses trois tissus cibles, le foie, le muscle et le tissu adipeux. Cependant, c'est dans le métabolisme glucidique que le rôle de l'insuline est le plus important **(Capeau, 2003)**.

L'insuline est le seul facteur hypoglycémiant. Le déficit insulinaire est à l'origine du diabète sucré. À l'opposé, sa surproduction ou sa sécrétion exagérée conduisent à des syndromes hypoglycémiques mettant en péril, à brève échéance, la survie des sujets qui en sont atteints **(Magnan et Ktorza 2005)**.

La séquence primaire en acides aminés de la molécule d'insuline a été établie en 1955 par le groupe de Sanger. L'insuline est un polypeptide de poids moléculaire d'environ 6 kDa. C'est un hétérodimère constitué de deux chaînes polypeptidiques, la chaîne A et la chaîne B, reliées entre elles par deux ponts disulfures. Dans la plupart des espèces, la chaîne A est constituée de 21 acides aminés et la chaîne B en comporte 30. Un pont disulfure intracaténaire relie les acides aminés 6 et 11 de la chaîne A (**Brown et al., 1955**). La structure primaire de l'insuline humaine et celles, très proches, de l'insuline porcine et de l'insuline bovine sont représentées sur la Figure 9.

Chaîne A

5 8 10 15 21

1 Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn 21

S S S

Ala Val

Chaîne B

5 10 15 20 25 30

1 Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe 30

Phe Tyr Thr Pro Lys

Ala Ala

Insuline bovine (blue box)

Insuline porcine (red box)

c) Synthèse de l'insuline

L'insuline est produite principalement par les cellules β des îlots de Langerhans pancréatique. Cependant, certaines études ont révélé que cette hormone pouvait bien être synthétisée par d'autres types de cellules : système nerveux (**Gerozissis, 2000**), le thymus (**Kojima, 2006**), les cellules du foie, de la rate et du tissu adipeux dans différents modèles animaux de diabète (**Suckale et Solimena, 2010**). Chez le rat, on retrouve dans les cellules β du pancréas environ 10 000 vésicules d'insuline, pouvant chacune contenir jusqu'à 2 milliards de molécules d'insuline, ce qui représente 10 à 20 % du volume cellulaire. Dans ces vésicules, l'insuline est stockée sous forme d'hexamères stabilisés par une molécule de calcium et deux ions de zinc (**Suckale et Solimena, 2010**).

Le gène de l'insuline est très conservé au cours de l'évolution. Chez la souris et le rat, on retrouve deux copies de ce gène, localisées sur le chromosome 1 chez le rat et sur les chromosomes 9 et 19 chez la souris. Chez l'Homme, il n'en existe qu'un exemplaire, de 1355 paires de bases, situé sur le bras court du chromosome 11. Sa région codante comporte 3 exons séparés par 2 introns (**Steiner et al., 1985; German et al., 1995; Magnan et Ktorza 2005**).

L'expression de gène de l'insuline permet la formation de la pré-proinsuline, polypeptide de 11,5 kDa. Ce polypeptide comporte sur son extrémité N-terminale une séquence signal de 25 acides aminés majoritairement hydrophobes, impliquée dans l'adressage de la pré-proinsuline vers le réticulum endoplasmique. Après sa translocation rapide dans la lumière du réticulum endoplasmique rugueux, la séquence signal est clivée conduisant à la formation de la pro-insuline. La pro-insuline est formée des deux chaînes A et B de l'insuline, reliées entre elles par le peptide-C qui assure le repliement de la molécule de pro-insuline et la formation de 3 ponts disulfures. Le rôle de ce peptide de 31 acides aminés serait de maintenir les ponts disulfures qui réunissent les chaînes A et B dans une position favorisant le clivage correct de la molécule lors des étapes ultérieures de la maturation (Figure 10) (**Portha, 2000; Suckale et Solimena 2010**).

La pro-insuline va ensuite subir plusieurs étapes de maturation avant de devenir la molécule d'insuline fonctionnelle. Après repliement et formation des ponts disulfures, la pro-insuline est transférée dans des vésicules revêtues de clathrine de l'appareil de Golgi. L'acidification de ces vésicules sécrétoires est due à une pompe à protons, active les enzymes protéolytiques prohormones convertases 1 et 2 et la carboxypeptidase. Ces enzymes clivent la proinsuline en insuline et peptide C ; sans activité biologique (**Portha, 2000 ; Moussard, 2005**). Des études menées sur des îlots isolés de rats ont montré que la

Les vésicules de sécrétion sont localisées dans la périphérie du cytoplasme et elles sont associées au cytosquelette. Environ 1 % des vésicules sont associées à la membrane selon un mécanisme dépendant du calcium, prêtes à fusionner (**Duman et Forte, 2003**). On pense qu'elles sont responsables de la première phase de sécrétion d'insuline (**Magnan et Ktorza, 2005**). L'association des vésicules à la membrane fait intervenir des SNARE localisés à la surface des vésicules (synaptobrévine et synaptotagmines 1 et 2) et la syntaxine, localisée sur la membrane plasmique. Le processus de cette association fait intervenir des Rab3 (protéine monomérique à activité GTPasique)(**Duman et Forte, 2003**). Lors d'une stimulation de l'exocytose, les vésicules deviennent « compétentes » vis-à-vis de la membrane plasmique. Cette étape est dépendante de l'ATP (**Duman et Forte, 2003**). La fusion à la membrane fait intervenir au moins deux protéines, NSF (qui a une activité ATPase) et la synaptotagmine (**Gerber et Sudhof, 2002**). Cette dernière est une protéine monomérique possédant un domaine transmembranaire et deux sites de liaison du calcium C2A et C2B (*protein kinase C-homology domains*).

L'augmentation de la conductance du calcium dans la cellule excitée induit l'activation de la synaptotagmine qui pourrait consécutivement se lier à NSF. Le complexe ainsi formé catalyserait la fusion des doubles couches lipidiques à l'interface de la vésicule et de la membrane plasmique (**Gerber et Sudhof, 2002**). Une protéine régulatrice trimérique, Go, empêcherait le processus d'exocytose lorsque la cellule β n'est pas stimulée. La Go est inactivée par l'augmentation de la concentration du Ca^{+2} (**Gerber et Sudhof, 2002**). La seconde phase de sécrétion d'insuline correspond à un nouvel accolement des vésicules de sécrétion et à leur conditionnement (**Magnan et Ktorza, 2005**). En moyenne, une dépolarisation induit l'exocytose de 700 vésicules par seconde (**Magnan et Ktorza, 2005**).

La sécrétion de l'insuline est soumise au contrôle de deux grands groupes d'agents stimulants : Les stimuli primaires ou déclencheurs, capables de déclencher à eux seuls la sécrétion d'insuline. Le glucose en est le principal agent. Les stimuli secondaires (ou potentialisateurs, ou amplificateurs) ; Ces derniers ne peuvent exercer d'effet stimulant direct sur la sécrétion. Ils amplifient l'effet d'un stimulus primaire (glucose) (**Magnan et Ktorza, 2005**). La figure 12 résume le contrôle de la sécrétion de l'insuline.

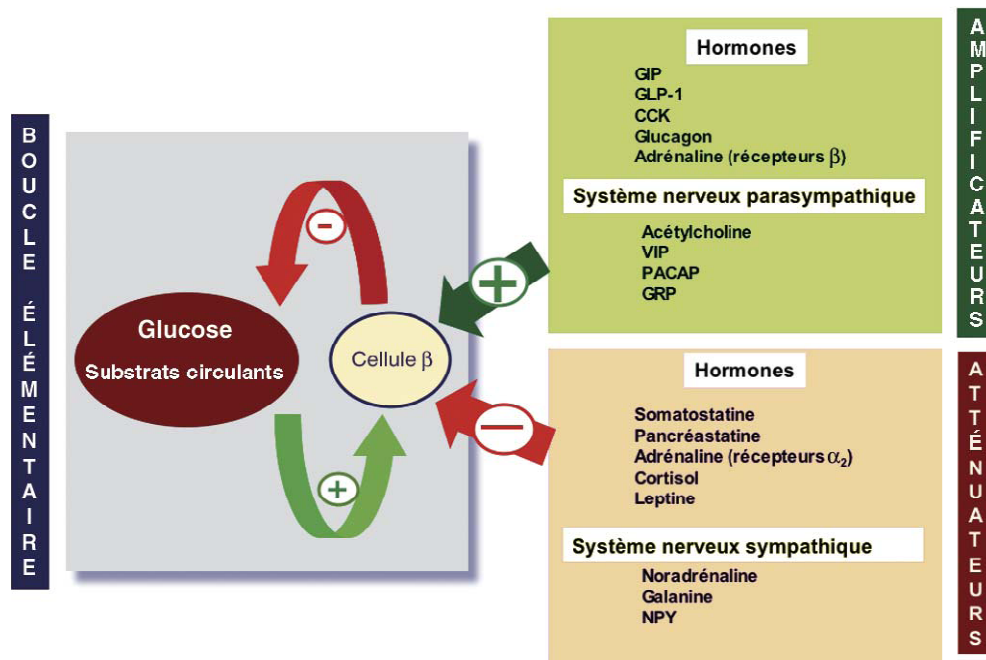


Figure 11: Principaux facteurs humoraux et nerveux de contrôle de la sécrétion d'insuline (D'après **Magnan et Ktorza, 2005**). PACAP : *pituitary adenylate cyclase activating polypeptide* ; VIP : *vasoactive intestinal peptide* ; GRP : *gastrin releasing peptide* ; GIP : *gastric inhibitory polypeptide* ; GLP-1 : *glucagon like peptide-1* ; CCK : *cholécystokinine* ; NPY : *neuropeptide Y*.

Grace au transporteur spécifique du glucose GLUT2 (non insulino-dépendant) (isoforme **GLUT-2 chez les rongeurs** et **GLUT-1 chez l'homme**), le glucose sera capté par ce dernier et subit la glycolyse qui sera à l'origine de la production de l'ATP qui provoque la fermeture des canaux K^+ ATP-dépendants. La diminution du flux de K^+ induit une dépolarisation membranaire qui provoque l'ouverture des canaux Ca^{++} voltage-dépendant. Les Ca^{++} entraînent l'exocytose des vésicules sécrétoires. Par ailleurs, la sécrétion de l'insuline est modulée par d'autres facteurs énergétiques tels que les acides gras, certains acides aminés comme la leucine ou l'arginine (**Moussard, 2005**).

e) Récepteur de l'insuline

Le récepteur à l'insuline appartient à la superfamille des récepteurs de facteurs de croissance possédant une activité tyrosine kinase dans leur domaine intracellulaire, dont fait partie le récepteur à l'insulin-like growth factor-1 (IGF-1R) (**Capeau, 2003**). Il existe sous deux isoformes, A et B, qui diffèrent respectivement par l'absence ou la présence d'une séquence de 12 résidus suite à l'épissage alternatif d'un exon du gène codant le récepteur à l'insuline (**Henri, 2011**). Le récepteur est formé de deux chaînes α extracellulaires reliées par des ponts disulfures à deux chaînes β transmembranaires

(Figure 12). Chaque chaîne α possède un domaine complet de liaison à l'hormone. La sous-unité β est constituée par un domaine transmembranaire (TM) hélicoïdal suivi d'un domaine juxtamembranaire (JM) contenant un domaine catalytique tyrosine kinase (TK) flanqué de deux régions régulatrices, la première impliquée dans l'internalisation du récepteur et dans la liaison à l'Insulin Receptor Substrate (IRS) 1-4 et SHc, la seconde contenant deux sites de fixation des phosphotyrosines (Youngren, 2007 ; Jensen, 2009 ; Henri, 2011).

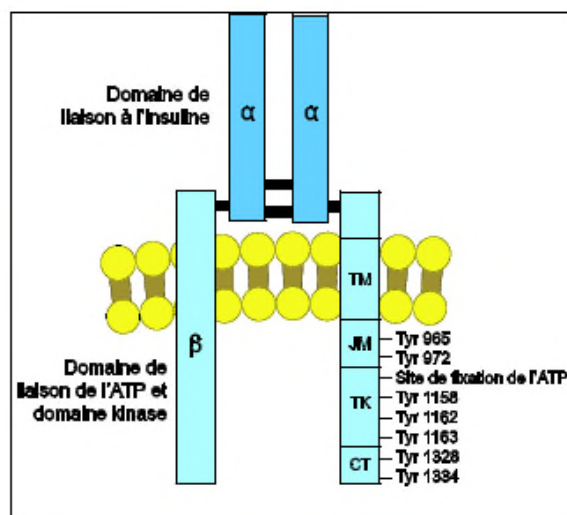


Figure 12 : Récepteur de L'insuline (D'après **Henri, 2011**). JM : domaine juxtamembranaire ; TK : domaine tyrosine kinase; CT : domaine C-terminal.

L'autophosphorylation du récepteur de l'insuline met en jeu sept résidus tyrosine. Les tyrosines Tyr965 et Tyr972 sont situées dans la région juxta-membranaire, les tyrosines Tyr1158, Tyr1162 et Tyr1163 sont localisées dans la boucle d'activation du domaine kinase et les tyrosines Tyr1328 et Tyr1334 sont proches du domaine C-terminal (Youngren, 2007).

En absence d'insuline, le domaine à activité tyrosine kinase possède une boucle régulatrice qui masque le site catalytique tyrosine kinase et le maintient à l'état inactif. Les sous-unités α exercent une contrainte inhibitrice et maintiennent le récepteur en configuration inactive (Youngren, 2007).

La fixation de l'insuline sur son récepteur conduit à un changement de conformation du récepteur qui permet l'approchement des deux sous-unités β et entraîne l'activation du récepteur par autophosphorylation. Celle-ci conduit à l'éloignement de la boucle régulatrice et laisse accès à l'ATP sur son site. Le domaine tyrosine kinase ainsi activé

permet la phosphorylation d'autres tyrosines de la sous unité β et de plusieurs protéines substrats telles que IRS et SHc (Jensen, 2009 ; Henri, 2011).

f) Voies de signalisation de L'insuline

Le récepteur de l'insuline est relié par l'intermédiaire de ses résidus tyrosines aux protéines IRS (*insulin receptor substrate*). Ces dernières sont localisées au niveau de la face cytosolique de la membrane plasmique par leur domaine PH (domaine d'homologie avec la pleckstrine) qui reconnaît probablement des phospholipides membranaires (Capeau, 2003). Par leur domaine PTB (*phosphotyrosine binding*), adjacent au domaine PH, les IRS se fixent sur la tyrosine 960 du récepteur de l'insuline (RI). La tyrosine 960 est alors phosphorylée par l'intermédiaire de leur domaine PTB (Capeau, 2003) (Figure 13).

L'extrémité C-terminale de la IRS, se trouve à proximité du domaine tyrosine kinase du RI, ce qui va induire la phosphorylation des résidus spécifiques qui se trouvent sur IRS. Les protéines IRS ainsi phosphorylées sont à leur tour reconnues par les domaines SH2 (*src homology 2*) de protéines relais (la sous-unité régulatrice de la phosphatidyl-inositol 3 (PI3) kinase, les protéines adaptatrices Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) et CrkII, la tyrosine-kinase Fyn et la phosphotyrosine phosphatase SHP2 (*SH2 domain protein tyrosine phosphatase-2*) (Rains, 2011).

A- La PI3 kinase, activée par IRS1 et 2, phosphoryle en position 3 les phosphoinositides membranaires, ce qui va permettre de créer des sites de reconnaissance pour d'autres kinases cellulaires telles que la protéine kinase B (PKB)/Akt et la PDK1/2 (*3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1/2*).

La PKB activée par phosphorylation va à son tour phosphoryler et activer d'autres relais intracellulaires impliqués en priorité dans les effets métaboliques de l'hormone : la glycogène synthase 3 kinase (GSK3)-b , la kinase p70rsk, le facteur 4E-BP1 (*4E binding protein 1*), la kinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*) (Capeau, 2003)

La voie PI3 kinase/PKB intervient également dans le contrôle négatif de l'expression génique: en phosphorylant les facteurs de transcription de la famille Forkhead, tels que FKHR. Elle permet ainsi leur rétention dans le cytosol et les empêche d'activer, au niveau nucléaire, leurs gènes cibles tels que celui de l'enzyme clé de la néoglucogenèse, la phosphoénolpyruvate carboxykinase (Rains, 2011).

Par la voie PKB, l'insuline exerce un effet anti-apoptotique en phosphorylant et inhibant le facteur pro-apoptotique Bad (Raith et Zick, 2001 ; White, 2002).

B- L'activation de la voie MAP kinase se déroule en partant du récepteur d'insuline, selon deux voies (**Raith et Zick, 2001 ; White, 2002**) : a) via les protéines IRS, la liaison de l'adaptateur Grb2 sur des phosphotyrosines spécifiques permet d'activer le facteur d'échange nucléotidique SOS (*son of sevenless*) qui active la petite protéine G Ras dans la membrane plasmique en stimulant l'échange du GDP contre le GTP. Ras active la kinase Raf, qui phosphoryle alors et active la MAP kinase (MEK) responsable de l'activation par phosphorylation des deux MAP kinases, ERK1 et 2 (*extracellular signal-regulated kinase*). Celles-ci vont activer la kinase p90rsk impliquée dans la synthèse protéique et vont entrer dans le noyau afin de phosphoryler et activer des facteurs de transcription tels que p62TCF impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire. b) Une deuxième possibilité de mise en route de la voie MAP kinase mis en jeu la tyrosine 960 les protéines adaptatrices de la famille SHC (*src homologous and collagen protein*) , elles-mêmes reconnues par la protéine Grb2 activant la voie Ras (**Capeau , 2003**).

Enfin, la régulation de l'action de l'insuline passe par la dégradation de l'insuline : le complexe ligand-récepteur est internalisé et transporté vers les lysosomes où l'insuline est dégradée et les récepteurs sont recyclés (**Carpentier, 1994**).

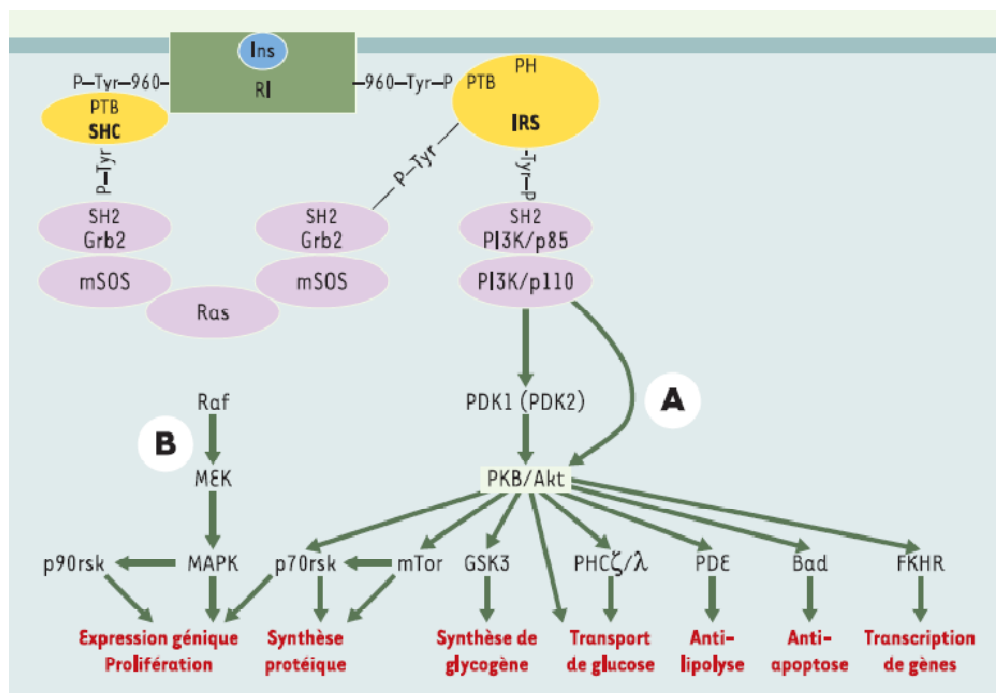


Figure13 : Voies de signalisation du récepteur de l'insuline (D'après **Capeau, 2003**)

g) Effets métaboliques de l'insuline

L'insuline a une action hypoglycémiante. Elle agit en favorisant la captation de nutriments (glucose, acides gras, acides aminés) par les cellules, en accélérant leur transformation en

macromolécules de stockage (glycogène, triglycérides, protéines), et en freinant le catabolisme de ces macromolécules (**Moussard, 2005**).

- **Effet sur le transport du glucose**

Dans les cellules sensibles à l'action de l'insuline, les GLUT4 sont mobilisées sous l'action de l'insuline (**Bogan, 2003**). Dans les cellules squelettiques humaines, En présence de l'insuline, le taux des GLUT4 au niveau de la membrane plasmique est d'environ 42%. Le nombre de ces perméases dans la membrane n'est que de 13%, dans les conditions basales (**Stuart, 2009**). L'insuline permet aussi l'augmentation du nombre des GLUT12 dans la membrane plasmique. Cependant, elle ne modifie pas le nombre des GLUT1 au niveau membranaire (**Stuart, 2009**)

Dans le foie, l'insuline active la glycogénogenèse en activant la glycogène synthétase et en inhibant la glycogène phosphorylase. De plus, l'insuline freine la glycogénolyse et favorise la glycolyse en stimulant la synthèse de l'hexokinase (HK), phosphofructokinase et pyruvate kinase. En même temps, l'insuline ralentit la néoglucogenèse en réprimant la synthèse des enzymes clés, la phosphoénolpyruvate carboxykinase, ainsi que la fructose 1,6 biphosphatase et la G6Pase (**Perlemuter et al., 2000 ; Saltiel, 2001**).

Il faut noter également que les transporteurs membranaires de glucose GLUT2 étant non insulino-dépendant, l'entrée du glucose dans l'hépatocyte via ces transporteurs n'est pas contrôlée par l'insuline. Ces transporteurs sont activés lors de l'élévation de la glycémie en période postprandiale (**Perlemuter et al., 2000**).

- **Effet sur le tissu adipeux**

L'insuline active la lipogenèse en stimulant la synthèse des enzymes de synthèse des lipides, acétyl CoA carboxylase. Dans le muscle lisse, le cœur et le foie, elle réduit la captation des acides gras libres (AGL). Dans le tissu adipeux, elle bloque la libération de la lipoprotéine Kinase qui, dans le sang, hydrolyse les triglycérides (**Saltiel, 2001 ; Moussard, 2005**).

- **Effet sur le métabolisme des acides aminés**

L'insuline agit aussi sur le métabolisme des acides aminés (**Proud, 2006**). Il a été démontré que l'insuline stimule la captation des acides aminés via la membrane plasmique. Elle agit aussi sur la synthèse protéique en stimulant la transcription et la traduction suite à son action sur la voie PI3Kinase (**Proud, 2006 ; Henri, 2011**).

- Effet sur le système cardiovasculaire

Parmi les actions de l'insuline, on note son effet sur le système cardiovasculaire. En effet, l'insuline a un effet vasocontractile (**Muniyappa, 2007**). L'action sur la vasodilatation de l'insuline est médiée par la voie de signalisation de la PI3K, qui régule l'expression de l'eNOS (Endothelial nitric oxide synthase) dans l'endothélium vasculaire. Des doses supraphysiologiques d'insuline, par exemple lors d'un clamp eulycémique hyperinsulinémique, modulent la vasodilatation dans le muscle squelettique en agissant sur la synthèse de NO. Par ailleurs, l'insuline diminue la contractilité des cellules musculaires lisses en régulant la concentration en calcium cytosolique. Inversement, l'insuline intervient dans la vasoconstriction des vaisseaux périphériques en stimulant l'activité du système nerveux sympathique (**Muniyappa, 2007; Henri, 2011**).

2. Phytothérapie

Selon l'organisation mondiale de la santé, la médecine traditionnelle est un terme global utilisé pour décrire à la fois les thérapies non médicamenteuses qui sont administrées principalement sans usage de médicaments, comme dans le cas de l'acupuncture, des thérapies manuelles et des thérapies spirituelles et les systèmes de médecine traditionnelle qui comportent diverses formes de médecine indigène. Cette médecine implique l'usage de médicaments à base de plantes, parties d'animaux et/ou minéraux ...etc. Ces médecines sont souvent appelées médecines « complémentaires », « alternatives » ou « non conventionnelles » (**OMS, 2002**).

La phytothérapie consiste, donc, en le traitement des maladies par des plantes à propriétés thérapeutiques (plantes médicinales). Ces plantes ont été considérées comme des remèdes pour soulager les troubles physiologiques des personnes durant des siècles (**Bézanger-Beauquesne et al., 1986**). Les plantes médicinales sont une source inépuisable de substances biochimiques susceptibles de procurer des effets curatifs appréciables (**Eddouks et al., 2007**). Plus de 11% des 252 médicaments, considérés comme essentiels par l'OMS, sont exclusivement produits à partir de plantes médicinales (**Rates, 2001**). Ces plantes médicinales trouvent toujours leurs places et indications thérapeutiques dans le traitement de nombreuses maladies y compris dans le monde occidental (**Eisenberg et al., 1993 ; De Smet, 2002**). Ceci est du certainement à l'échec dans plusieurs cas des traitements pharmaceutiques conventionnels, en particulier dans le traitement des pathologies chroniques et aux fortes incidences des effets secondaires des produits pharmaceutiques. Dans les pays en voie de développement, l'insuffisance des

infrastructures sanitaires renforcent la demande et l'utilisation des de la médecine naturelle, complémentaire ou parallèle pour se soigner (**Eddouks et al., 2007**).

2.1. Phytothérapie et diabète

Depuis l'antiquité, on a traité le diabète par des plantes médicinales. Le traitement traditionnelle de cette maladie était centré sur le traitement de ses symptômes telles que la soif et la polyurie (**Bailey et Day, 1989 ; Eddouks et al., 2002 ; Grover et al., 2002**). Des études menées dans les années 80 et 90 ont indiqué que plus de 1200 espèces végétales, soit plus de 725 genres appartenant à 183 familles, sont utilisées pour leurs propriétés hypoglycémiantes et anti-hyperglycémiantes (**Bailey et Day, 1989 ; Marles et Farnsworth, 1995**). L'étude menée par Marles et Farnsworth en 1995, a montré aussi que les investigations ethnopharmacologiques ont été centrées sur la validation expérimentale des propriétés curatives, traditionnellement attribuées à ces remèdes. Dans 81 % des cas, les indications traditionnelles de plantes antidiabétiques ont été expérimentalement confirmées (**Marles et Farnsworth, 1995**). Certaines de ces plantes, dont l'activité pharmacologique a été confirmée sur des modèles animaux, ont également fait l'objet de plusieurs études cliniques. Pour plusieurs plantes, les composés actifs responsables de l'activité pharmacologique ont été identifiés et isolés et les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les effets thérapeutiques ont été partiellement ou complètement élucidés (**Ernest, 1997; Eddouks et al., 2007**). Actuellement, d'autres plantes et molécules actives font l'objet de plusieurs études.

2.2. Plantes médicinales utilisées dans le traitement du diabète du type 2

Plus de 75% des diabétiques de type 2 utilisent les plantes médicinales en association avec les médicaments synthétiques. Alors que 10% uniquement des diabétiques de type 1 utilisent les plantes médicinales combinées avec le traitement par l'insuline (**Eddouks et al., 2002**). Malgré le développement considérable dans la recherche de nouvelles molécules à effet hypoglycémiant, la découverte d'un produit de remplacement botanique pour l'insuline semble peu probable, mais les traitements traditionnels peuvent fournir des indices valables pour le développement de nouveaux agents hypoglycémiantes oraux à partir de plantes (**Bailey et Day, 1984**). Parmi ces plantes on cite les plus employées mais aussi les plus étudiées :

- a) ***Olea europea*** : l'olivier, *Olea europea*, est de la famille des Oléacées. L'arbre d'olivier est typiquement méditerranéen. Il se caractérise par un fruit; l'olive, dont l'huile est une composante essentielle. La feuille d'olivier est riche en triterpènes

tel l'acide oléanolique, flavonoïdes, sécoiridoïdes dont l'oleuropéoside, et en acides phénoliques (**Ghedira, 2008**). L'utilisation de la feuille de l'olivier contre le diabète a été confirmée expérimentalement chez l'animal ou l'extrait des feuilles inhibe l'hyperglycémie et le stress oxydatif chez les sujets diabétiques. (**Ferhi et al., 1994**). Ces effets sont dus aux composés l'oleuropéoside et l'acide oléanolique présents dans les extraits (**Goetz, 2007**). L'oleuropéoside (**Figure 15**) exerce une activité hypoglycémiant et antioxydante et réduit ainsi les complications du diabète (**Gonzalez et al., 1992, Satoa et al., 2007**). L'effet hypoglycémiant pourrait s'expliquer par une amélioration de la sécrétion de l'insuline ou bien par une augmentation du transport périphérique du glucose. L'action antioxydante est exercée notamment vis-à-vis de l'oxydation des LDL-cholestérols qui sont à l'origine de l'altération des tissus vasculaires au niveau des artères et, de ce fait, de l'athérosclérose (**Ghedira, 2008**).

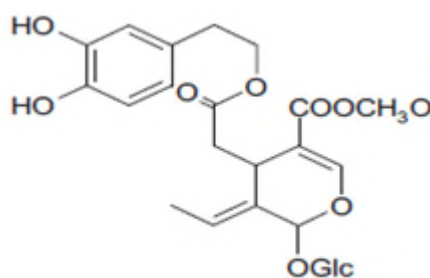


Figure 14 : Structure chimique de l'oleuropéoside.

L'acide oléanolique est un triterpène (**Figure 16**) agoniste du récepteur TGR5. Son action est équivalente à celle des acides biliaires (**Satoa et al., 2007**). Il permet l'augmentation de l'utilisation du glucose au niveau mitochondrial et la sensibilité à l'insuline (**Satoa et al., 2007**).

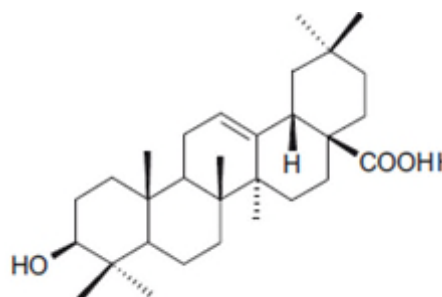


Figure 15 : Structure chimique de l'acide oléanolique.

En plus de ces deux composés, l'huile d'olive est recommandée pour le traitement de différentes pathologies dans lesquelles la fonction pancréatique est altérée, notamment l'insuffisance pancréatique (**Ghedira, 2008**).

- b) ***Eugenia jambolana*** : Cette plante appartient à la famille des myrtacées. Elle est connue, dans la médecine traditionnelle, par ses activités antidiabétiques. Les graines d'*Eugenia jambolana* sont riches en alcaloïdes, flavonoïdes, saponines et en terpènes (**Eddouks et al., 2007**).
- c) ***Trigonella foenum-graecum*** : Le fenugrec, *Trigonella foenum-graecum*, fait partie de la famille des Fabacées. Elles sont cultivées principalement en Asie, dans les régions méditerranéennes et en Afrique du nord. Les composantes essentielles de l'extrait des graines du fenugrec sont les alcaloïdes (trigonelline), les flavonoïdes, les acides aminés (4 hydroxyisoleucine, arginine, tryptophane) et les oligo-éléments (**Anwar et al., 2011**). Les résultats de certaines études, réalisées *in vivo* afin d'évaluer les effets de l'extrait des graines de fenugrec, montrent d'une part que la trigonelline inhibe l'absorption intestinale du glucose et que le 4-hydroxyisoleucine améliore la sécrétion de l'insuline (**Eidi et al., 2007**) et d'une autre part, l'administration de l'extrait des graines de fenugrec à des rats diabétiques entraîne une diminution significative de polydipsie, de polyurie, de glycosurie et de l'hyperglycémie (**Eidi et al., 2007**). L'extrait présente aussi un effet néphroprotecteur pendant le diabète (**Shetty et Salimath, 2009**).
- d) ***Allium sativum*** : Cette plante potagère qu'on appelle l'ail, *Allium sativum*, appartient à la famille des Alliacees. L'ail contient des composés soufrés (allicine) qui sont responsables de la majorité de leurs propriétés pharmacologiques (**Abena et Willem, 2004**). Les travaux de Chandra et ses collaborateurs (2007), ont permis de traiter 3 groupes de rats diabétiques par l'insuline, le gibenclamide, un hypoglycémiant oral insulinosécréteur, et par l'extrait d'ail. L'analyse du sérum sanguin de ces rats a révélé une diminution du taux de la glycémie et une augmentation du taux de l'insuline pour les 3 groupes de rats, ainsi qu'une augmentation de l'expression des enzymes à activité antioxydante (catalase, glutathion réductase, glutathion peroxydase et superoxide dismutase) pour le groupe de rat traité par l'extrait d'*Allium sativum*. Les résultats de cette expérience montrent que l'extrait d'ail exerce un effet antidiabétique en augmentant la synthèse de l'insuline par les cellules β pancréatiques. Le mécanisme de ce

processus n'est pas encore connu. D'une autre part, il a été noté qu'il y avait une réduction des complications diabétiques par l'action des enzymes antioxydantes sur les espèces oxygénés (**Chandra et al., 2007**).

- e) ***Allium cepa*** : l'*Allium cepa* ou l'oignon fait partie de la famille des Alliacees et couramment utilisé en médecine traditionnelle pour combattre de nombreuses infections (**Ye et al., 2013**), réduire le taux de cholestérol (**Kumari et Augusti, 2007**) et contre le diabète (**Eidi et al., 2006 ; Badol et al., 2013**). L'oignon renferme de la vitamine C, du soufre et des sels minéraux (dont un taux intéressant de K) (**Chop et Terry, 2009**). Il contient également des flavonoïdes aux propriétés antioxydantes comme la quercétine et des composés protidiques dont des acides aminés soufrés (principalement des acides aminés cystéine-sulfoxyde) (**Suzuki et al., 2013**). Les propriétés hypoglycémiantes de l'oignon ont été mises en évidence chez l'animal et chez l'homme (**Sateesh et al., 2013**). L'oignon présente également des effets bénéfiques sur certaines complications ou troubles associés au diabète tel que l'hypercholestérolémie et les risques cardiovasculaires (**Mukhurjee, 2003**).
- f) ***Enicostemma littorale* Blume** : cette plante est utilisée en Inde dans plusieurs traitements. Elle est également employée comme agent antidiabétique (**Atta-ur-Rahman et Zaman, 1989**). Des études ont été réalisées en traitant des rats diabétiques par l'extrait aqueux d'*Enicostemma littorale* Blume. Les résultats ont montré une diminution du taux de glucose sanguin, du taux d'HbA1c et de l'activité de l'enzyme G6Pase du foie, ainsi qu'une augmentation du niveau de l'insuline (**Marro et al., 2003**). L'incubation, *in vitro* des îlots de Langerhans avec l'extrait aqueux de cette plante a engendré l'augmentation de la sécrétion de l'insuline (**Marro et al., 2003**). L'effet hypoglycémiant d'*Enicostemma littorale* Blume est dû, d'une part, à la stimulation de la sécrétion de l'insuline et d'une autre part à la diminution de la production hépatique de glucose par l'inhibition de l'enzyme G6Pase (**Marro et al., 2003**).
- g) ***Globularia alypum*** : la globulaire, *Globularia alypum*, de la famille des Globulariacees, est utilisée par les diabétiques pour ses effets hypoglycémiantes (**Eddouks et al., 2002**). L'administration par voie orale de l'extrait aqueux des feuilles de la globulaire aux rats diabétiques a montré une augmentation de la concentration plasmatique de l'insuline. De ce fait, le mécanisme d'activité

possible de globulaire est d'inciter les cellules β du pancréas à augmenter la synthèse de l'insuline (**Jouad et al., 2002**).

- h) *Salvia officinalis* :** la sauge, *Salvia officinalis*, de la famille des Lamiacées, a été utilisée dans la phytothérapie traditionnelle contre une série de maladies parmi elles le diabète (**Alarcon-Aguilar et al., 2002**). L'administration par voie orale de l'extrait des feuilles de la sauge aux rats diabétiques a montré une diminution significative du taux de glucose, des triglycérides, de l'urée, de l'acide urique et de la créatinine, ainsi qu'une augmentation du taux de l'insuline dans le sérum (**Pam et Saravanan, 2002**). L'augmentation du niveau de l'insuline pourrait être due à une substance présente dans l'extrait qui stimule la sécrétion de l'insuline ou qui protège les cellules β contre les détériorations et les maintiennent actives pour produire de l'insuline (**Szkudelski, 2001**). Ce composé pourrait être responsable de la réduction l'hyperglycémie et de l'activation de la lipase (**Eidi et Eidi, 2005**). Cette dernière action permis l'hydrolyse des triglycérides en acides gras qui seront captés par les adipocytes, réduisant de ce fait l'hypertriglycéridémie (**Eidi et Eidi, 2009**). La réduction de l'urée, de l'acide urique et de la créatinine témoigne de l'effet positif de l'extrait sur le fonctionnement rénal (**Eidi et Eidi, 2009**).
- i) *Vaccinium angustifolium* :** la myrtille, *Vaccinium angustifolium*, de la famille des Ericacées est utilisée pour son effet antidiabétique (**Blumenthal et al., 1998 ; Chambers et al., 2003 ; Martineau et al., 2006**). Les extraits de plusieurs parties de cette plante possèdent une teneur peu importante en flavonoïdes alors que les fruits présentent une teneur élevée en ces composés, notamment en anthocyanines (**Grace et al., 2009**). Dans une étude intéressante, l'effet hypoglycémiant de l'extrait enrichi en flavonoides a été évalué en administrant chez des rats rendus diabétiques par la streptozotocine. L'effet est comparé à celui obtenu par l'administration d'une préparation artificielle d'anthocyanines constituée de malvidine-3-O-glucoside et delphinidine-3-O-glucosidene. Ceci a permis de constater que l'extrait de fruits avait un effet hypoglycémiant significatif comparable à celui obtenu par la préparation d'anthocyanine. L'administration individuelle des deux substances (malvidine-3-O-glucoside et delphinidine-3-O-glucoside) à deux groupes de rats diabétiques différents a révélé que la malvidine-3-O-glucoside (**Figure 17**) était significativement hypoglycémiant alors que la delphinidine-3-O-glucoside ne l'était pas (**Grace et al., 2009**). L'analyse du

contenu de l'extrait par HPLC et MS/MS a montré la présence de la malvidine-3-O-glucoside en concentration importante. De ce fait, l'activité hypoglycémiant de la myrtille serait due à la malvidine-3-O-glucoside, mais son propre mécanisme d'action n'est pas encore élucidé (Grace et al., 2009).

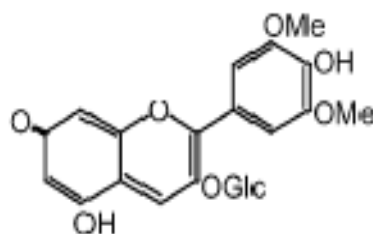


Figure 16 : Structure chimique de la malvidine-3-O-glucoside.

- j) ***Galega officinalis*** : le galéga, *Galega officinalis*, de la famille des Fabacées, est intéressant dans le traitement du diabète. Il est connu aujourd'hui que *Galega officinalis* est une source naturelle des guanidines précurseurs de la synthèse de la metformine (Goetz et Le Jeune, 2008). Le galéga est riche en galégine (isoamylène guanidine), un alcaloïde, qui diminue fortement le taux de glucose dans le sang, augmente la production de l'insuline par le pancréas et active la lipogenèse (Goetz, 2007).
- k) ***Costus speciosus*** : cette plante appartient à la famille des Costacées, employée couramment dans la médecine indienne pour traiter divers maladies y compris le diabète (Daisy et al., 2008). L'extrait de la racine de *Costus speciosus* est riche en un composé sesquiterpénique, l'Eremanthine (C₁₅H₂₀O₂) (Figure 18) (Eliza et al., 2009). L'administration par voie orale de ce composé a diminué de manière significative le taux de glucose, de l'HbA1c, du cholestérol total, d'LDL-cholestérol, des triglycérides et, au même temps, il a augmenté le taux de l'insuline plasmatique, le glycogène dans les tissus et l'HDL-cholestérol (Eliza et al., 2009). Il a été suggéré que l'Eremanthine pourrait exercer l'effet similaire à celui de l'insuline, en favorisant le captage du glucose par les tissus périphériques et en empêchant la gluconéogenèse hépatique ou par stimulation de la sécrétion de l'insuline par les cellules β du pancréas (Ali et al., 1993; Gray et al., 2000).

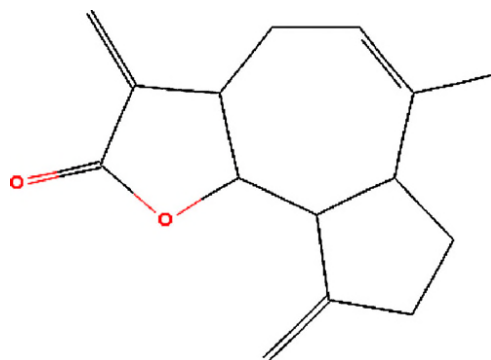


Figure 17 : Structure chimique de l'Eremanthine.

- l) *Ajuga iva* :** l'ivette, *Ajuga iva*, fait partie de la famille des Lamiacées. L'analyse de l'extrait aqueux de cette plante a indiqué que les flavonoïdes en sont les constituants principaux et qui pourraient être responsables de l'effet hypoglycémiant (**Bennaghmouch et al., 2002 ; Taleb-Senouci et al., 2009**). L'administration de l'extrait d'*Ajuga iva* à des rats diabétiques a produit une diminution significative du taux de glucose mais sans aucune modification de la concentration en insuline plasmatique (**Taleb-Senouci et al., 2009**). Il a été suggéré que l'extrait de l'ivette pourrait mimer le mécanisme principal de l'insuline en augmentant l'utilisation périphérique du glucose (**El Hilaly et Lyoussi, 2002**).
- m) *Momordica charantia* :** le concombre amer, *Momordica charantia*, appartient à la famille des cucurbitacées. L'extrait de cette plante contient des composantes possédant des propriétés hypoglycémiantes telles que l'acide oléanolique 3-O-glucuronide et la momordine (**Grover et al., 2002**). L'extrait de la *Momordica charantia* augmente de manière significative la sensibilité à l'insuline et réduit l'hyperglycémie. Les chercheurs ont suggéré que le concombre amer exerce des effets semblables aux sensibilisateurs conventionnels de l'insuline (exemple les TZDs), qui agissent en tant qu'agoniste de PPAR γ qui régulent les gènes impliqués dans le métabolisme des glucides (**Maggs et al., 1998 ; Saleh et al., 1999**). Ils ont démontré aussi que l'administration de l'extrait de cette plante réduit l'expression de la leptine et améliore l'expression de l'adiponectine (**Maeda et al., 2001**). Le concombre amer augmente également le nombre des GLUT4 sur la surface des cellules, favorisant ainsi l'absorption du glucose dans le tissu périphérique, en particulier le muscle squelettique d'où une amélioration de la sensibilité à l'insuline (**Klip et al., 1994 ; Wang et al., 1999**). Il a été suggéré que cette plante pourrait

être un autre candidat pour la protection contre le diabète de type 2 (**Shih et al., 2009**).

- n) *Nigella sativa* :** *Nigella sativa* appartient à la famille des Ranunculacées. Elle est réputée pour ses vertus thérapeutiques diverses et les graines sont la partie utilisée (**Ahmed et al., 2013**). L'effet hypoglycémiant de *Nigella sativa* a fait l'objet de nombreuses études dans lesquelles différents extraits ont été testés et plusieurs mécanismes selon lesquels ces extraits agissent ont été dévoilés. A titre d'exemple, L'extrait aqueux, l'huile et la thymoquinone, composé majoritaire de l'huile essentielle des graines de *Nigella sativa*, admis à des rats rendus diabétiques par la streptozotocine, permettent de réduire significativement la glycémie et d'augmenter d'une manière significative l'insulinémie (**Abdelmeguid et al., 2010**). Dans une autre étude, on a démontré que l'extrait ethanolique de *Nigella sativa* normalise la glycémie chez des Mériones de shaw diabétiques et ce par l'amélioration de la sensibilité à l'insuline (**Benhaddou-Andaloussi et al., 2011**) le mécanisme impliqué est l'activation de la phosphorylation de ACC (Acetyl CoA Carboxylase) , constituant majeur de la voie de signalisation de l'insuline indépendant de la l'AMPK (**Benhaddou-Andaloussi et al., 2011**). Les GLUT4 musculaires semblent être aussi activés par l'extrait ethanolique des graine de *Nigella sativa* (**Benhaddou-Andaloussi et al., 2011**). Selon Meddah et ses collaborateurs, l'extrait aqueux a un effet hypoglycémiant post-prandiale (**Meddah et al., 2009**).

- o) Autres plantes:** Le tableau 2 présente d'autres plantes ayant un effet Hypoglycémiant.

Tableau 2 : Autres plantes utilisées pour le traitement du diabète de type 2.

Nom scientifique	Nom commun	famille	Partie utilisée	Référence
<i>Capparis spinosa</i>	Câpres	Capparidacées	Fruits	Eddouks et al., 2004.
<i>Origanum vulgare</i>	Origan	Lamiacées	Feuilles	Lemhadri et al., 2004.
<i>Artemisia herba-alba</i>	Armoise	Composées	Parties aériennes	Eddouks et al., 2007.
<i>Zingiber officinale</i>	blanche	Zingibéracées	Rhizomes	Eddouks et al., 2007.
<i>Juglans regia</i>	Gingembre	Juglandacées	Feuilles et écorces	Valnet, 1992.
<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalyptus	Myrtacées	Feuilles et fleurs	Grover et al., 2002.
<i>Fumaria officinalis</i>	Fumeterre	Fumariacées	Racines	Djerroumi et Nacef, 2004.
<i>Ruta graveolens</i>	Rue	Rutacées	Parties aériennes	Djerroumi et Nacef, 2004.
<i>Ziziphus mauritiana</i>	Jujubier	Rhamnacées	Feuilles	Diallo et al., 2004.
<i>Bergenia ciliata</i>	Bergénie	Saxifragacées	Rhizome	Bhandari et al., 2008.
<i>Berberis aristata</i>	Berbéris	Berbéridacées	Racine	Singh et Kakkar, 2009.

2.3. Substances végétales susceptibles d'agir sur le diabète de type 2

a) Neferine ($C_{38}H_{44}N_2O_6$) : La neferine est un alcaloïde (**Figure 19**) isolé des graines de *Nelumbo nucifera Gaertn.* La neferine, comparée à la rosiglitazone, montre une efficacité semblable vis-à-vis de l'amélioration de la sensibilité à l'insuline (**Pan et al., 2009**). L'administration de la neferine entraîne une diminution du taux de glucose, de triglycérides et de $TNF\alpha$ dans le sang et une augmentation de la synthèse de l'insuline. Le mécanisme fondamental par lequel la neferine réduit la résistance à l'insuline est dû à l'activation du récepteur $PPAR\gamma$ et à la stimulation de la sécrétion de l'insuline par les îlots de Langerhans (**Pan et al., 2009**).

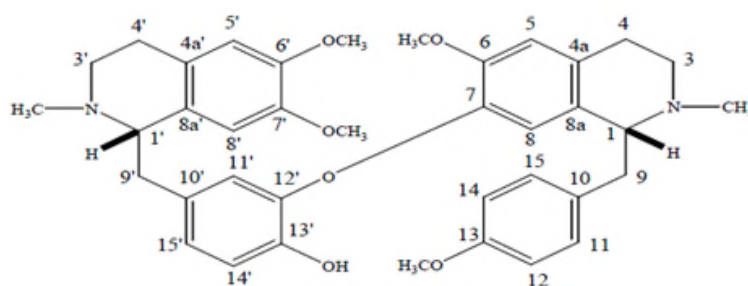


Figure 18: Structure moléculaire de la neferine.

b) Les composés phénoliques : des acides phénoliques diététiques, tels que l'acide chlorogénique, l'acide cafféique, l'acide catéchique, les tannins et l'acide gallique, réduisent l'absorption du glucose intestinale en favorisant la dissipation du gradient électrochimique de Na^+ qui fournit l'énergie d'entraînement nécessaire pour le transport du glucose (**Kobayashi et al., 2000, Kwon et al., 2007**). L'écaïlle des graines de millet contiennent un mélange complexe de plusieurs composés phénoliques, appartenant à différentes classes, inhibiteurs non-compétitifs des enzymes d'hydrolyse des glucides (α -glucosidases et α -amylase) (**Shobana et al., 2009**). Elle Permet de ce fait de retarder l'absorption intestinale du glucose et mène à la suppression de l'augmentation postprandiale du glucose sanguin (**Shobana et al., 2009**).

En 2007, des chercheurs américains ont étudié l'effet des flavonoïdes sur les transporteurs du glucose et du fructose au niveau de l'intestin grêle (**Kwon et al., 2007**). Ces transporteurs sont les GLUT2 (transporteurs du glucose et du fructose), les GLUT5 (transporteurs du fructose seulement) et les SGLT1 (co-transporteur Na^+ /glucose; qui transportent le glucose seulement). Ces transporteurs ont été exprimés sur la membrane des oocytes des xenopus et c'en y injectant les ARNm de ces transporteurs. Les oocytes ont été, par la suite, traités avec des flavonoïdes (quercétine, rutine, isoquercitrine, et

spiraeoside). Les résultats ont montré une inhibition importante de l'absorption du glucose et du fructose pour les oocytes traités avec la quercétine (quercétine ou quercétine glycosylée) (Kwon et al., 2007). La quercétine, comparée aux autres flavonoïdes testés dans cette étude, est le flavonoïde le plus actif. Elle inhibe le transport des deux sucres : le glucose et le fructose (Kwon et al., 2007). Dans d'autres études aussi, il a été démontré que la quercétine diminue sensiblement l'absorption intestinale du glucose (Song et al., 2002, Cermak et al., 2004).

En plus de l'inhibition des GLUT2 de la surface apicale de l'intestin par la quercétine, il est possible que cette dernière soit transportée via les anthérocytes, inhibe aussi les GLUT2 du niveau basale, réduisant ainsi l'arrivée du glucose et du fructose transportés par les GLUT5 et les SGLT1 au niveau apicale vers la circulation sanguine (Kwon et al., 2007, Johnston et al., 2005). L'absorption du glucose et de la quercétine par ces oocytes serait selon des mécanismes différents : le transporteur de la quercétine n'est pas le GLUT2. Cette dernière inhibe de façon non compétitive les GLUT2. La figure 20 résume l'effet de la quercétine ou la quercétine glycosylée dont leurs transporteurs sont encore non connus (Kwon et al., 2007).

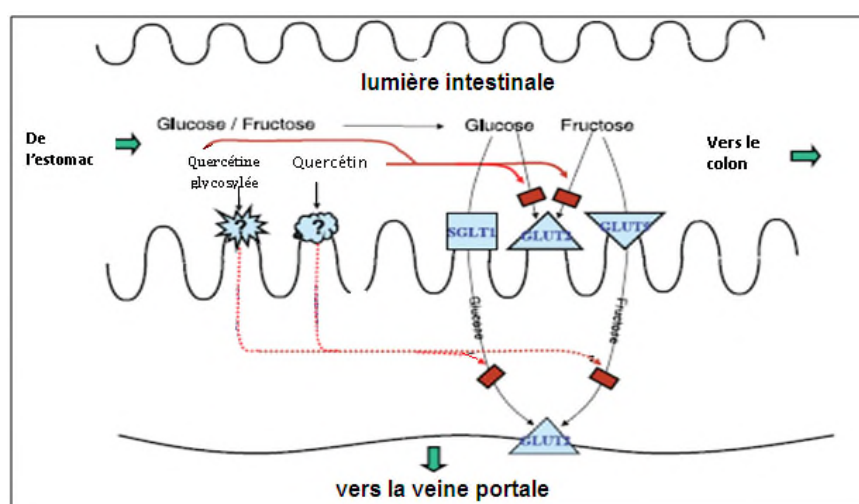


Figure 19 : Inhibition de l'absorption intestinale du glucose et du fructose sous l'effet de la quercétine sur les GLUT2 (D'après Kwon et al., 2007).

c) Flavonoïdes : les flavonoïdes dont la rutine et la quercétine (Figure 22), sont les molécules qui présentent des effets antidiabétiques intéressants (Prasath et Subramanian, 2001).

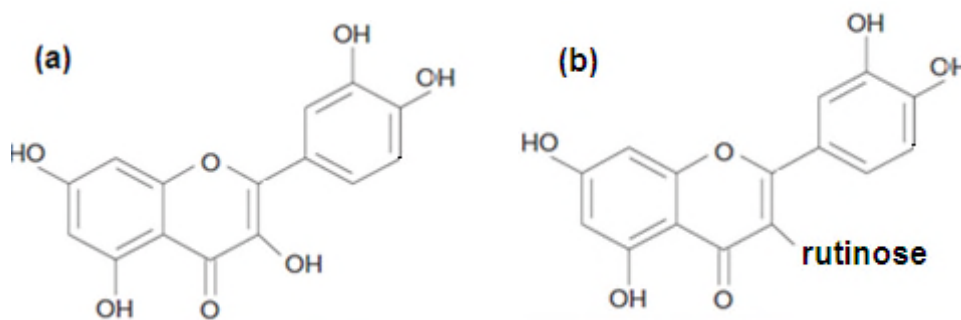


Figure 20 : Structure moléculaire de la quercétine (a) et de la rutine (b)

Les flavonoïdes permettent :

- La réduction du taux d'LDL, VLDL et de TG. Les mécanismes de cette baisse de taux de LDL, VLDL et de TG ne sont pas encore élucidés (**Sharma et al., 2008a**).
- La réduction du taux de glucose sanguin : cet effet aurait été la conséquence soit de l'augmentation de l'expression des GLUT4 qui permettent le captage du glucose au niveau des tissus musculaire et adipeux soit de l'activation de l'hexokinase (HK) qui catalyse la conversion du glucose en glucose 6 phosphate au cours de la glycolyse. L'activité de l'HK est déterminée par la réduction du taux de NAD^+ qui se transforme en NADH, H^+ au cours de la déshydrogénation de 3 phospho-glycéraldéhyde en 1-3 di phospho-glycérate lors de la glycolyse (**Sharma et al., 2008 a et b**).
- L'Inhibition de la G6Pase qui catalyse la conversion du glucose 6 phosphate en glucose et l'inhibition de la phosphoénolpyruvate carboxykinase afin d'inhiber la néoglucogenèse.
- L'Augmentation de la sécrétion de l'insuline par les cellules β pancréatiques (**Sharma et al., 2008 b, Prashath et Subramaian, 2011**). La figure 23 montre la différence entre le pancréas d'un rat diabétique (a) et celui d'un autre rat diabétique traité par l'extrait riche en flavonoïdes des graines d'*Eugenia jambolana* (b) (**Sharma et al., 2008 b**).
- La réduction des complications liées au diabète : Réduction de l'accumulation du sorbitol au niveau de certains organes à cause d'une activité plus élevée de l'enzyme aldose réductase (AR). Il s'agit de la cause principale des complications rétinopathiques, neuropathiques et néphropathiques. L'extrait riche en flavonoïdes des graines d'*Eugenia jambolana* induit une réduction de l'expression de l'AR permettant de réduire les complications secondaires (**Sharma et al., 2008 a**).

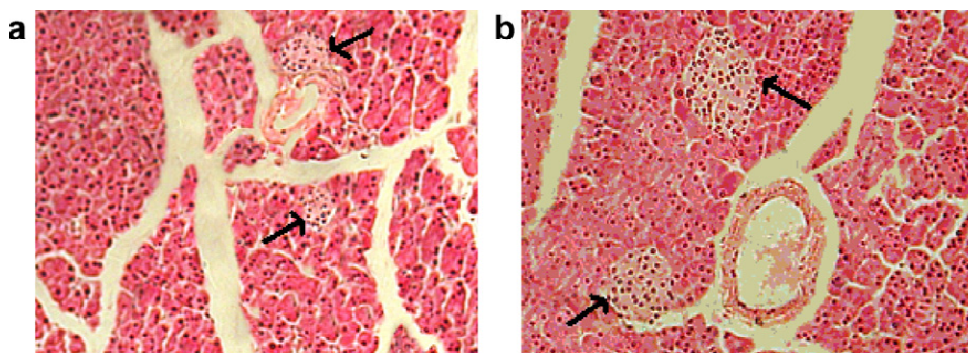


Figure 21 : Photomicrographie du pancréas d'un rat diabétique (a) et d'un autre rat diabétique traité par l'extrait riche en flavonoïdes des graines d'*Eugenia jambolana* (b). La flèche(↑) indique la région d'îlot de Langerhans.

-Les flavonoïdes de cette plante induisent la prolifération des cellules β du pancréas. L'augmentation du nombre des ces cellules, peut être à l'origine de l'augmentation de la sécrétion de l'insuline (Sharma et al., 2008).

d) Terpènes : le cacalol, l'acétate de cacalol, le cacalone et l'epicacalone (Figure20) sont des sesquiterpènes, présents dans la racine et le rhizome de *Psacalium decompositum* (Compos et al., 2009). Ce sont des insulinosécréteurs qui bloquent les canaux potassium ATP dépendant d'une manière semblable au sulfonyleurée glibenclamide. Cependant, des données controversées indiquent que ces sesquiterpenoïdes sont moins efficaces que le glibenclamide dans la diminution des taux de glucose plasmatique, suggérant qu'ils puissent montrer une affinité plus élevée à la sous-unité SUR2 (sulfonyleurea receptors) liée aux sous unités protéiques du canal potassique ATP dépendant dans le muscle lisse aortique qu'à la sous-unité SUR1 des cellules β pancréatiques (Campos et al., 2009).

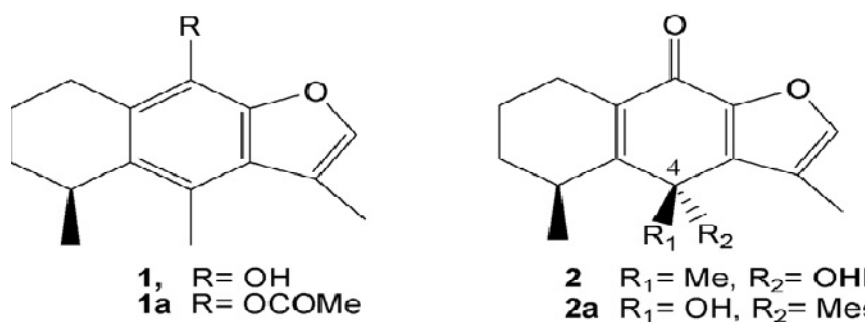


Figure 22 : Structure chimique du cacalol (1), acétate de cacalol (1a), cacalone (2) et epicacalone (2a).

e) Zinc : le gène du récepteur de l'insuline comprend une protéine, la **Sp1**, très sensible à l'oxydation. Son oxydation diminue son activité sur le gène du récepteur de l'insuline, ce qui peut diminuer la synthèse et le renouvellement de ce récepteur (**Wester et al., 2001**). Le zinc intervient de façon très importante car son absence aggrave l'oxydation de cette protéine, ce qui entraîne l'aggravation de l'insulinorésistance. Le zinc est présent dans les îlots de Langerhans pour les protéger du stress oxydant (**Webster et al., 2001, Beletate et al., 2007**).

3. *Nigella sativa*

3.1. Généralités sur la plante

Les **nigelles** dicotylédones, sont des plantes herbacées au feuillage finement découpé, de la famille des Renonculacées, appartenant au genre *Nigella* (**tableau I**), du latin « *Nigella* » lui-même de « *niger* » signifiant noir en référence à la couleur des graines des espèces de ce genre (**Guignard, 2001**). Les nigelles sont des plantes annuelles à courte demi-vie et à court cycle de régénération. Ce sont des plantes typiques des sols naturels semi-arides. Il en existe une vingtaine d'espèces, *Nigella sativa*, *Nigella damascena*, *Nigella arvensis*, *Nigella integrifolia*, *Nigella nigellastrum*, *Nigella gallica*, *Nigella glandulifera*, *Nigella Hispanica*, *Nigella Orientalis*...(**Figure 24**)(**Heiss et al., 2011**), toutes originaires d'Eurasie (**Nickavar et al., 2003 ; Tian et al., 2006**).

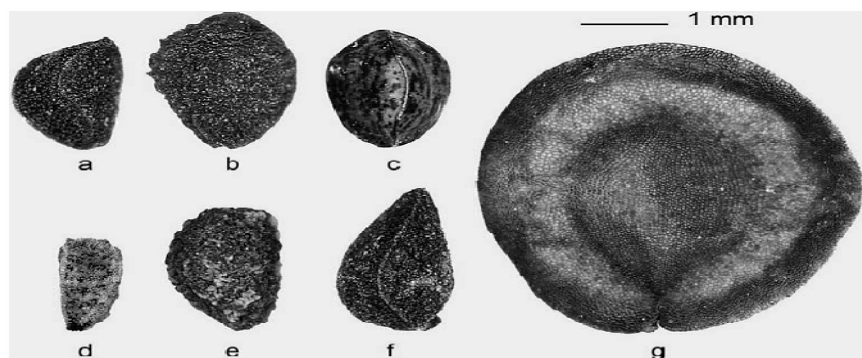


Figure 23: Graines de quelques espèces de *Nigella* ; **a** : *N. arvensis*, **b** : *N. damascena*, **c** : *N. hispanica*, **d** : *N. integrifolia*, **e** : *N. nigellastrum*, **f** : *N. sativa*, **g** : *N. Orientalis* (D'après **Heiss et al., 2011**).

Nigella sativa est une plante d'un grand intérêt médical, elle appartient à la famille des ranunculacées et cultivées dans différents pays surtout dans le bassin méditerranéen et en Inde (**Ghedira, 2006, Piras et al., 2013**). La plante est connue encore sous différentes appellations (nigelle, cumin noir, poivrette, tout épices, quatre épices, sinoj, kamun assouad, habat el-baraka, el-haba el-saouda etc.). La plante, qui fleurit en juin/juillet, est

verte avant maturation et brunâtre après. Par leur nature aromatique, les graines de *Nigella sativa* sont très utilisées comme épices de cuisson, dans les préparations des sirops, en pâtisserie et boulangerie et récemment en industrie pharmaceutique (**Atta, 2003**). Ces graines sont largement utilisées en médecine traditionnelle depuis des siècles, à travers le monde, contre une multitude de maux (**Piras et al., 2013**). Notre prophète Mohammed (que la prière et le salut d'Allah soient sur lui) nous a en effet enseigné depuis plus de quatorze siècles que "la graine de nigelle" était un remède contre tous les maux et a dit: "Soignez-vous en utilisant la graine de nigelle, c'est un remède contre tous les maux à l'exception de la mort".

3.2. Description botanique de la plante

Nigella sativa est une plante annuelle herbacée de 20 à 40 cm, à rameaux se réunissant en formant des angles très aigus et à feuilles divisées en lobes étroits, allongés, souvent élargies sur leur sommet. Les feuilles inférieures sont petites et pétaloïdes, les supérieures longues. La plante est hermaphrodite à fleurs bleues ou blanchâtres, à sépales assez brusquement rétrécis à leur base, et à pétales portant chacun au sommet deux petits renflements arrondis, non amincis. Le fruit est une capsule formée de 3 à 6 carpelles soudés entre eux jusqu'à la base des styles persistants. La capsule contient plusieurs graines triangulaires blanchâtres, et à maturité, elle s'ouvre et les graines exposées à l'air deviennent noires (**Bonnier, 1990**) (Figure 24).

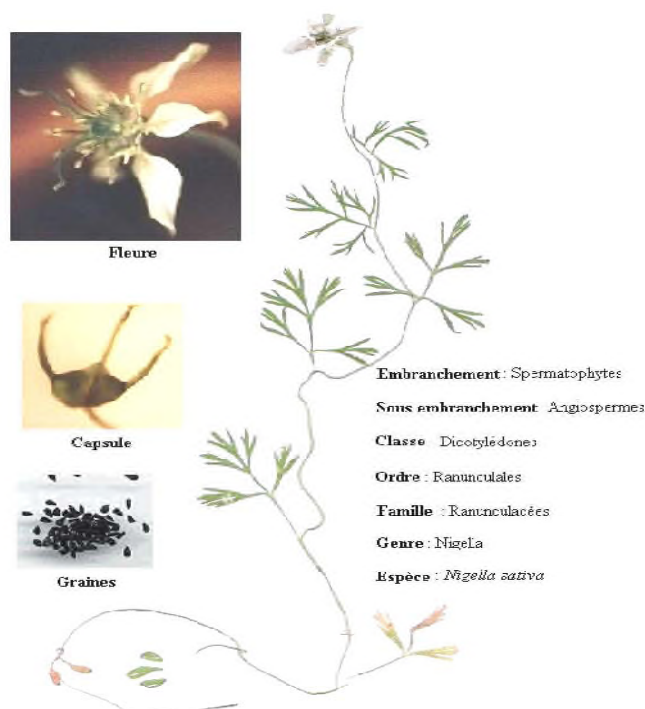


Figure 24 : Aspects morphologiques de *Nigella sativa* (D'après **Boudiaf, 2006**)

3.3. Composition biochimique des graines de *Nigella sativa*

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**). La composition chimique de *Nigella sativa* est récapitulée dans le tableau ci-dessous.

Tableau 3 : Composition biochimique des graines de *Nigella sativa* (**AL-Beitawi et al., 2008**).

Composés chimiques	Teneur (%)
Eau	4,4
Matière sèche	95,6
Protéines brutes	22,75
Lipides	36,25
Glucides	32,2
Huiles volatiles	0,45
Cendres	4,86

a) Protéines de *Nigella sativa*

La graine de *Nigella sativa* est très riche en protéines (20 à 27%). Le fractionnement des protéines de *Nigella sativa* par électrophorèse en polyacrylamide dans les conditions dénaturantes (PAGE-SDS) montre des protéines avec des poids moléculaires allant de 10 à 94 KDa (**Salem, 2005**). La protéine la plus étudiée jusqu'à maintenant est la lipase qui catalyse les réactions de trans-estérification (**Tuter et al., 2003**).

b) Composés phénoliques

Les graines de *Nigella sativa* contiennent plusieurs métabolites secondaires tels que les alcaloïdes, les saponines et les composés phénoliques. Les polyphénols de *Nigella sativa* sont responsables des activités pharmacologiques. Ils ont été isolés et identifiés par HPLC (**Bourgou et al., 2008**). L'acide vanillique est majoritairement présent avec une teneur variant de 89.94 à 143.21 mg/100g de poudre. L'acide gallique est également un composant prédominant (27.87 à 30.56 mg/100g de poudre). On retrouve aussi l'acide coumarique, acide hydroxybenzoïque, acide cyringique, acide chlorogénique, acide p-coumarique, acide ferulique mais à des taux très faibles (**Mariod et al., 2009; Bourgou et al., 2010**). Les principaux composés phénoliques de *Nigella sativa* sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Les principaux composés phénoliques de l'extrait méthanolique de *Nigella sativa* (Mariod et al., 2009; Bourgou et al., 2008).

Composé phénolique	Teneur (mg/100g de poudre de graines)
Acide cumerique	0,631
Acide hydroxybenzoïque	0,19 – 1,73
Acide cyringique	0,125
Acide gallique	27,86 – 30,56
Acide chlorogénique	0,36 – 1,5
Acide vanillique	89,94 – 143,21
Acide p-coumarique	0,360
Acide ferulique	0,180
Acide trans-2-hydroxycinnamique	1,25 – 2,58
Acide trans-cinnamique	0,98 – 15,47

c) Flavonoïdes

Plusieurs flavonoïdes ont été isolés à partir de la plante de *Nigella sativa*. Les plus abondants sont la catéchine et l'apigénine qui représentent respectivement 7,26% et 6,83%. On y trouve aussi la flavone, l'amentoflavone, la quercitrine et l'epicatéchine avec des proportions respectives de 3,4%, 2,91%, 2,56% et 1,28% (Bourgou et al., 2008). Les plus importants flavonoïdes, composés qui possèdent de fortes propriétés anti-oxydantes, sont représentés sur le tableau 5.

Tableau 5 : Les principaux flavonoides de *Nigella sativa* (Bourgou et al., 2008)

Flavonoïdes	La teneur (mg/100g)
Quercétine	2,56
Epicatéchine	1,28
Catéchine	7,26
Apigénine	6,83
Amentoflavone	2,91
Flavone	3,4

d) Huiles volatiles

Les composants majeurs des huiles volatiles de *Nigella sativa* sont thymoquinone (27,8% - 57%), p-cymene (7,1% - 15,5%), carvacrol (5,8% - 11,6%), t-anethole (0,25% - 2,3%) ,4-terpineol (2% - 6,6%) et longifolene (1% - 8%) (**Figure 26**) (**Hosseinezadeh et Parvardeh, 2004**).

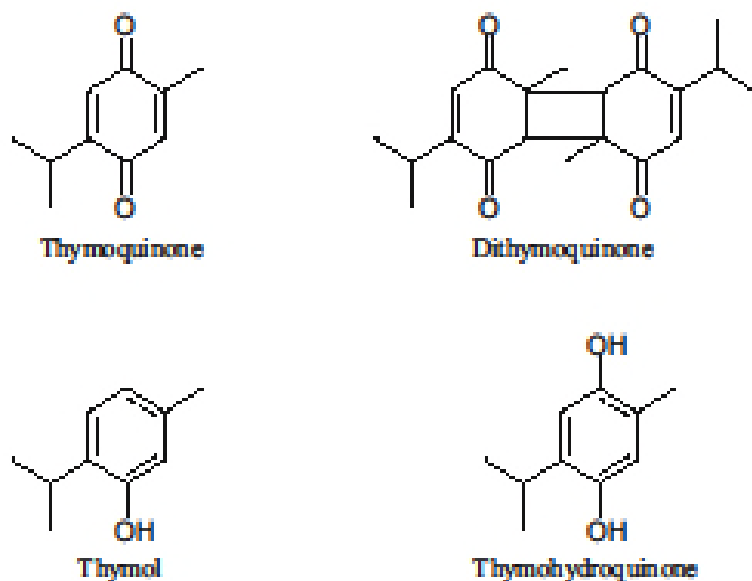


Figure 25 : Structures chimiques des principaux constituants des huiles volatiles des graines de *Nigella sativa*

Le tableau suivant montre que la quantité et la nature des huiles volatiles varient selon l'origine de la plante et la méthode d'extraction. Ainsi, Hajhashemi et ses collaborateurs (2004) ont identifié 20 composants dans l'huile essentielle de *Nigella sativa* d'Iran. Les constituants majeurs sont le para-cymene et la thymoquinone qui représentent respectivement 37,3% et 13,7%. Les études de Benkaci-Ali et ses collègues (2007) révèlent, de leur côté, que le composé majeur des huiles volatiles de *Nigella sativa* Algérienne est le carvacrol (12,9%), suivi par le para-cymene (8,9%) et la thymoquinone (6,1%) (Tableau 6).

Tableau 6 : Composition chimique des huiles volatiles de *Nigella sativa* Algérienne (Benkaci-Ali et al., 2006 ; Benkaci-Ali et al., 2007) et Iranienne (Hajhashemi et al., 2004).

Composant	Le teneur des huiles volatiles de <i>Nigella sativa</i> Iranienne	La teneur des huiles volatiles de <i>Nigella sativa</i> Algérienne
Alpha-Thujene	9,8	0,5
Alpha-Pinene	3,1	/
Sabinene	2,2	0,1
Beta-Pinene	3,4	/
Alpha-Terpinene	0,8	0,2
Para-Cymene	37,3	8,9
Gamma-Terpinene	2,0	0,6
Linalool	9,9	1,0
Cis-Thujone	0,2	/
Camphor	0,6	0,8
4-Terpineol	1,0	0,6
Alpha-Terpineol	2,2	0,6
Thymoquinone	13,7	6,1
Bornyl acetate	0,2	0,2
Thymol	0,4	1,5
Carvacrol	1,6	12,9
alpha-Longipinene	2,1	0,2
Citronellyl acetate	0,4	/
Longifolene	6,4	1,8
Davanone	0,1	/

e) Alcaloïdes

La graine de *Nigella sativa* renferme également des alcaloïdes telles que la nigelline, la nigellicine, la nigellidine, la nigellimine et la N-oxy-nigellimine, l'a-hédérine et une saponine : onodesmosidique (Ghedira, 2006) (Figure 26).

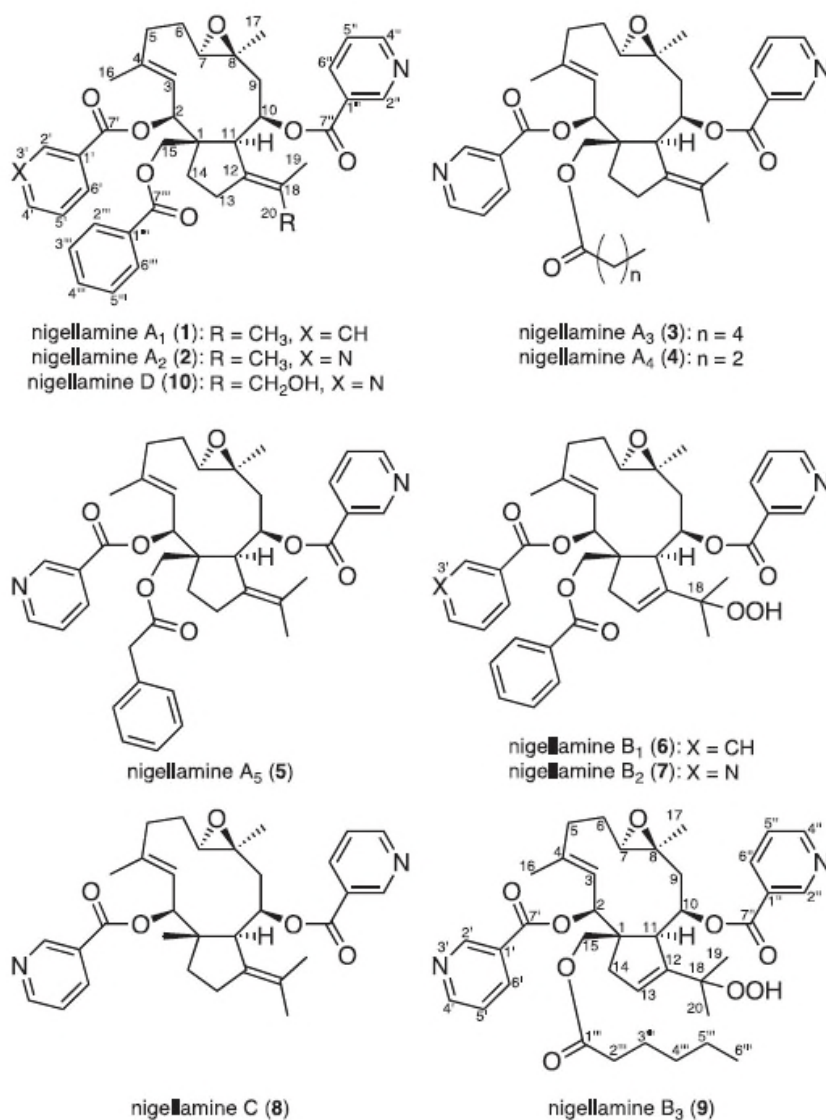


Figure 26 : Structures chimiques des alcaloïdes de type dolabellane diterpeniques de *Nigella sativa*

f) Huile fixe

L'huile fixe représente 36 à 38 % du poids de la graine. Elle est constituée principalement d'esters du glycérol et d'acides gras essentiels tels que l'acide linoléique, l'acide oléique et l'acide palmitique. La teneur en acide arachidonique varie de 0,01 à 0,4 % et celle en acide gamma linolénique est comprise entre 0,1 et 1 % (Atta, 2003).

3.4. Composition chimique des huiles de *Nigella sativa*

a) Composition en acides gras libres

Des travaux effectués sur les huiles fixes de *Nigella sativa* d'origine Iranienne, Egyptienne et Tunisienne (Tableau 7) montrent une variabilité des taux en différents acides gras donc

de la composition en acides gras de cette huile. La composition en acides gras de cette huile est fortement influencée par les facteurs de l'environnement (sol, température...etc.). Cependant, les acides gras majoritaires sont les acides gras insaturés quelque soit l'origine de la plante. Dans ces huiles, les principaux acides gras saturés sont essentiellement l'acide palmitique, l'acide stéarique et l'acide myristique, tandis que les acides gras insaturés majoritaires sont l'acide linoléique et l'acide oléique (Atta, 2003).

Les graines de *Nigella sativa* sont très riches en huile fixe. Le pourcentage des acides gras totaux identifiés dans l'huile est de 99%. L'acide gras insaturé majeur est l'acide linoléique (50.31%) suivi par l'acide oléique (25.0%), alors que l'acide gras saturé majeur est l'acide palmitique (17.2%) (Cheikh-Rouhou et al., 2007). D'une manière générale l'huile de *Nigella sativa* contient (g/100g d'acides gras totaux) 22.51 % d'acides gras saturés, 26.47 % d'acides gras mono insaturés et 50.65 % d'acides gras insaturés. Les différents acides gras qui constituent l'huile de *Nigella sativa* sont représentés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Composition en acides gras des huiles de *Nigella sativa* Egyptienne (Atta, 2003), Tunisienne (Cheikh-Rouhou et al., 2006) et Iranienne (Nickavar et al., 2003 ; Cheikh-Rouhou et al., 2007).

Acide gras	La teneur (g/100g d'acides gras totaux) de N.S Tunisienne	La teneur (%) de N.S Egyptienne	La teneur (%) de N.S Iranienne
Acide myristique	0,35	9,8	0,4
Acide palmitique	17,2	9,9	12,5
Acide palmitoléique	1,15	0,7	0,78
Acide stéarique	2,84	3,3	3,4
Acide oléique	25,0	20,1	23,4
Acide linoléique	50,31	49,0	55,6
Acide linolénique	0,34	2,7	0,4
Acide arachidique	0,14	0,7	0,22
Acide eicosinoïque	0,32	/	3,1
Acide béhénique	1,98	0,8	2,6

b) Lipides de *Nigella sativa*

Les huiles de *Nigella sativa* qui ont été extraites par deux méthodes différentes (par pression à froid et par solvants) ont les mêmes fractions lipidiques mais à des teneurs différentes (Tableau 8). Les huiles de *Nigella sativa* extraites par solvant contiennent des

lipides polaires, monoacylglycérols, diacylglycérols, stérols libres et des esters de stérols avec des concentrations relativement proches. La classe majeure est celle des Triacylglycérols (63.2 %). Les huiles extraites par pression à froid sont majoritairement composées de Triacylglycérols (57,50 %) et contiennent une faible fraction de lipides polaires (3,70 %), des monoacylglycérols et des diacylglycérols avec des proportions respectives 4,80 % et 5,10 %.

Il est à noter que la méthode d'extraction des huiles fixes influence leurs quantités en acides gras libres. Ainsi, l'extraction à froid montre un taux élevé en acides gras libres de 14.20 % contre 8% lorsque l'extraction est effectuée par un solvant (**Ramadan et al., 2012**). Cette différence est attribuée à l'action hydrolytique des lipases natives des graines qui peuvent être désactivé durant le contact de l'huile avec le solvant pendant l'extraction (**Atta, 2003**).

Tableau 8 : Lipides de *Nigella sativa* extraite par différentes méthodes (**Atta, 2003**).

Lipides	Extraction à chaud par solvant apolaire (g/100g de lipides totaux)	Extraction par pression à froid (%)
Lipides polaires	4,8	3,7
Monoacylglycérol(MG)	5,7	4,8
Diacylglycérol (DG)	4,1	5,1
Triacylglycérol (TG)	63,2	57,5
Stérols libres	5,0	3,0
Esters de stérols (SE)	4,4	2,5
Acides gras libres (FFA)	8,3	14,2
Inconnus	4,5	5,4

c) Composition en acides gras des classes lipidiques

L'acide linoléique est l'acide gras prédominant dans les fractions TG (44 %), DG (37.2 %) et les acides gras libres (30.7 %) comme le montre le tableau 9, tandis que l'acide myristique est l'acide gras majeur dans les fractions MG (37.8%) et SE (48.7 %) (**Atta, 2003**).

Tableau 9 : Composition en acides gras des classes lipidiques de *Nigella Sativa* (g/100g de lipides totaux) (Atta, 2003).

Acide gras	FFA	MG	DG	TG	SE
Acide myristique	9,4	37,8	17,4	5,3	48,7
Acide palmitique	11,7	12,6	15,1	17,5	11,5
Acide palmitoléique	Tr	Tr	0,9	1,7	Tr
Acide stéarique	8,3	3,3	3,9	6,5	4,8
Acide oléique	28,4	10,3	14,1	15,1	7,2
Acide linoléique	30,7	32,0	37,2	44,0	17,1
Acide linolénique	0,7	0,5	0,7	1,9	1,1
Acide arachidique	3,5	Tr	0,9	1,1	4,3
Acide béhénique	Tr	Tr	1,3	0,9	Tr
Acide urique	6,6	Tr	4,9	2,8	3,2

Tr : Trace

d) Stérols

Des travaux effectués sur les huiles fixes de *Nigella sativa* d'origine Iranienne et Tunisienne montrent une variabilité des taux en différents stérols. Cependant, le composé majoritaire est la β -sitostérol suivi par la stigmastérol, puis la campésterol quelque soit l'origine de la plante (Tableau 10). Ces phytostérols ont la capacité d'inhiber l'absorption intestinale du cholestérol (Cheikh-Rouhou et al., 2008).

Tableau 10: Stérols l'huile de *Nigella Sativa* d'origine Tunisienne et Iranienne (Cheikh-Rouhou et al., 2008).

Fractions	teneur (mg/100g d'huile) des stérols de N.S tunisienne	teneur (mg/100g d'huile) des stérols de N.S iranienne
Cholestérol	1,28	0,93
Campesterol	13,76	12,09
Stigmastérol	20,92	16,57
B-sitostérol	44,53	53,95
Δ^7 -stegmastérol	1,38	1,60
Δ^7 -avenastérol	2,24	1,17

e) Composition en vitamines et β -carotène

L'huile de *Nigella Sativa* contient une concentration très importante en vitamine K1 (1162 μ g), alors que les tocophérols totaux et la β -carotène ont des concentrations très proches, comme le montre le tableau 11. L'importance de ces constituants est attribuée à leurs propriétés anti-oxydante et anti-tumorale (Ramadan et Mörsel, 2002).

Tableau 11: Composition en vitamines (vitamines liposolubles) et β -carotène de l'huile fixe de *Nigella Sativa* (Ramadan et Mörsel, 2002).

Composés	Concentration (μ g /g d'huile)
α – tocophérol	284
β – tocophérol	40
Γ - tocophérol	225
δ – tocophérol	48
Tocophérols totaux	597
β -carotène	593
Vitamine K1	1162
Vitamines totaux et β –carotène	2353

3.5. Propriétés physico-chimiques des huiles de *Nigella sativa*

Les propriétés physico-chimiques des huiles de *Nigella sativa* sont fortement influencées par plusieurs facteurs tels que l'environnement (l'origine de la plante) et les méthodes d'extraction et d'analyse (Tableau 12).

Tableau 12: Propriétés physico-chimiques des huiles de *Nigella sativa* (Atta, 2003 ; Cheikh-Rouhou et al., 2007).

Paramètres	Huile Egyptienne		Huile Tunisienne	Huile Iranienne
	Extraction par solvant	Extraction à froid	Extraction par solvant	Extraction par solvant
Indice de réfraction (à 40°C)	1,47	1,47	1,47	1,46
FFA (%)	6,7	11	22,7	18,6
Indice de peroxyde (meqO ₂ /Kg d'huile)	10,7	13,5	5,65	4,35
Indice d'iode (g d'I ₂ /100g d'huile)	128	115	119	101
Indice de saponification (mg de KOH/g d'huile)	203	192	211	218
Insaponifiables (%)	1,81	1,0	/	/

f) Indice de réfraction

L'indice de réfraction de *Nigella sativa* a presque la même valeur de 1.47 quelque soit l'origine de la plante et la méthode d'extraction, cette valeur est semblable à celle de l'huile d'olive (**Cheikh-Rouhou et al., 2007**).

g) Acidité et indice de peroxyde

L'acidité et l'indice de peroxyde nous renseignent sur la qualité et la durée de conservation des huiles (**Cheikh-Rouhou et al., 2007**). Les valeurs de FFA (acidité) des huiles de *Nigella sativa* extraites par pression à froid et par solvant sont respectivement 11% et 6.7%. Ces pourcentages sont inférieurs à ceux déterminé par Cheikh-Rouhou en 2007 pour les deux variétés Tunisienne et Iranienne, respectivement, 22.7% et 18.6%. L'acidité élevée des huiles peut être en rapport avec la nature des graines, bien que beaucoup de graines oléagineuse, tel que l'olive et le palme ont une acidité très élevée (**Atta, 2003**). Les valeurs de l'indice de peroxyde de *Nigella sativa* Tunisienne et Iranienne sont respectivement 5.65 et 4.35 meq O₂ /Kg d'huile. Ces dernière sont trois fois inférieures à celles rapporté par Atta (2003) (10.7 – 13.5 meq O₂ /Kg d'huile). L'acidité et l'indice de peroxyde de cette huile prouve qu'elle est comestible et pourrai avoir une longue durée de conservation (**Cheikh-Rouhou et al., 2007**).

h) Indice d'iode

L'indice d'iode le plus élevé est celui de l'huile de *Nigella sativa* Egyptienne extraite par solvant. Sa valeur est de 128 g d'I₂/100g d'huile. L'extraction de l'huile à partir de ces graines par pression ramène l'indice d'iode à 115 g d'I₂/100g d'huile. (**Atta, 2003 ; Cheikh-Rouhou et al., 2007**). L'indice d'iode indique que l'huile de *Nigella sativa* est une huile fortement insaturée et témoigne qu'elle contient des niveaux élevés des acides oléique et linoléique. Une valeur plus basse d'iode reflète une plus grande stabilité de l'huile (**Cheikh-Rouhou et al., 2007**).

i) Indice de saponification

Les indices de saponification des huiles de *Nigella sativa* Tunisienne et Iranienne sont respectivement 211 et 218 (**Cheikh-Rouhou et al., 2007**). Ces valeurs sont plus élevées que celles des huiles de *Nigella sativa* Egyptienne (**Atta, 2003**). Les différentes variations des indices de saponification peuvent nous renseigner sur la taille et la nature des AG.

j) Insaponifiables

Les insaponifiables des huiles végétales sont considérés comme antioxydants naturels.

Ils sont capables de minimiser l'oxydation des huiles pendant le stockage. Le tableau 12 montre que la méthode d'extraction influe sur la teneur en insaponifiables. Cependant, l'huile de *Nigella sativa* extraite par solvant est plus riche en insaponifiables que celle extraite par pression à froid. Cette variation est en relation avec la potentialité du solvant pour extraire la plus part des substances associées aux lipides, y compris phospholipides, stérols, vitamines liposolubles, glucides et pigments (Atta, 2003).

3.6. Propriétés pharmacologiques de *Nigella sativa*

3.6.1. Effet anti-convulsif

L'effet anti-convulsif a été rapporté dans plusieurs études : des études menées sur les extraits aqueux et l'extrait méthanolique délipidé des graines de *Nigella sativa* L., afin d'évaluer leurs effets sur le système nerveux central (SNC) et sur l'activité analgésique des rats, suggèrent que les deux extraits de *Nigella sativa* agissent sur le système nerveux central et possèdent de puissantes activités analgésiques (Al-Naggar et al., 2003).

Dans une autre étude menée par Hosseinzadeh et Parvardeh (2004) a montré que la thymoquinone possède un effet anticonvulsif. Son effet pourrait être dû à son action sur les récepteurs GABA énergiques. L'huile de *Nigella sativa* possède aussi cet effet anti-convulsif. Ilhan et ses collaborateurs ont montré en 2005, que cette huile a une action neuro-protectrice (Ilhan et al., 2005).

3.6.2. Effet anti-inflammatoire

L'effet anti-inflammatoire de *Nigella sativa* a fait l'objet de plusieurs études. A titre d'exemple : Le traitement avec l'huile augmente de façon significative l'activité phagocytaire, l'indice phagocytaire des macrophages péritonéaux et le nombre des lymphocytes dans le sang périphérique. Ces actions ont été observées chez l'hamster rendu diabétique par la streptozotocine traité avec l'huile de *Nigella sativa* (Fararh et al., 2004).

Nigella sativa et ses fractions solubles agit aussi sur la stimulation de la production des interleukines et améliore la phagocytose des cellules bactériennes par les macrophages (Haq et al., 1995). Ces résultats sont aussi confirmés par une étude plus récente dans laquelle ont a démontré que l'huile essentielle *Nigella sativa* augmente les valeurs de réactivité trachéale et réduit l'inflammation des poumons suite à l'exposition des cochons d'inde à un gaz irritant (Boskabady et al., 2011).

Dans une autre étude, l'huile de *Nigella sativa*, nigellone (polythymoquinone) et thymoquinone ont été étudiées pour évaluer leur effet sur la formation de la 5-lipoxygénase

(5-LO) produite par les polynucléaires neutrophiles. Les résultats ont montré que ces substances inhibent significativement la production de cette enzyme ce qui signifie que l'huile de *Nigella sativa*, la nigellone et la thymoquinone réduisent les manifestations inflammatoires (El-Dakhakhny et al., 2002).

Les effets anti-inflammatoires et immunostimulant de *Nigella sativa* et de ses constituants notamment la thymoquinone ont été aussi répertoriés dans une revue réalisée par Salem (2005). Zaoui et ses collaborateurs ont démontré que l'huile de *Nigella sativa* contribue aussi dans le maintien de l'homéostasie sanguine (Zaoui et al., 2002 b). Cet effet a été aussi confirmé par Al-Jishi et Abuo Hozafa (2003).

Cependant, Gelot et ses équipiers ont constaté que l'huile de *Nigella sativa* peut aussi être à l'origine d'une réaction inflammatoire et allergique. En effet, ils ont rapporté qu'une femme de 53 ans était hospitalisée pour une éruption fébrile avec un aspect de placards érythémateux associés à des vésicules et des bulles. Cette femme appliquait par massage et ingérait durant deux semaines, de l'huile de nigelle. La biopsie cutanée montrait un décollement sous-épidermique et une nécrose du toit de l'épiderme compatibles avec des lésions du spectre érythème polymorphe – nécrolyse épidermique toxique. L'évolution était lentement favorable, avec persistance de lésions dépigmentées pendant trois mois (Gelot et al., 2012).

3.6.3. Effet antipyrétique et analgésique

L'extrait aqueux de *Nigella sativa* a été étudié pour ses activités anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique dans des modèles animaux. L'extrait exerce une action inhibitrice sur l'œdème induit par carraghénane sur la patte de souris. L'extrait a également produit augmentation significative du temps de réaction à la plaque chauffante chez la souris, indiquant un effet analgésique (Al-Ghamdi, 2001).

3.6.4. Activité anti-tumorale et anti-proliférative

Dans une étude récente, on a constaté que l'extrait aqueux de *Nigella sativa* améliorait de façon significative la prolifération des splénocytes d'une manière dépendante de la concentration. En outre, l'extrait aqueux de *Nigella sativa* favorise la sécrétion des cytokines de type Th2, par rapport à ceux de type Th1, par les splénocytes. La sécrétion d'IL6, TNF et NO; médiateurs clés pro-inflammatoires, par les macrophages primaires est supprimée de manière significative par l'extrait aqueux de *Nigella sativa*, indiquant que *Nigella sativa* exerce des effets anti-inflammatoires in vitro (Majdalawieh et al., 2010).

Les données expérimentales indiquent, aussi, que l'extrait aqueux de *Nigella sativa* améliore de façon significative l'activité cytotoxique NK contre les cellules YAC-1 tumorales. Ceci qui suggère que les effets anti-tumoraux documentés de *Nigella sativa* peuvent être, au moins en partie, attribués à sa capacité à servir de stimulant des cellules NK à activité anti-tumorale (**Majdalawieh et al., 2010**).

Dans une autre étude, les extraits éthanoliques de trois espèces de plantes dont *Nigella sativa* ont été préparés et testés contre la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG), un agent mutagène à action directe. Des cultures primaires d'hépatocytes de rat ont été utilisées pour cette étude. Les extraits éthanoliques de plantes ont été appliqués en présence du MNNG dans trois protocoles: **i)** en pré-traitement, **ii)** en traitement combiné et **iii)** en post-traitement. Les résultats de cette étude montrent un effet inhibiteur des extraits de plantes sur la mutagénicité du MNNG. Cependant, les extraits n'ont eu aucun effet sur les indicateurs de cyto-toxicité telles que la nécrose et l'apoptose. Les effets obtenus peuvent être attribués à une activité directe antimutagène et une réparation importante au niveau chromosomique (**Khader et al., 2010**).

Il a été rapporté dans de nombreuses études que c'est la thymoquinone, composé de *Nigella sativa*, qui serait responsable des ses activités anti-tumorales (**Maity et al., 2009 ; Banerjee et al. 2010 ; El-Najjar et al., 2011**). Cette quinone a une activité anticancéreuse grâce à sa modulation de multiples cibles moléculaires, y compris p53, p73, PTEN, STAT3, PPAR- γ , activation des caspases et la génération de ROS (**Chih Woo et al., 2012**). Les effets anti-tumoraux de la thymoquinone ont également été étudiés chez la souris, modèle de xénogreffes de tumeurs du côlon, de la prostate, du pancréas et le cancer du poumon. La combinaison de thymoquinone et médicaments utilisés en chimiothérapie semble améliorer les résultats du traitement (**Chih Woo et al., 2012**).

3.6.5. Effet anti- allergique et anti-histaminique

L'effet broncho-dilatateur des huiles essentielles de *Nigella sativa* et de la thymoquinone ont été rapportés en 1993 par El Tahir et collaborateurs. Dans leur étude, EL –Tahir et ses co-équipiers ont démontré que l'huile volatile de *Nigella sativa* administrée chez le cochon d'Inde en intraveineuse induit une augmentation (dose-dépendante) de la fréquence respiratoire et de la pression intra-trachéale. L'administration en intraveineuse de la TQ induit une augmentation significative de la pression intra-trachéale sans aucun effet de la fréquence respiratoire. D'après les auteurs de l'étude ; les effets respiratoires de cette huile sont médiés par la libération d'histamine avec la participation directe des mécanismes

histaminergiques et muscariniques et par activation indirecte de mécanismes cholinergiques (**El-Tahir et al., 2003**).

Dans une autre étude menée par Boskabady et ses co-équipiers, l'effet antiasthmatique (broncho-dilatateur) de l'extrait bouilli de *Nigella sativa* sur les voies respiratoires des patients asthmatiques a été examiné. Les effets bronchodilatateurs de 50 et 100 mg / kg d'extrait comparés à celui de la théophylline, administrée à une concentration de 6 mg / kg, ont été étudiés sur 15 patients asthmatiques. Les épreuves fonctionnelles respiratoires (EFR), y compris le volume expiratoire maximal en une seconde (FEV1), le débit expiratoire de pointe (DEP), le maximum du débit expiratoire demi (DEM), le débit expiratoire maximal à 75, 50 et 25% de la CVF (MEF75, DEM50 et MEF25, respectivement) et la conductance spécifique des voies aériennes (Sgaw) ont été mesurés avant l'administration et répété à 30, 60, 90 120, 150 et 180 min après l'administration de l'extrait et de la théophylline par voie orale (**Keyhanmanesh et al, 2009 ; Boskabady et al., 2010**).

Les résultats ont montré que l'extrait provoquait des augmentations significatives dans tous les tests de mesure de la fonction pulmonaire (PFT), dans la plupart des intervalles de temps, ($p < 0,05$ à $p < 0,001$). Toutefois, l'augmentation du FEV1, DEM et DEM50 engendrée par les deux doses de l'extrait de bouilli et l'augmentation des MEF75 et MEF25 étaient significativement inférieures à ceux de la théophylline ($p < 0,05$ à $p < 0,001$). Le début de l'effet bronchodilatateur de l'extrait était semblable à celui de la théophylline à partir du 30 min, et l'effet de l'extrait après 150 min après l'administration est aussi semblable à celui de la théophylline. L'effet des deux doses de l'extrait étaient aussi significativement inférieures à celui du salbutamol à 30 minutes après l'administration ($p < 0,001$ pour tous les cas) (**Keyhanmanesh et al., 2009 ; Boskabady et al., 2010**).

Dans l'étude réalisée par Nikakhlagh et ses collaborateurs (2011) sur l'effet de *Nigella sativa* sur les rhinites allergiques, les auteurs ont montré que dans une population de 66 patients (33.3% hommes et 66.7 femmes) ayant un âge moyen de 47.19 ans et atteints de rhinites allergiques, le traitement avec *Nigella sativa* réduit la présence de la congestion muqueuse nasale, prurit nasal, nez qui coule, éternuements, hypertrophie des cornets, et la pâleur des muqueuses pendant les 2 premières semaines (jour 15) du traitement (**Nikakhlagh et al., 2011**). Les auteurs recommandent l'utilisation de *Nigella sativa* dans le traitement des rhinites allergiques lorsque les effets d'autres médicaments anti-allergiques doivent être évités (**Nikakhlagh et al., 2011**).

Alors que la majorité des publications confirmaient l'effet anti-allergisant et anti-inflammatoire de *Nigella sativa*, certaines études montraient plutôt que *Nigella sativa* n'avait aucun effet anti-allergisant. C'est, par exemple, le cas de l'étude de Büyüköztürk et ses collaborateurs (2005). Dans leurs études les auteurs avaient prévu d'évaluer les effets de *Nigella sativa* sur la production de cytokines de cellules spléniques de souris sensibilisées. Pour cela, Dix-neuf souris BALB/c vieilles de deux mois avaient reçu 0.3ml d'huile de *Nigella sativa* par la canule oro-eosophagique une fois par jour durant un mois (Büyüköztürk et al., 2005).

Le groupe de contrôle composé de 10 souris avait pris 0,3 ml de solution saline à 0,9%. Dans la troisième semaine de l'étude, toutes les souris ont été sensibilisées par injections intra-péritonéales de 20 ug d'ovalbumine. Les injections d'ovalbumine étaient répétées trois fois avec 7 jours d'intervalle. Après une autre semaine, toutes les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale. Ensuite, les cellules spléniques mononucléaires (MNC) de souris ont été cultivées avec de l'ovalbumine ou avec la concavaline A (Con-A). A partir des surnageants des cultures, l'IL-4, IL-10 et IFN- γ ont été évalués au moyen d'ELISA. La production de cytokines de la rate de souris ayant été traité avec l'huile de *Nigella sativa* pendant 30 jours n'était pas significativement différents de ceux du groupe témoin, traités avec l'eau saline. En conclusion, l'huile de *Nigella sativa* semble ne pas avoir un effet immun-modulateur sur la sensibilité des cellules Th1 et Th2 à la stimulation par l'allergène (Büyüköztürk et al., 2005).

3.6.6. Effet hepato-protecteur

L'effet hepato-protecteur de l'huile de *Nigella sativa* et celui de la thymoquinone a été décrit dans plusieurs études : Daba et Abdel-Rahman, 1998; El-Mahmoudy et al., 2005. Meral et ses collaborateurs (2001) ont démontré que *Nigella sativa* diminuait la peroxydation lipidique induite et augmentait la capacité anti-oxydante du foie chez les lapins. L'effet sur l'homéostasie et l'hépatotoxicité de l'huile essentielle de *Nigella sativa* a été aussi démontré par zaoui et ses co-équipiers (2002 a et b).

La thymoquinone (1mM) testé sur des hépatocytes isolés réduit le largage des enzymes cytosoliques des hépatocytes : l'alanine transaminase (ALT) et l'aspartat transaminase (AST), après l'exposition des hépatocytes au tertbutyl hydroperoxyde (TBHP) (Daba et Abdel-Rahman, 1998). Cependant, dans une étude plus récente, l'extrait aqueux de *Nigella sativa* testé en même temps que d'autres extraits de plantes médicinales, ont été étudiés pour leurs effets anti-oxydants, leur effet sur les troubles hépatiques et sur l'arthrite

expérimentale. Les résultats suggèrent que ces extraits, y compris celui de *Nigella sativa*, ne présentaient aucun effet protecteur : ni cytoprotecteur ni anti-mutagène. De plus, les auteurs ont eu des résultats en faveur d'un potentiel mutagène des ces extraits (**Khader et al., 2007**).

3.6.7. Effet antidiabétique et hypoglycémiant

L'effet hypoglycémiant de *Nigella sativa* a été bien étudié. De différentes études ont indiqué que différents extraits obtenus à partir des graines ainsi que les composés phénoliques de l'huile essentielle notamment la thymoquinone agissent soit en réduisant l'hyperglycémie soit en diminuant le taux des lipides plasmatiques ou en augmentent la production et la sécrétion de l'insuline (**Fararh et al., 2004; Kanter et al., 2003; Kaleem et al., 2006**) ou en bloquant l'absorption intestinale du glucose (**Meddah et al., 2009**).

L'huile essentielle de *Nigella sativa* réduit le taux du glucose chez les hamsters rendus diabétiques par la streptozotocine/nicotinamide. L'huile essentielle augmente aussi la production de l'insuline (**Fararh et al., 2002**). Dans une étude plus récente, il a été rapporté que la thymoquinone réduisait le niveau du glucose sanguin et sa production hépatique et ce en réduisant la gluconéogenèse (**Fararh et al., 2005**).

El- Mahmoudy et ses collaborateurs (2005) ont pu réduire l'hyperglycémie et d'augmenter le niveau de l'insuline et ce en administrant quotidiennement 3mg/kg de poids corporel de la thymoquinone aux rats rendus diabétiques par la streptozotocine.

L'administration prophylactique de l'huile volatile des graines de *Nigella sativa* avant l'introduction de la streptozotocine procure un effet protecteur du pancreas contre l'action de la streptozotocine sur les ilots de Langerhans (**Kanter et al., 2003 et 2004**). En effet, l'administration de l'huile essentielle de ces graines avant la streptozotocine diminue la peroxydation lipidique et réduit le taux du NO sérique et augment l'activité des enzymes antioxydantes chez les rats diabétiques. La thymoquinone maintien la production de l'insuline et ce en protégeant les ilots de Langerhans contre l'action de la streptozotocine (**Kanter et al., 2003 et 2004**).

La diminution de l'hyperglycémie causée par la relance de la sécrétion de l'insuline par les cellules β a été aussi observée lors de l'utilisation de l'extrait brut délipidé et de la subfraction basique des graines de *Nigella sativa* (**Rchid et al., 2004**).

3.6.8. Effet antitoxique

Plusieurs études chez les rats et les souris ont montré que les graines de *Nigella sativa* présentaient des effets protecteurs contre certaines substances toxiques. Dans une étude, il a été démontré que l'administration d'un extrait de *Nigella sativa* pendant 5 jours à des souris traitées avec 2 mg/kg de cisplatine, protégeait contre la chute du niveau d'hémoglobine et du nombre de leucocytes (Nair et al., 1991).

Il a été aussi démontré que la thymoquinone protégeait les hépatocytes isolés de foie de rat contre la toxicité induite par l'hydroperoxyde du tertabutyl (TBHP), un agent toxique connu pour ses dégâts oxydatifs et la perte progressive du glutathion (GSH) intracellulaire qu'il provoque (Daba et Abdel-Rahman, 1998). El-Saleh et ses collaborateurs (2004) ont aussi rapporté que *N. sativa* protège contre les effets délétères de hyperhomocystéinémie induite par la méthionine chez le rat (El-Saleh et al., 2004).

Un groupe de chercheurs indiens a montré que *N. sativa* diminue les effets secondaires de la chimiothérapie au potassium bromate (KBrO₃) (Khan et al., 2003). L'équipe de Mahmoud a trouvé que *N. sativa* possède des effets hépatoprotecteurs puisque elle permet de régulariser les taux plasmatiques de tous les enzymes impliqués dans le fonctionnement hépatique chez des souris infectés par *Schistosoma Mansoni* (Mahmoud et al., 2002).

3.6.9. Toxicité de *Nigella sativa*

La plupart des études montrent clairement que la nigelle possède un index thérapeutique élevé et une excellente innocuité à des doses inférieures à 4 g/kg/jour. A titre d'exemple, Mahfouz et ses collaborateurs en 1965, et ensuite Tenekoon et ses collaborateurs en 1991, ont étudié la toxicité des extraits aqueux et alcooliques de *N. sativa*. Les concentrations plasmatiques de γ -glutamyl transférase (γ -GT) et de l'alanine aminotransférase (ALAT) ont été augmentées chez le rat après un traitement oral durant 14 jours. Cependant, aucune anomalie histologique n'a été observée chez ces rats (Tenekoon et al., 1991).

Zaoui et ses collaborateurs ont rapporté, plus tard, que les huiles fixes de *Nigella sativa* présentent un DL50 de 28,8 mL/kg (po) et 2,06 mL/kg (ip). Dans le même sens, la toxicité chronique de 2 mL/kg des huiles durant 12 semaines présente des valeurs normales pour les ALAT, les GGT et l'aspartate aminotransférase (ASAT) (Zaoui et al., 2002). Dans une autre étude in-vitro, de screening cytotoxique des extraits de graines *Nigella sativa* a indiqué une cytotoxicité de la fraction d'acétate d'éthyle (EAF) contre différentes catégories de lignées de cellules cancéreuses, P388, MOLT4, les WEHI 164, LL / 2, Hep

G2, SW620 et J82, par la mesure du 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT). Les résultats indiquent que la fraction possède un effet cytotoxique puissant ainsi qu'un effet de potentialisation de la réponse immunitaire cellulaire (**Swamy et Tan, 2000**).

L'étude de Khader et ses collaborateurs (**2009**) montrent un effet cyto- et géno-toxique concentration-dépendant de la thymoquinone. En effet, la thymoquinone induit in effet anti-prolifératif à une concentration de 20µM et 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, 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 déplétions des enzymes antioxydants et provoque l'oxydation de l'ADN dans les hépatocytes traités avec des concentrations élevées de la thymoquinone (**Khader et al., 2009**).

1. Matériel biologique

1.1. Animaux

Des rats albinos Wistar de sexe féminin et de poids variant de 180 à 220 g ont été utilisés. Ils ont été placés par groupes de cinq à dix rats dans des cages et alimentés par des granulés produits par l'office national des aliments de bétail (ONAB) à Bejaia. Leur boisson est l'eau *ad Libitum*. Les cages sont placées dans l'enceinte de l'animalerie où la température varie entre 20 à 24 °C, l'humidité est de 50 % et un cycle d'éclairage de 10h/24h. Ces animaux sont gardés en phase d'adaptation pendant deux semaines avant le début de l'expérimentation.

1.2. Graines

Les graines de *Nigella sativa* utilisées dans les différentes parties de cette étude sont issues du même lot de graines procurées chez un herboriste à Bejaia. Elles sont locales, cultivées dans les hauts plateaux du Nord-Est algérien (Batna et Biscra). De couleur noir foncée et aromatiques, les graines de *Nigella sativa* sont ovoïdes de 2 à 3mm et présentent 3 à 4 angles. La face supérieure est finement granuleuse et réticulée. La taxonomie de la plante utilisée et de ses graines a été confirmée par le professeur Laaour (Laboratoire de Valorisation des Ressources Biologiques Naturelles, Université de Sétif 1). La figure 28 présente la morphologie des graines de *Nigella sativa* utilisées.



Figure 27: Morphologie des graines *Nigella sativa* utilisées

2. Extraction et caractérisation de l'huile de *Nigella sativa*

2.1. Extraction de l'huile

L'extraction de l'huile totale des graines de *Nigella sativa* est réalisée par soxlhet. La première étape d'extraction est effectuée par le méthanol (1:5; M/V) durant 6 heures, suivie

par une évaporation du solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif jusqu'à élimination totale du méthanol. L'extrait méthanolique, ainsi obtenu, est soumis à une extraction liquide-liquide, à température ambiante, par le n-hexane. Ceci est réalisé par extraction successive avec 3 x 50ml d'hexane. Après évaporation totale du solvant par évaporateur rotatif, l'extrait est séché sous flux d'azote puis le flacon est fermé hermétiquement et conservé au frais. La Figure 29 résume les différentes étapes d'extractions.

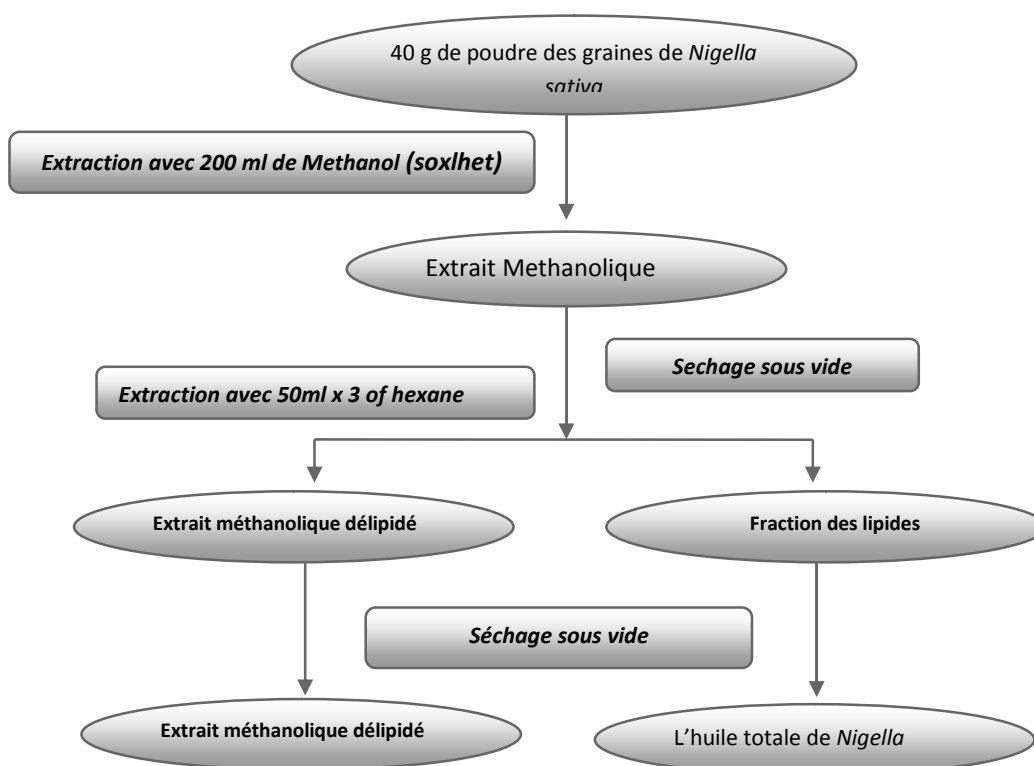


Figure 28: Schéma d'extraction de l'huile et de l'extrait méthanolique à partir des graines de *Nigella sativa*

2.2. Fractionnement de l'huile de *Nigella sativa* par chromatographie sur colonne

L'huile totale des graines de *Nigella sativa* est fractionnée sur une colonne de chromatographie ouverte de dimensions : 30cm x 20mm selon la méthode décrite par Ramadan et Morcel (2002). La phase stationnaire est constituée de gel de silice 60 (70-230 Mesh ; 0,063-0,2 mm). L'élution des différentes fractions est effectuée grâce un système de solvants constitué de chloroforme, acétone, méthanol et acide acétique.

2.3. Caractérisation physico-chimique de l'huile des graines de *Nigella sativa*

Seule l'huile totale des graines de *Nigella sativa* a fait l'objet de l'étude des caractéristiques physico-chimiques. Les paramètres et indices étudiés ont été déterminés selon les protocoles de la pharmacopée européenne 5.0 (Conseil de l'Europe, 2005)

- Densité

La densité d'une substance est le rapport entre la masse d'un volume donné de cette substance à température t_1 et la masse d'un volume égal d'eau à une température t_2 . Pour estimer la densité de l'huile des graines de *Nigella sativa*, nous avons mesuré la densité d^{20}_{20} et qui est liée à la masse volumique ρ_{20} , définie comme la masse d'une unité de volume de la substance à 20°C et exprimée en kilogramme par mètre cube ou en gramme par centimètre cube selon l'équation suivante :

$$d^{20}_{20} = 1,00180 \times \rho_{20}$$

- Indice de réfraction

L'indice de réfraction d'un milieu rapporté à l'air est égal au sinus de l'angle d'incidence d'un rayon lumineux dans l'air au sinus de l'angle de réfraction du rayon réfracté dans le milieu considéré. Ainsi, l'indice de réfraction mesuré est déterminé à $20 \pm 0,5^\circ$ et rapporté à la raie D du sodium ($\lambda = 589,3\text{nm}$), le symbole est donc n_D^{20} . L'indice de réfraction est déterminé grâce à un réfractomètre de marque ABBE.

- Viscosité

La détermination de la viscosité est effectuée par un viscosimètre capillaire. La viscosité de l'huile est mesurée à 20°C. La viscosité (η) est donnée par la formule suivante : $\eta = k \rho t$.

ou k est la constante de l'appareil, ρ est la masse volumique de l'huile et t est temps d'écoulement, de l'huile en secondes.

- Indice d'acide

L'indice d'acide I_A est le nombre qui exprime en milligramme la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres présents dans 1 gramme de substance. Pour déterminer l'indice d'acide, 2 g de l'huile totale des graines de *Nigella sativa* sont solubilisés dans 10 ml d'un mélange alcool et d'éther (v/v) neutralisé au préalable par l'hydroxyde de potassium 0,1 M en présence de 0,5 ml de solution de phénolphthaléine. La titration a été réalisée par l'hydroxyde de potassium 0,1M. L'indice d'acide est déterminé comme suit :

$I_A = 5,610 \frac{n}{m}$, n : le nombre de ml de l'hydroxyde de potassium, m : la masse de l'huile.

- Indice d'esters

L'indice d'ester est le nombre I_E qui exprime en mg la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la saponification des esters présents dans 1 g de substance. Il est calculé à partir de l'indice de saponification I_S et l'indice d'acide selon la formule $I_E = I_S - I_A$

- Indice d'hydroxyde

L'indice d'hydroxyde I_{OH} est le nombre qui exprime en mg la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation de l'acide qui se combine par acylation à 1g de substance. Afin de déterminer l'indice d'hydroxyde, nous avons introduit dans un ballon de 150 ml muni d'un réfrigérant, 2g de l'huile auquel 5ml de la solution d'anhydride acétique sont ajoutés. Après chauffage au bain marie et refroidissement du mélange à température ambiante, 5 ml d'eau sont ajoutés. Le mélange est chauffé une deuxième fois au bain marie pendant 10min. Après refroidissement, le réfrigérant et les parois du ballon sont rincés avec 5ml d'une solution de méthanol neutralisé au préalable en présence d'une solution de phénolphthaléine. La titration est effectuée avec l'hydroxyde de potassium alcoolique 0,5M.

$$I_{OH} = 28,05 (n_2 - n_1) / m + I_A$$

n_2 : nombre de ml de l'hydroxyde de potassium alcoolique de l'essai blanc; n_1 : nombre de ml de l'hydroxyde de potassium alcoolique de l'échantillon analysé, m : masse de l'échantillon.

- Indice d'iode

L'indice d'iode I_I est le nombre qui exprime en g la quantité d'halogène, calculée en iode, susceptible d'être fixée par 100g de substance. L'indice d'iode est déterminé en introduisant 0,5g d'huile totale des graines de *Nigella sativa* solubilisé dans 15ml de chloroforme dans un récipient de 250ml muni d'un bouchon rodé. 25 ml de solution de bromure d'iode (10%) sont ajoutés. Après addition de 10 ml d'une solution d'iodure de potassium à 100g/l et de 100ml d'eau, la mélange est titré par le thiosulfate de sodium 0,1M jusqu'à disparition presque totale de la coloration jaune. Cinq ml d'une solution d'amidon sont ensuite ajoutés tout en continuant la titration jusqu'à disparition de la coloration. L'indice d'iode est calculé en appliquant la formule suivante : $I_I = 1,269 (n_2 - n_1) / m$ ou n_2 est nombre de ml de thiosulfate de sodium 0,01M de l'essai blanc, n_1 est le nombre de ml de thiosulfate de sodium 0,1 M ml l'échantillon analysé et m est la masse de l'échantillon.

- Indice de peroxyde

L'indice de peroxyde I_p est le nombre qui exprime en milliéquivalents d'oxygène actif la quantité de peroxyde contenue dans 1 Kg de substance, déterminé par la méthode suivante : 2g de l'huile totale des graines de *Nigella sativa* ont été mélangés avec 30 ml d'un mélange chloroforme / acide acétique glacial (2v/3v), déposés dans une fiole conique à bouchon rodé. Après une minute d'agitation, 0,5ml d'une solution saturée d'iodure de potassium sont ajoutés et le mélange est titré par le thiosulfate de sodium 0,01M. L'indice de peroxyde est calculé selon la formule :

$I_p = 10 (n_2 - n_1) / m$ ou n_2 est nombre de ml de thiosulfate de sodium 0,01M de l'essai blanc, n_1 est le nombre de ml de thiosulfate de sodium 0,1 M ml l'échantillon analysé et m est la masse de l'échantillon.

- Indice de saponification

L'indice de saponification I_s est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres et à la saponification des esters présents dans 1g de substance. La méthode de détermination de l'indice de saponification est décrite comme suit : 5 g de l'huile de *Nigella sativa* sont mélangés avec 25,0ml d'hydroxyde de potassium alcoolique 0,5M et chauffée à reflux pendant 30min. La titration est effectuée par l'acide chlorhydrique 0,5M, immédiatement après ajout de 1ml de solution de phénolphthaléine.

L'indice de saponification est donné par la formule $I_s = 28,05(n_2 - n_1) / m$ ou n_2 est le nombre de ml de l'acide chlorhydrique 0,5M de l'essai blanc, n_1 est le nombre de ml de l'acide chlorhydrique 0,5M ml de l'échantillon analysé et m est la masse de l'échantillon.

- Insaponifiables

Le mot 'insaponifiable' s'applique aux substances non volatiles à 100-105°C obtenues, par extraction, avec un solvant organique d'une solution de la substance à examiner après la saponification. Le résultat est exprimé en pourcentage (m/m). Le procédé expérimental utilisé est le suivant : Dans un ballon de 250ml muni d'un réfrigérant, nous avons introduit 5g de l'huile totale des graines de *Nigella sativa*, auxquels nous avons ajouté 50 ml de solution alcoolique d'hydroxyde de potassium 2M. Le mélange est chauffé au bain marie pendant 1heure et sous agitation circulaire. Après refroidissement à une température inférieure à 25°C, le contenu est transvasé dans une ampoule à décantation et on y ajoute 100ml d'eau. Le mélange est lavé (3 x 100ml) par éther exempt de peroxydes. Les liquides étherés sont ensuite réunis dans une autre ampoule à décantation contenant 40 ml d'eau. Après séparation des deux phases, la phase étherée est récupérée et lavée (2 x 40 ml) initialement à l'eau et ensuite avec 40 ml d'une solution d'hydroxyde de potassium à 30g/l. Ce lavage est répété plusieurs fois jusqu'à ce que la phase aqueuse ne soit plus alcaline. La phase étherée est transvasée dans un autre ballon. Après élimination de l'éther, le résidu est séché à 100-105°C jusqu'à masse constante. Les insaponifiable sont déterminés par la formule **Insaponifiable = 100 a / m %** ou a est la masse du résidu et m est la masse de l'échantillon.

2.4. Détermination qualitative et quantitative des acides gras par CPG

L'analyse des acides gras par chromatographie en phase gazeuse a été réalisée selon le protocole standard de la pharmacopée européenne (**Conseil de l'Europe, 2005**) et appliquée au laboratoire de pharmacognosie, bromatologie et nutrition humaine (faculté de pharmacie, Université Libre de Bruxelles, Belgique).

- Conditions de chromatographie en phase gazeuse

L'appareil utilisé lors de cette analyse est un CG-17A (Gaz chromatograph, Shimadzu). La colonne, de dimension 25 cm x 0,32 mm, utilisée pour l'identification et le dosage des acides gras est une colonne WCOT (fused silica coating FFAP CB chrompack). La température de l'injecteur et du détecteur a été programmée à 250°C. La température du four est programmée en trois phases; la température initiale à 80°C durant 1 min, la température de 80 °C à 230°C, à raison de 8°C par min. et la température finale est maintenue à 230°C pendant 6 h. Le gaz vecteur est l'hélium avec un débit de 2,1 ml/min et une pression de 59 kPa. Le volume injecté est de 1µl.

- Préparation des solutions

a) Préparation des solutions des témoins d'acides gras méthyles

10 mg le linoléate de méthyle, 35mg de caprate de méthyle et 20mg de deux esters méthyliques (caprylate de méthyle et stéarate de méthyle) sont mélangés et dissous dans 25ml de n-hexane dans un ballon. Dans un autre ballon de 25 ml, 10 mg de deux esters (myristate de méthyle et palmitate de méthyle), 8 mg de linoléate de méthyle, 30mg de laurate de méthyle et 40mg de méthyle sont mélangés. Dans ce ballon, on introduit 2,5 ml de la solution précédente. Le volume est complété au trait de jauge à l'aide du même solvant.

2,5ml de cette dernière solution, sont introduits dans un flacon muni d'un bouchon à septum. Ensuite, on a ajouté 2,5 ml de la solution du standard interne d'acides gras méthyles et 5 ml de n-hexane. Le mélange est soigneusement homogénéisé durant 1min au vortex.

b) Préparation des solutions à analyser et méthylation des acides gras

150 mg de l'huile totale des graines de *Nigella sativa* et de ses fractions sont solubilisés dans 25 ml du n-hexane. 2,5 ml de chaque solution sont mélangés avec 2,5 ml de la solution du standard interne. Le solvant n-hexane est ensuite évaporé sous flux d'azote. Après dessiccation sous vide poussé, durant 15 min., le résidu est repris dans 0,5 ml de HCl méthanolique de normalité de 0,5 (methanolic-HCl 0,5 N, Supelco). Fermé hermétiquement, le flacon est soumis durant 1 min. à l'action d'un agitateur vortex, ensuite durant 5min à l'action d'un bain à ultrasons puis maintenu à 80°C durant 30 min.

Après refroidissement, 2,5ml de la solution d'hydroxyde de sodium (0,5N) et 10,0 ml de n-hexane sont introduites successivement. Le mélange est agité au vortex durant 60 sec. 500 mg de chlorure de sodium sont introduits et le mélange est agité à nouveau, au vortex, pendant 60sec. Après séparation des phases, la phase supérieure organique est prélevée et desséchée, pendant 5 min., sur sulfate de sodium anhydre avant l'analyse par CPG. L'analyse est effectuée trois fois pour chaque échantillon. Trois solutions de témoins d'acides gras méthylés sont utilisées. L'injection se fait alternativement et à trois reprises; chaque solution d'échantillon suivie d'une solution de témoins d'acides gras méthylés.

2.5. Détermination qualitative et quantitative des phytostérols et des alcools supérieurs par CPG

De la même manière que pour les acides gras, l'analyse des phytostérols et alcools supérieurs a été réalisée selon le protocole de la pharmacopée européenne (**Conseil de l'Europe, 2005**).

- Conditions de chromatographie en phase gazeuse

L'appareil utilisé lors de cette analyse est un CG-17A (Gaz chromatograph, Shimadzu). La colonne utilisée pour l'identification et le dosage des acides gras est une colonne WCOT fused silica de dimension 25m x 0,32mmID, coating CP-sil-5 CB chrompack. La température de l'injecteur est programmée à 340°C, celle du détecteur FID est à 340°C également. La température du four est programmée en trois phases ; la température initiale à 200°C durant 1min, la température de 200°C à 325°C, à raison de 8°C par min. La température finale est maintenue à 325°C pendant 20min. Le gaz vecteur est l'Hélium ayant un débit de 2,0ml/min et une pression de 49 kPa. Le volume injecté de la solution témoin est de 1µl et celui de la solution à examiner est de 0,5µl.

- Préparation des solutions et silylation des stérols et alcools supérieurs

Le standard interne est le cholestane dans le mélange silylant à 1mg/ml. La solution des témoins des stérols et alcools supérieurs est préparée en silylant à 2,5mg de chacun des composés (1-eicosanol, 1- tétracosanol, 1-hexacosanol, 1-octacosanol et le 1-triacontanol) et à 3,5mg de chacun des stérols (campestérol, stigmastérol, β -sitostérol et stigmastérol). L'ensemble de ces composés est dissous dans 5ml de la solution de standard interne. La silylation est effectuée par contact pendant 90 min à température ambiante.

La silylation des échantillons à analyser est réalisée ou 1,5 g de chaque échantillon (huile totale des graines de *Nigella sativa* est de ses fractions) est solubilisée dans 25 ml de la solution d'hydroxyde de potassium (2N). Ce mélange est chauffé à reflux durant 30 min. et 25 ml d'eau, préalablement refroidie à 4°C, sont rajoutés. La solution ainsi obtenue est ensuite

transvasée dans une ampoule à décantation de 250 ml. La solution aqueuse est rincée, successivement par 50 ml, 40 ml et 30 ml d'éther éthylique. Les phases étherées réunies sont lavées par des portions successives de 50 ml d'eau est ce jusqu'à disparition de la réaction alcaline de la phase aqueuse de rinçage. Après dessiccation pour 30 min, sur sulfate de sodium anhydre, la solution étherée est filtrée et évaporée à sec sous pression réduite dans un ballon rodé à fond rond. Le résidu d'évaporation est ensuite solubilisé dans 10 ml d'éther diéthylique. 2 ml de cette solution sont introduits dans un flacon muni d'un bouchon à septum, qui est à son tour introduit dans un ballon à fond rond, et ensuite soumis à une évaporation à sec sous pression réduite. Après dessiccation sous vide poussé durant 15 min, le résidu d'évaporation est additionné de 1 ml de la solution standard interne et la silylation est effectuée par contact durant les 90 min d'incubation à température interne. L'analyse par chromatographie en phase gazeuse est en suite effectuée. L'analyse est réalisée trois fois pour chaque fraction.

2.6. Identification des triglycérides de graines par HPLC-ELSD detector

- Conditions de la chromatographie liquide de haute performance dotée d'un ELSD

L'appareil utilisé est un instrument Gilson, doté d'une pompe model 321, d'un détecteur UV-VIS model 156 et équipé avec un injecteur automatique model 234. Un deuxième détecteur ELSD (Evaporating Light Scattering detector, Alltech, ELSD 2000 ES) est ajouté à l'équipement. L'analyse est réalisée par un système de colonnes montées en série de dimension de 0,2 m x 4 mm. La phase stationnaire est formée d'octadecylsilyl silica gel et la phase mobile est constituée de deux mélanges de solvants :

La phase mobile A : Acétone- chlorure de méthylène- acétonitrile (5/15/80).

La phase mobile B : Acétonitrile- acétone- chlorure de méthylène (20/20/60).

Le programme de gradient est le suivant :

de 0 à 15 min : 0 à 25 % B

de 15 à 15 min : 25 % B

de 25 à 70 min : 25 à 100 % B

de 70 à 75 min : 100 à 0 % B

de 75 à 80min : 0 % B

Le flux de la phase mobile est de 0.5 ml par min et le volume d'injection est de 10 µl. La détection ELSD est réalisée à une température d'évaporation 70°C, une température de nébulisation de 45°C et avec un flux du gaz vecteur (azote) de 1,7 L/min.

- Préparation des solutions

La solution témoin est obtenue en solubilisant 80 mg de trioléine dans 50 ml d'un mélange de d'acétone et de chlorure de méthylène (v/v).

Les solutions des échantillons à analyser sont préparées avec une concentration de 1 mg/ml du mélange de solvants acétone et de chlorure de méthylène (v/v). L'analyse par HPLC est réalisée directement sans aucun traitement supplémentaire des échantillons.

3. Etude des propriétés hypoglycémiantes de *Nigella sativa*

3.1. Recherche de l'activité hypoglycémiante chez le rat diabétique

Deux types d'extraits (huile totale et l'extrait méthanolique) ont été utilisés dans cette étape de l'étude. L'évaluation de l'activité hypoglycémiante de l'huile et de l'extrait méthanolique des graines de *Nigella sativa* chez les rats diabétiques a été réalisée au laboratoire de pharmacologie et toxicologie du centre de recherche et de développement du groupe pharmaceutique SAIDAL à Alger.

3.1.1. Induction du diabète chez le rat par la streptozotocine et la nicotinamide

La nicotinamide (pyridine-3- carboxylic acide amide, Sigma Aldrich, Germany) et la streptozotocine (N-(Methylnitrosocarbomoyl)- α -D-glucosamine, Sigma Aldrich, Germany) sont dissoutes dans du sérum physiologique (pH 7) et administrées aux doses de 230 mg et 65 mg/kg de poids de l'animal.

Deux types d'extraits des graines *Nigella sativa*, l'extrait méthanolique délipidé et l'huile totale, ont été utilisés pour leur propriété hypoglycémiante potentielle. Les deux extraits sont administrés, par voie orale, sous forme d'émulsion dans de l'eau à une dose journalière de 400 mg / kg de poids de l'animal.

Le diabète est induit par la streptozotocine associée à la nicotinamide (STZ/N). Ce model a été proposé par Masiello et ses collaborateurs en 1998 (**Masiello et al., 1998**). Il permet l'induction d'un diabète expérimental proche du diabète de type II mais sans l'effet de l'obésité qui accompagne généralement le diabète de type II. En effet, l'administration de la nicotinamide quelques minutes avant l'injection de streptozotocine permet la protection partielle de 40 % des cellules β des ilots de Langerhans du pancréas contre l'action de la streptozotocine (**Masiello et al., 1998**).

Expérimentalement, la nicotinamide est injectée par voie intra-péritonéale suivie, 15 min après, par l'injection par voie intra-péritonéale aussi de la streptozotocine. A fin de vérifier l'installation du diabète chez les rats traités, la glycémie est mesurée 48h à 72h après l'administration de la nicotinamide et de la streptozotocine.

3.1.2. Répartition des animaux

Après l'induction du diabète et le dosage de la glycémie, les rats diabétiques sont répartis en quatre groupes de 10 rats. Le cinquième groupe est le témoin où les rats sont normaux. Un traitement quotidien par sonde gastrique des rats par les extraits ou la métformine a débuté 72h après l'induction du diabète. Ces groupes sont organisés de la manière suivante:

Le groupe 1: rats diabétiques, traités par 400mg/kg/jour de l'huile totale de *Nigella sativa*.

Le groupe 2: rats diabétiques, traités par 400mg/kg/jour de l'extrait méthanolique délipidé.

Le groupe 3: rats diabétiques, traités par 400mg/kg/jour de métformine.

Le groupe 4: rats diabétiques non traités.

Le groupe 5: rats non diabétiques non traités (Normal).

3.1.3. Dosage des paramètres sanguins

72h après l'induction du diabète, la glycémie est mesurée selon la méthode de la glucose oxydase (kit de ELI TECH, France). Afin de suivre glycémie lors de la durée de l'expérience, ce dosage est également effectué le 15^{ème} et le 30^{ème} jour.

Le cholestérol et les triglycérides ont été dosés le 30^{ème} jour à la fin de l'étude. Les méthodes de dosage sont colorimétriques et sont respectivement la cholestérol oxydase-peroxydase et glycérol-3-oxydase-peroxydase (kits de Sprinreact, Espagne). Le dosage de l'urée est effectué selon la méthode de l'urée oxydase (kit de Randox, Royaume Uni).

3.2. Effet hypoglycémiant post-prandial des extraits chez le rat diabétique

3.2.1. Evaluation in vivo

Ce test nous permet de déterminer l'action inhibitrice des extraits testés sur les glucosidases intestinales. Un prélèvement sanguin a été effectué chez tous les groupes de rats mis à jeun pendant 18 heures (premier prélèvement) à fin de mesurer leurs glycémies initiales (G_0). Après le dosage de glucose à jeun, chaque groupe de rats a reçu un volume de 2 ml de solution de l'extrait approprié par voie orale. Le lot de rats témoins (traités par un traitement standard) a reçu la même concentration en acarbose.

Après 40 minutes de l'administration des extraits, un volume de 2 ml de solution amidon ou de glucose (1g/kg, 0,5g/kg respectivement) a été administré par voie orale. 30 minutes après, un deuxième prélèvement sanguin a été effectué afin de déterminer la glycémie finale (G_1). Le groupe de rats témoins a reçu uniquement 2ml de solution de l'amidon.

- Répartition des animaux

Des rats normaux répartis sur 5 groupes contenant chacun 3 rats sont mis à jeun pendant 18 heures. Les groupes d'animaux ont été organisés comme suit :

Groupe 1 : rats non traités (NT) (eau distillée).

Groupe 2 : rats traités par l'huile totale (HT) (100mg/kg),

Groupe 3 : rats traités par l'huile polaire (100mg/kg),

Groupe 4 : rats traités par l'huile neutre (100mg/kg),

Groupe 5 : rats traités par l'acarbose (100mg/kg) (traitement standard)

Les extraits sont solubilisés dans de l'eau distillée. Des concentrations de 100 mg/ kg de chaque extrait ont été préparées. Les solutions de l'amidon et de glucose ont été préparées avec des concentrations respectives de 1 et 0.5 g/kg. Le volume final administré est de 2ml.

3.2.2. Evaluation in vitro

L'effet hypoglycémiant post-prandial des extraits a été évalué en utilisant le test de l' α -glucosidase. Ce test a été mis au point suite à quelques modifications de la méthode de **Schäfer and Högger (2007)** et **Kim et al., 2005**).

Pour estimer leur activité potentielle sur l' α glucosidase, l'extrait méthanolique délipidé, l'huile totale et les fractions de l'huile de *Nigella sativa* obtenues par la chromatographie sur colonne ont été testés. De même la thymoquinone, le composé phénolique majoritaire de *Nigella sativa*, a été aussi évalué. Dans cette étude nous avons utilisé l'acarbose comme inhibiteur standard de l' α glucosidase.

- Réactifs

L' α -D- glucopyranosidase maltase de levure de Biochemika et son substrat, 4-paranitrophenyl α -D-glucopyranoside (Sigma). La thymoquinone est de pureté minimum de 99%, (Acros Organics) et l'acarbose en comprimé (100mg, Glucobay®) a été acheté chez une pharmacie à Bruxelles, Belgique.

- Solutions

Une solution stock de l' α glucosidase de 36 UI (unités internationales) a été préparée en solubilisant l'enzyme dans du tampon phosphate (0,1 M et pH 6,9). La concentration finale, de l' α -glucosidase est de 0,075 U, par test. Le substrat est préparé dans le même tampon phosphate (0,1M et pH 6,9) et la concentration finale par test est de 0,95mM.

La première concentration de l'acarbose, inhibiteur de l' α glucosidase, est choisie d'une façon qu'elle soit 10 fois supérieure à la concentration IC_{50} déterminée par **Schäfer et Högger (2007)**, soit 1,01 mg/ml. Cette solution est obtenue par la solubilisation de l'acarbose dans le tampon phosphate (0,1M et pH 6,9). Les dilutions effectuées, ont permis d'avoir une large gamme de concentration, allant de 1010 à 10,1 μ g/ml.

La thymoquinone est solubilisée dans du DMSO à une concentration finale de 1mg/ml. Les extraits testés sont également solubilisés dans du DMSO, la solution stock est à 26,6 mg/ml.

- Test

Le test a été effectué sur des microplaques de 96puits. Dans la première plaque, dite de dilution, ont été déposées les solutions mères des extraits de *Nigella sativa*, thymoquinone et l'acarbose au niveau des premières rangées des plaques (les puits 1). Puis des dilutions 50 /50 ont été effectuées à partir des puits 1 jusqu'aux 12^{ème} puits.

Sur la deuxième plaque, dite de lecture, sont déposées 150µl d'enzyme dans chaque puits, auxquels sont ajoutés 50 µl des solutions des extraits dilués dans la plaque 1. Les plaques de lecture sont incubées pendant 10min à 37°C.

Grace au lecteur, la solution de substrat (50µl par puits) est automatiquement ajoutée dans chaque puits. La lecture de la DO se fait simultanément dans tout les 96 puits à 420 nm pendant 10min.

Le principe de la méthode est :

PNPG + alpha-glucosidase $\longrightarrow$ alpha-D-glucopyranoside + PNP (jaune)

Le taux d'inhibition de l' α -glucosidase est déterminé par la relation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(A \text{ control} - A \text{ extrait}) / A \text{ Control}] \times 100$$

3.3. Etude des effets sur les ilots de Langerhans

L'huile totale et ses deux fractions (polaire et neutre), extraites des graines de *Nigella sativa* et obtenues par fractionnement sur colonne de chromatographie, ainsi que la thymoquinone et la métformine ont été utilisées pour étudier leurs effets sur les ilots de Langerhans pancréatiques. L'estimation de l'effet des extraits des graines de *Nigella sativa* sur les îlots de Langerhans a été effectuée à l'institut Pasteur d'Algérie (Alger). La méthodologie est identique à celle utilisée pour l'étude physiopathologique du foie (voir les sections 3.4.2.4 et 3.4.2.5, pp 80-82).

4. Evaluation de l'hépatotoxicité des extraits des graines de *Nigella sativa*

4.1. Etude de l'activité hépatoprotective des extraits de *Nigella sativa* par PCLS

Cette étude a été réalisée au laboratoire de Biochimie et de Nutrition de l'université catholique de Louvain, Belgique. L'extrait méthanolique délipidé, l'huile totale et la fraction polaire totale de l'huile, obtenue par chromatographie sur colonne (gel de silice 60G, 70-230 Mesh ; 0,063-0,2 mm) ont été testés pour leur éventuelle propriété protectrice du tissu hépatique.

4.1.1. Préparation des tranches de foie

L'appréciation de l'activité hépato-protective des extraits de *Nigella sativa* est effectuée sur des couches minces précises et fraîches de foies de rats (PCLS pour precision-cut liver slices). Cette méthode d'estimation de la toxicité des extraits sur le tissu hépatique a été réalisée au laboratoire de biochimie métabolique de l'université catholique de Louvain à Bruxelles, Belgique. Des foies de rats, prélevés sur des rats Wistar males, ont été utilisés. Les rats ont été soumis à un cycle jour/nuit de 12heures et ont reçu de la nourriture standard et de l'eau *ad libitum* et mis à jeun la veille de l'expérimentation. Les poids des rats choisis sont compris entre 260 et 300 gr.

Le rat a été anesthésié, par injection intra-péritonéale, au pentobarbital sodique (Nembutal) à une concentration de 60 mg/kg. Après incision de la paroi abdominale, le foie est rincé par injection lente via la veine porte d'une solution Krebs-Ringer à 4°C (environ 10ml) pour éviter d'une part la toxicité des produits de dégradation de l'hémoglobine et d'autre part la coagulation du sang dans l'organe lors des manipulations ultérieures. Le rat est tué par incision dans les veines caves et meurt par exsanguination. Le foie est ensuite prélevé et placé dans un bain de tampon Krebs-Ringer à 4°C (Evdokimova et al., 2001).

Les différents lobes du foie sont séparés et divisés en cylindres à l'aide d'un tube en acier inoxydable d'un centimètre de diamètre adapté sur une foreuse tournant à une vitesse réduite. Ces cylindres de foies sont alors introduits dans le slicer (Krumdieck), dont le moteur anime une lame en acier inoxydable oscillante. De fines tranches, d'environ 200µm d'épaisseur, sont ainsi obtenues. Durant toute la manipulation, les tranches de foie sont maintenues constamment dans un tampon de Krebs-Ringer à 4°C préalablement oxygéné par un mélange O₂-CO₂ (95-5%) (Evdokimova et al., 2001).

Les tranches sont ensuite, placées pendant 30 min dans un milieu de pré-incubation oxygéné (tampon Krebs-Henseleit) à 4°C. Elles sont ensuite transférées du milieu de pré-incubation dans des fioles contenant 2 ml du tampon Krebs-Ringer. Les fioles sont oxygénées en permanence et incubées au bain marie chauffé à 37°C. (Evdokimova et al., 2001).

- Test

Les PCLS sont incubées en présence ou en absence d'extraits et en présence ou en absence de l'agent hépatotoxique, Acétaminophène (le paracétamol). La concentration finale en extrait est de l'ordre de 1mg/ml, la concentration maximale du d'Acétaminophène est de l'ordre de 10 mM. Les fioles, ainsi préparées, sont incubées durant 24h à 37°C sous agitation au bain marie et sous flux d'air O₂-CO₂ (95-5%).

4.1.2. Etude de la viabilité cellulaire

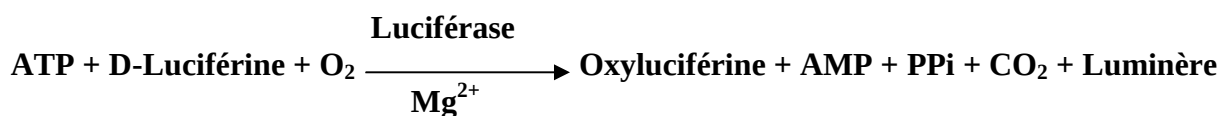
La viabilité des hépatocytes est estimée par le taux de l'ATP cellulaire exprimé en nano mole d'ATP par milligramme de protéines totales.

- Dosage des protéines

La quantité des protéines totales est mesurée par la méthode de Lowry (**Lowry et al., 1951**). Le principe du dosage consiste en premier lieu en la complexation des liaisons peptidiques par réaction avec les ions Ca^{++} et en révéler ensuite les résidus tryptophane et tyrosine en utilisant le réactif de Folin (acide phosphomolibdique et phosphotungstique). La densité optique est mesurée par spectrophotomètre à 660nm. La BSA est utilisée pour l'obtention de la courbe d'étalonnage. La concentration en protéine est exprimée en mg/ml.

- Dosage de l'ATP par bioluminescence

Le dosage de l'ATP par bioluminescence est basé sur la production de lumière induite par la réaction de l'ATP avec luciférase et la D-luciférine. Dans certaines limites, la lumière émise est directement proportionnelle à la concentration d'ATP. Ceci est illustré par la réaction suivante:



Les tranches de foie sont prélevées et soniquées immédiatement dans 1 ml d'une solution d'acide perchlorique (HClO_4) à 2%, provoquant la précipitation des protéines. La solution est alors centrifugée à 13000 tours/min pendant 1 min; 900 μl du surnageant sont prélevés, mélangés avec 120 μl d'une solution neutralisante KOH/KHCO_3 (3M) pour stabiliser l'ATP. Les contenus en ATP, sont mesurées à l'aide du Kit ATPlite assay system' par un luminomètre (Luminescence ATP Detection Assay System (ATPlite assay system) (PerkinElmer®, Belgium), et sont exprimées en nM ATP/mg de protéine.

4.2. Etude de l'hépatotoxicité par les méthodes classiques chez le rat

Les extraits des graines de *Nigella sativa* testés dans cette étude sont l'huile totale, les fractions polaire et neutre de l'huile totale. Des rats Wistar femelles âgés de 10 semaines et pesant approximativement 180 g ont été obtenus de l'animalerie du laboratoire de toxicologie et pharmacologie du CRD (centre de recherche et de développement) du groupe pharmaceutique Sidal (El mohamadia, Alger). Ces rats sont mis dans des cages inoxydables et sont adaptés au milieu environnemental et aux conditions du laboratoire pendant 21 jours

avant l'expérimentation. L'induction du diabète est réalisée selon la méthode de Massiello et ses collaborateurs avec quelques modifications (Massiello *et al.*, 1998).

4.2.1. Déroulement de l'expérience.

Les rats sont répartis en sept groupes différents. Chaque groupe est soumis à un traitement particulier selon le schéma, représenté par la figure 30. L'administration des traitements a été effectuée au 4^{ème} jour après l'induction du diabète. Durant l'expérience, les rats sont nourris par une alimentation standard et avec de l'eau *ad libitum*. La démarche expérimentale est expliquée sur la figure suivante :

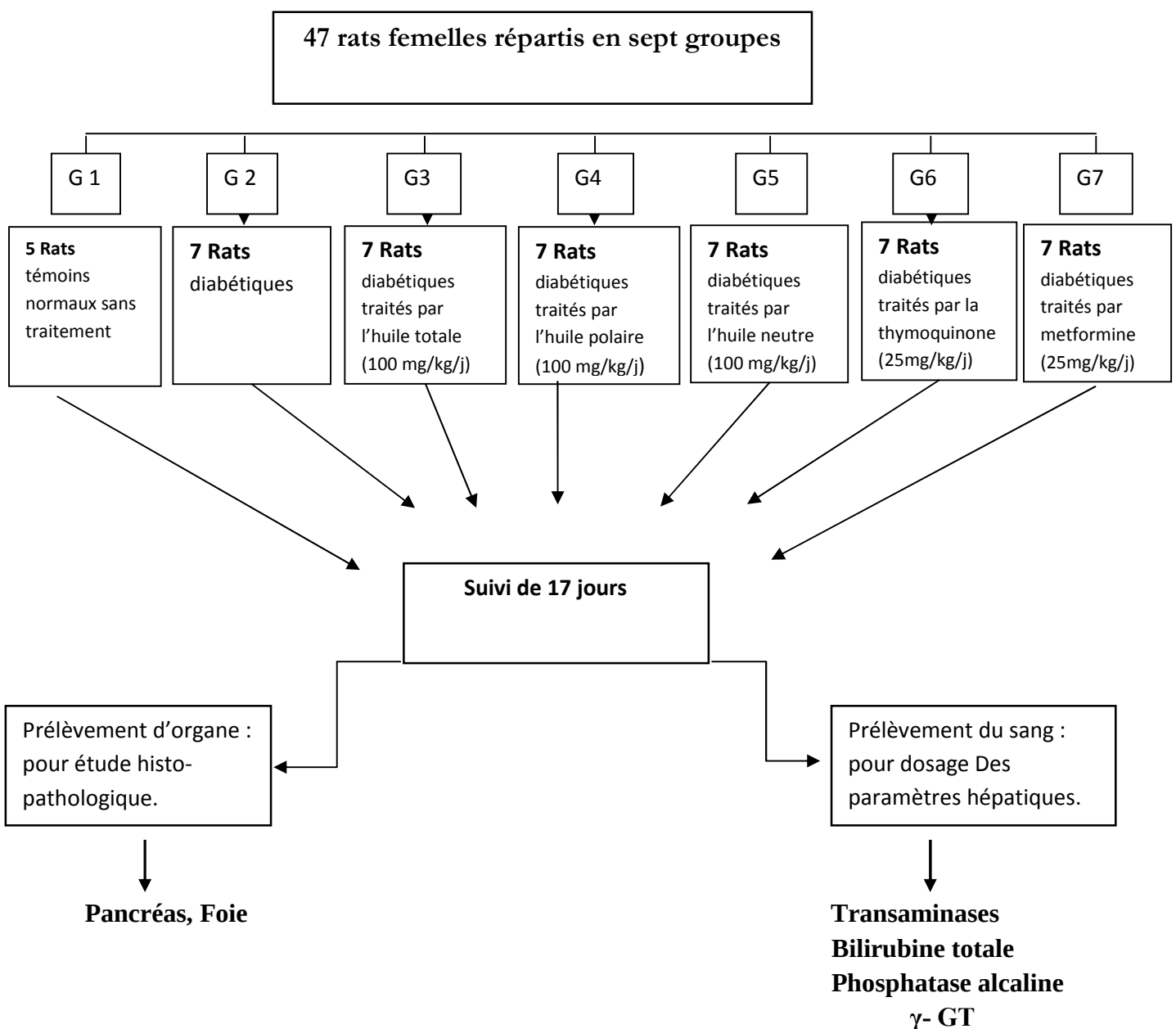


Figure 29: Protocole utilisé pour l'étude de l'hépatotoxicité chez des rats rendus diabétiques

4.2.2. Prélèvement sanguin

Les rats sont mis à jeun la veille du prélèvement après anesthésie à l'éther. Le sang est prélevé par ponction dans le sinus rétro-orbital à l'aide d'une pipette pasteur héparinée. Un léger mouvement rotatoire de la pipette perforant le sinus permet au sang de remonter par capillarité dans celle-ci. Le sang ainsi prélevé est recueilli dans des tubes à hémolyse héparinés. Après centrifugation à 3000 rpm pendant 15 minutes, le plasma recueilli est fractionné en aliquotes dans des tubes eppendorff et conservés à -20°C en vue du dosage des différents paramètres hépatiques.

4.2.3. Dosage des marqueurs hépatiques.

Au quatrième jour après l'administration de la N/STZ, nous avons confirmé l'installation du diabète par le dosage de la glycémie par la méthode de glucose oxydase (kit de Elitech Diagnostic, France). Au 17^{ème} jour de l'expérience, tous les rats ont été soumis au jeun durant une nuit. Le lendemain, le prélèvement sanguin a été effectué afin de réaliser le dosage des marqueurs hépatiques. Ainsi, tous les marqueurs sont dosés avec les kits spinreact (Espagne) : les taux des transaminases l'alanine aminotransferase (ALAT ou TGP) et l'aspartate aminotransferase (ASAT or GOT) ont été dosés selon la méthode décrite par Bergmeyer (**Bergmeyer et al., 1978**). Le taux de la gamma-glutamyl transpeptidase (γ GT) est déterminé selon la méthode de Szass (1969). La bilirubine totale est dosée selon la méthode de Jandrossik-Grof (**Jendrossik et Grof, 1938**), modifiée par Dumas (**Dumas et al., 1973**) et Finalement, la phosphatase alcaline (PA) a été déterminée selon la méthode de Hausmen et ses collaborateurs (Hausmen et al., 1967).

4.2.4. Prélèvement d'organes.

Le prélèvement d'organe s'est effectué selon le protocole du laboratoire de pharmacologie-toxicologie du CRD du groupe pharmaceutique SAIDAL. Les organes prélevés ont été, immédiatement, conservés dans le formol à 10% puis transportés au service de bio-pathologie de l'institut pasteur d'Alger pour l'étude histo-pathologique.

- Préparation de l'animal à l'autopsie

L'animal est mis à jeun la veille de l'autopsie. Le lendemain, il est sacrifié en le mettant sous une cloche en verre contenant un coton imbibé d'éther. L'animal est fixé en décubitus dorsal, sur une plaque en liège, les quatre membres attachés en abduction. Une petite incision est pratiquée au niveau du périnée puis une seconde incision est pratiquée du point de la première incision jusqu'au menton (**Figure 31**). Deux autres lignes d'incision perpendiculaires à la

première sont réalisées. Le dépouillement est réalisé à l'aide d'un bistouri en dilacérant le tissu conjonctif sous cutanée.

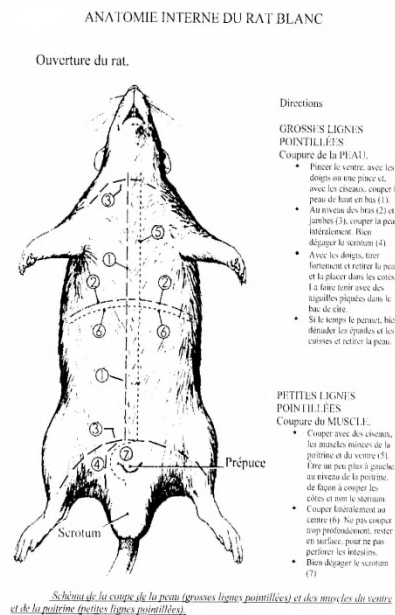


Figure 30: Autopsie de la cavité abdominale

- Autopsie de la cavité abdominale

Une incision longitudinale est réalisée le long de la ligne blanche de la pointe xiphoïdienne jusqu'à la symphyse pubienne et par deux incisions transversales en partant de la pointe xiphoïdienne jusqu'à l'hypochondre. Les deux pans de la paroi abdominale, vont être ensuite rabattus vers l'extérieur

Le prélèvement est réalisé rapidement afin d'éviter toute dessiccation des organes. Ces organes sont mis, très rapidement, dans la solution de fixation (2-3 minutes entre le prélèvement et la mise en fixation). Le volume du fixateur est 10 fois supérieur au volume de la pièce anatomique.

4.2.5. Etude histo-pathologique.

L'étude histo-pathologique a été effectuée au laboratoire de bio-pathologie de l'Institut Pasteur Algérie, selon le protocole expérimental du laboratoire qui consiste en :

- a) Déshydratation des prélèvements : les organes prélevés sont baignés dans 3 bains successifs concentrés d'éthanol, puis dans 3 bains successifs concentrés de xylène afin d'éliminer toute trace d'alcool.

- b)** Enrobage à la paraffine : l'inclusion est faite dans deux bains successifs de paraffine liquide pour que cette dernière s'infiltre dans les échantillons. Une fois la paraffine refroidie, on obtient un bloc qui sera facilement coupé.
- c)** Confection des coupes au microtome : le bloc est placé sur la base d'un microtome, appareil muni d'un couteau et d'un mécanisme d'avancement de sa base, qui permet de trancher le bloc à l'épaisseur désirée. Dans notre cas l'épaisseur est de 3-4 μ m. Les coupes obtenues sont montées sur des lames de verre préalablement recouvertes de gélatine puis sont séchées.
- d)** Déparaffinage : les coupes montées sur lames et séchées sont déparaffinées dans du xylène, réhydratées dans des bains successifs d'éthanol de moins en moins concentrés puis rincées avec de l'eau.
- e)** Coloration : effectuée en utilisant une combinaison entre deux colorants l'hématoxyline et éosine (HE).
- f)** Montage permanent entre lame et lamelle : ce montage permet de conserver les coupes colorées. Elles sont recouvertes d'une mince lamelle de verre ou de plastique scellée avec une colle.
- g)** Observation au microscope optique: l'observation a été pratiquée à l'aide un microscope optique doté d'un appareil photographique. Des photographies ont été prises pour chaque prélèvement.

5. Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de Moyenne $\pm$ Ecart-type. L'analyse de la variance est réalisée par le logiciel STASTICA (version 5). Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA/MANOVA, les différences sont considérées significatives avec $p \leq 0.05$ et très significatif lorsque $p \leq 0.01$.

1. Caractérisation de l'huile de *Nigella sativa*

1.1. Rendement de l'extraction

En synthèse de la littérature, les graines de *Nigella sativa* renferment des taux élevés en huile totale, compris entre 39.7 et 52.% (Ashraf et al., 2006; Ramadan et Mörsel, 2002ab). La variation dans la teneur en huile des graines est due à plusieurs facteurs tels que le biotope (Cheihk-Rouhou et al., 2007), la méthode d'extraction (Atta, 2003, Ramadan et Mörsel, 2002b) et l'espèce utilisée (Kökdil et Hilmaz, 2005). Dans cette étude, le rendement de l'extraction de l'huile totale, a été estimé à 28.45 ± 2.14 % (Tableau 13). La chromatographie sur colonne a permis d'extraire l'huile neutre totale (97.29 ± 0.3 %) et la fraction polaire totale à un taux de 2.71 ± 0.32 % (Tableau 13). Au total, sept sous-fractions apolaires et polaires sont obtenues ; les quatre premières sont très apolaires, obtenues uniquement avec le chloroforme (100 %), la fraction 5 est obtenue suite à une élution par le mélange chloroforme / acétone : 75 /25 %. La sixième fraction est éluee par l'acétone (100%) et enfin, la dernière fraction est éluee par une mélange de méthanol/acide acétique : 95/5 %. Toutes les fractions ainsi obtenues, à l'exception de la dernière, sont colorées. Leurs couleurs respectives varient du vert vif au jaune.

Tableau 13 : Rendement d'extraction de l'huile de *Nigella sativa* et de ses fractions

Fraction	Rendement d'extraction %
L'huile totale	28.45 ± 2.14
La fraction apolaire	97.29 ± 0.34
F1	52.01 ± 6.04
F2	25.87 ± 3.23
F3	2.59 ± 0.83
F4	16.81 ± 2.1
La fraction polaire	2.71 ± 0.32
F5	0.08 ± 0.01
F6	0.85 ± 0.17
F7	1.69 ± 0.52

L'huile totale est constituée de deux fractions majeures; la fraction neutre (apolaire), qui est la plus importante représentant environ 97%, et la fraction polaire qui ne que 3% de l'huile. Nos résultats sont identiques aux travaux publiés par Ramadan et Mörsel (2002a) qui ont obtenu 3-4% de la fraction polaire et 96-97% de la fraction neutre. La ressemblance des résultats est due à la l'utilisation du même procédé d'extraction.

1.2. Caractéristiques physico chimiques de l'huile des graines de *Nigella sativa*

La détermination des indices physico-chimique de l'huile est une étape très importante dans son identification. Dans cette étude, la caractérisation des indices physico-chimiques de l'huile totale extraite des graines de *Nigella sativa*, localement cultivées en Algérie, a été réalisée selon la pharmacopée européenne et les résultats sont présentés sur le tableau 14.

Tableau 14 : Différents indices de l'huile de *Nigella sativa*

Paramètres	L'huile
Densité relative	0,81± 0,02
Indice de réfraction à 20°C	1,472 ± 0,08
Viscosité méthode au tube capillaire (millipascals / second)	14,03 ± 1,06
Viscosité méthode sur appareil à mobile tournant (millipascals /second)	19 ± 1
Indice d'acide (mg de KOH /100g d'acide gras totaux)	37,3 ± 2,04
Indice de peroxyde (meq O ₂ /g d'huile)	11 ± 0,5
Indice d'iode (g d'I ₂ /100g d'huile)	114 ± 2
Indice de saponification (mg de KOH/g d'huile)	211, 31± 4,7
Indice d'hydroxyle (mg de KOH/g d'huile)	121,39 ± 5,3
Indice d'ester (mg de KOH/g d'huile)	174,01
Insaponifiable (%)	5 ± 0,03

- La densité relative

La densité relative en générale, dépend de l'insaturation et de l'état d'oxydation de l'huile. Ainsi, La densité relative de *Nigella sativa* cultivée en Algérie est de 0,81± 0,02. La densité de l'huile de *Nigella sativa* a été déterminée dans plusieurs études. Par exemple, l'huile de *Nigella sativa* cultivée en république tchèque et en Inde ont des densités de 0.89 et 0.92 respectivement (Ustun et al., 1990) alors que celle de l'huile des graines de *Nigella sativa* cultivée en Turquie et en Egypte est de 0.92 (Ustun et al.1990 et Atta, 2003).

- L'indice de réfraction

L'indice de réfraction est déterminé grâce à un réfractomètre et dépend de la température et de la radiation incidente. L'indice de réfraction de l'huile de *Nigella sativa* cultivée en Algérie est de 1,472 ± 0,08, similaire a ce qui a été rapporté pour l'huile des graines de *Nigella sativa*

des variétés Egyptienne, Tunisienne et Turquie (Üstun et al., 1990; Atta, 2003; Cheikh-Rouhou et al., 2007).

- La viscosité

La viscosité est liée à la longueur de la chaîne carbonée et à sa saturation. Elle augmente avec la longueur de la chaîne et diminue avec l'insaturation carbonique. La viscosité des graines de *Nigella sativa* cultivée en Algérie, mesurée par tube capillaire, est de $14,03 \pm 1,06$ millipascals/seconde, valeur nettement plus importante en comparaison aux valeurs de 11,23 et 5,99 millipascals/seconde rapportée par Cheikh-Rouhou (2007) pour les huiles des graines de *Nigella sativa* de Tunisie et de l'Iran respectivement.

- L'indice d'acide

L'indice d'acide montre le taux d'acides gras libres d'une huile. En effet, cet indice d'acide nous renseigne sur la qualité de cette huile et la durée de conservation. Dans cette étude l'huile des graines de *Nigella sativa* contient $37,3 \pm 2,02$ % d'acides gras libres. Ce résultat indique que l'indice d'acide de l'huile de *Nigella sativa* de l'Algérie est très élevé comparé à celui de *Nigella* cultivée en Iran ($18,6 \pm 0,28$ %), de Tunisie ($22,7 \pm 0,35$) (Cheikh-Rouhou et al., 2007), de l'ex-Tchécoslovaquie (varie de 14,68 à 29,42 %) et de l'Egypte (30,3 %) (Ustun et al., 1990). L'indice d'acide de l'huile des graines de la *Nigella* cultivée en Algérie est cependant proche de celui de des graines de la *Nigelle* cultivée en dans trois régions de Turquie (36,74, 39,61 et 40,60 %) et de celui des graines de la Nigelle de l'Inde (40,64 %). La variabilité de la teneur en acides gras libres et donc celle de l'indice d'acidité de l'huile de *Nigella sativa* cultivées dans de diverses régions pourrait être expliquée par la variation du biotope et de la méthode d'extraction (Cheikh-Rouhou et al., 2007, Atta, 2003).

- L'indice de peroxyde

L'indice de peroxyde nous renseigne sur la qualité des huiles. Il permet d'apprécier le degré d'altération des matières grasses. L'indice de peroxyde de l'huile de *Nigella sativa* Algérienne ($11 \pm 0,5$ meq O_2 /g d'huile) est relativement élevé comparé aux indices de peroxyde des huiles de *Nigella sativa* cultivées en Tunisie et en Iran, 5.65 et 4.35 meq O_2 /g d'huile respectivement (Cheikh-Rouhou et al., 2007).

La valeur élevée de l'indice de peroxyde de l'huile de *Nigella sativa* cultivée en Algérie peut être expliquée par une altération éventuelle au cours du procédé d'extraction.

- Indice d'iode

L'indice d'iode indique le degré d'insaturation des huiles. La forte insaturation suggère que l'huile contient des niveaux élevés en acides insaturés tels que l'acide oléique et linoléique. L'indice d'iode mesuré pour l'huile de *Nigella sativa* cultivée en Algérie est de 114 ± 2 g d'I₂/100g d'huile. Cette valeur est proche de celles rapportées; $119 \pm 3,45$ g d'I₂/100g d'huile pour *Nigella sativa* de Tunisie et $101 \pm 2,74$ g d'I₂/100g d'huile pour celle cultivée en Iran (**Cheikh-Rouhou et al., 2004 et 2007**). Üstun et ses collaborateurs ont également mesuré les indices d'iode des huiles de *Nigella sativa* cultivée dans différentes régions et les valeurs obtenues sont aussi relativement proches de celle trouvée pour l'huile de *Nigella sativa* cultivée en Algérie. A titre d'exemple, l'huile des graines issues de la République Tchèque a un indice d'iode qui varie de 107,4 à 110,9 g d'I₂/100g d'huile (**Üstun et al., 1990**), celui de l'huile des graines de l'Inde 116,6 g d'I₂/100g d'huile (**Cheikh-Rouhou et al., 2004 et 2007**), d'Egypte 114,6 g d'I₂/100g d'huile (**Atta, 2003**) et de Turquie 116,63,112,32 et 122,13 g d'I₂/100g d'huile respectivement pour trois régions du pays (**Üstun et al., 1990**).

- L'indice de saponification

L'indice de saponification indique la teneur en acides gras libres et estérifiés. L'huile de *Nigella sativa* Algérienne possède un indice de saponification de $211.31 \pm 4,7$ mg de KOH/g d'huile. Cette valeur est identique à celle de l'huile de *Nigella sativa* Tunisienne ($211 \pm 5,32$ mg de KOH/g d'huile) déterminé par Cheikh-Rouhou et ses collaborateurs (**2007**). Les indices de saponification des huiles de *Nigella sativa* décrites dans la littérature (**Cheikh-Rouhou et al., 2007, Üstun et al., 1990, Atta, 2003, Ramadan et Mörsel, 2002**) sont très variables ; L'huile des graines cultivées en Inde possède un indice de saponification de 169,9 mg de KOH/g d'huile, celle d'Egypte varie de 166 à 196,3 mg de KOH/g d'huile, de Konya (Turquie) 196,1 mg de KOH/g d'huile, république tchèque varie de 201,98 à 210,6 mg de KOH/g d'huile, de Kutahya (Turquie) 212,75 mg de KOH/g d'huile, Iran $218 \pm 8,24$ mg de KOH/g d'huile de de Denizli (Turquie) 230,50 mg de KOH/g d'huile. Ces différences sont probablement dues à la variation des teneurs en acides gras libres et estérifiés. Une valeur élevée peut orienter cette huile vers la fabrication du savon, c'est le cas de l'huile *Nigella sativa* (**Cheikh-Rouhou et al., 2007**).

- L'Indice d'hydroxyle

L'indice d'hydroxyle nous renseigne sur la teneur en acides gras libres. L'huile de *Nigella sativa* possède un indice d'hydroxyle de $121,39 \pm 5,3$ mg de KOH/g d'huile.

- L'indice d'ester

L'indice d'ester est égal à l'indice de saponification pour les glycérides purs. Il permet de déterminer la masse molaire des glycérides, donc leur structure. Lorsque le corps gras analysé contient un mélange de glycérides et d'acides gras libres, l'indice d'ester est égal à la différence entre l'indice de saponification et l'indice d'acide.

Nous avons calculé les indices d'ester de l'huile des graines de *Nigella sativa* cultivée en Algérie, mais aussi pour les huiles de *Nigella sativa* égyptienne selon les données des travaux de Atta (2003) et aussi pour *Nigella sativa* de Tunisie et d'Iran à partir des données de Cheikh-Rouhou et ses collaborateurs (2007) : L'indice d'ester de l'huile de *Nigella sativa* Algérienne est de 174.01, cette valeur est très proche à celle de *Nigella sativa* Tunisienne qui a une valeur de 189 alors que celui de l'huile des graines de l'Iran est de 199. Cette différence est due à la variation dans les indices de saponification et les indices d'acides, mais aussi au procédé d'extraction.

- Les insaponifiables

Les insaponifiables des huiles végétales sont considérés comme antioxydants naturels. Ils sont capables de minimiser l'oxydation des huiles pendant le stockage. Dans cette étude, on a constaté que l'huile des graines de *Nigella sativa* algérienne est riche en insaponifiables (5 %). Ce résultat est semblable à celui de l'huile de *Nigella sativa* de Denizli en Turquie (5,38%)(Üstun et al., 1990), mais élevé par rapport à celui des graines de *Nigella sativa* de l'Inde (4 %) , de l'Egypte (0,66 %), de Kutahya (Turquie) (3,47 %), Konya (Turquie) (4,0 %), (Üstun et al., 1990). Cette variation dans les teneurs en insaponifiables est en relation avec la méthode d'extraction et l'origine de la graine (Cheikh-Rouhou et al., 2007).

L'huile des graines de *Nigella sativa* algérienne est très riche en insaponifiables. Ceci pourrait expliquer par le fait que l'extraction a été réalisée par des solvants organiques. Ces derniers ont la capacité d'extraire la plus part des substances liées aux lipides, y compris les stérols, les vitamines liposolubles et les pigments.

En conclusion, les différences observées lors de la détermination des indices pourraient être expliqué par l'origine des graines mais aussi par la méthode d'extraction. En effet, en 2003, Atta a démontré que la méthode d'extraction influence aussi les valeurs des indices. A titre d'exemple, pour l'huile des graines de *Nigella sativa* cultivée en Egypte, l'indice de peroxyde est de $13,5 \pm 0,2$ lorsque l'extraction est faite à froid alors que cet indice est de $10,7 \pm 0,4$ lorsque celle-ci est effectuée par les solvants. Même chose pour l'indice de saponification et les insaponifiables qui ont les valeurs respectives de $192 \pm 2,0$ et $1,0 \pm 0,4$ pour une extraction

  pression pour des taux de $203 \pm 1,0$ et $1,8 \pm 0,3$ lorsque l'extraction est réalisée par les solvants.

Les caractéristiques physico-chimiques de l'huile de *Nigella sativa* sont aussi influencées par d'autres facteurs tels que le cycle végétatif des graines, le choix du cultivar ou la variété des graines, Les conditions climatiques et la méthode d'extraction (Cheikh-Rouhou et al., 2007, Atta, 2003).

1.3. Composition en acides gras

La détermination de la composition en acides gras de l'huile totale et des quatre fractions neutres a été obtenue par chromatographie en phase gazeuse (CPG), en utilisant D-7000 CG System, et les chromatogrammes obtenus sont présentés sur les figures 32 à 37 suivantes.

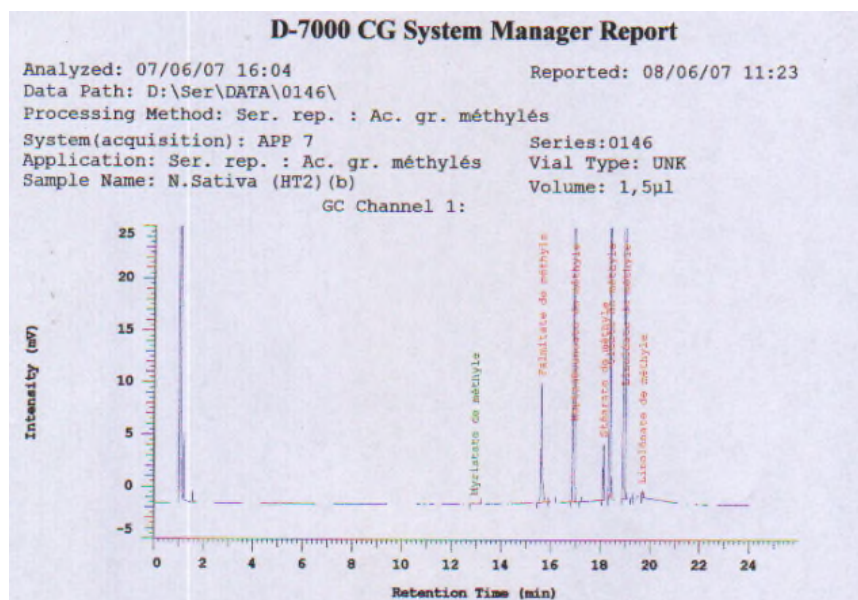


Figure 31: Composition en Acides gras de l'huile totale de *Nigella sativa*

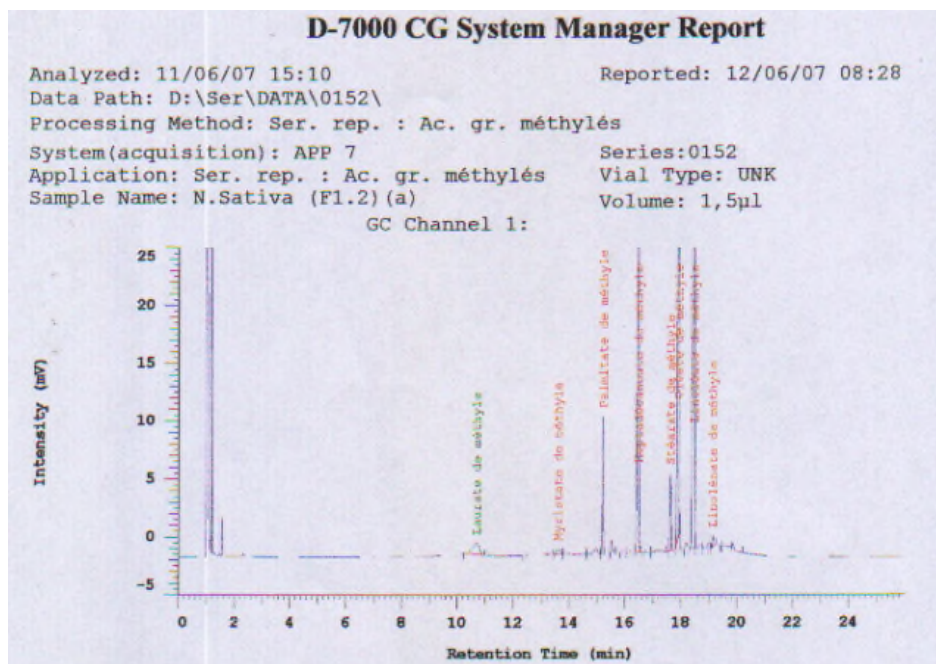


Figure 32: Composition en acides gras de fraction neutre F1 de l'huile totale

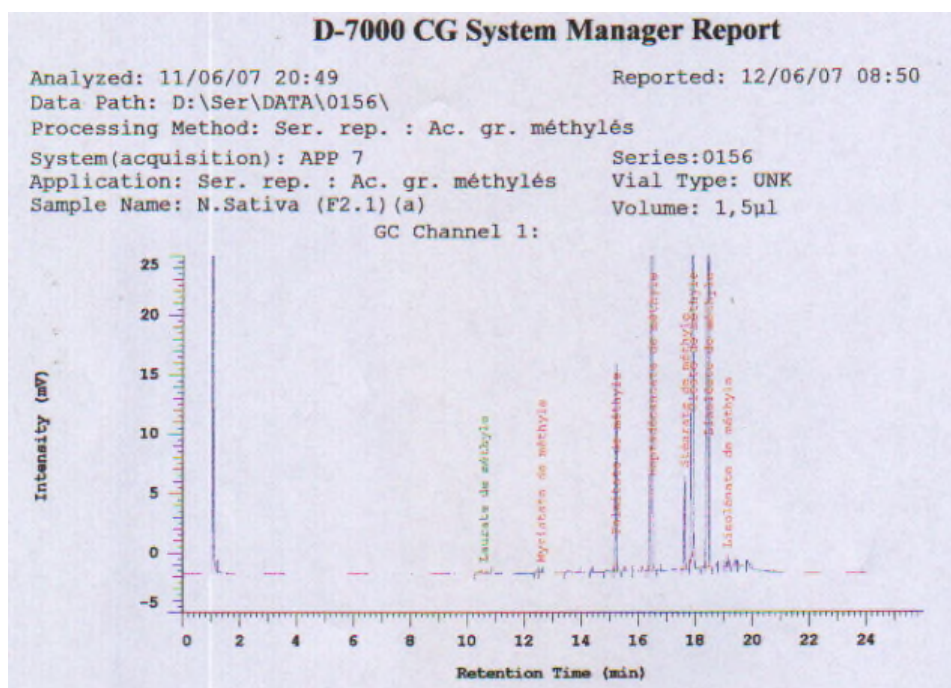


Figure 33 : Composition en acides gras de fraction neutre F2 de l'huile totale

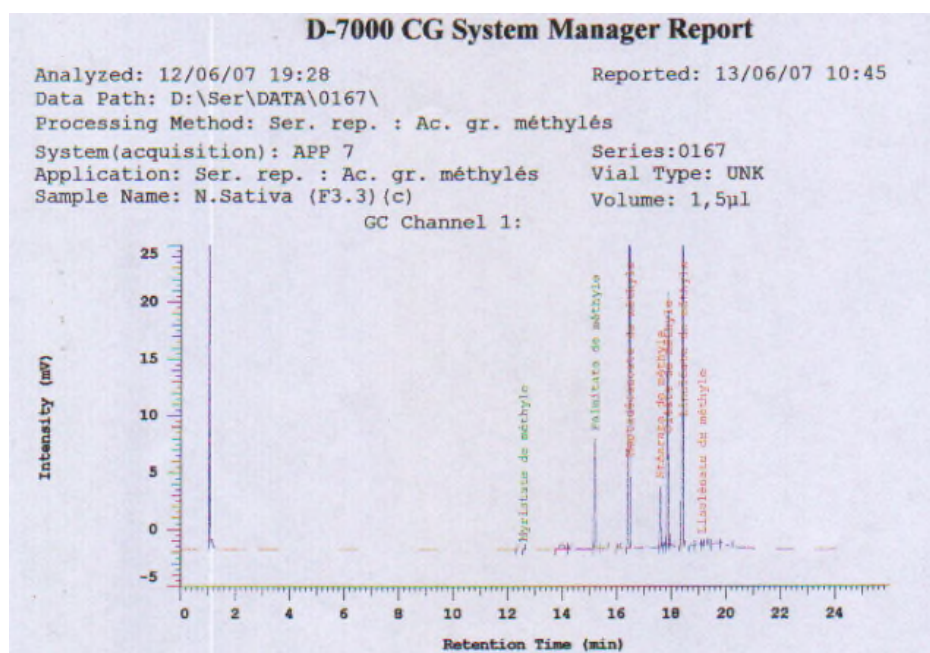


Figure 34 : Composition en acides gras de fraction neutre F3 de l'huile totale

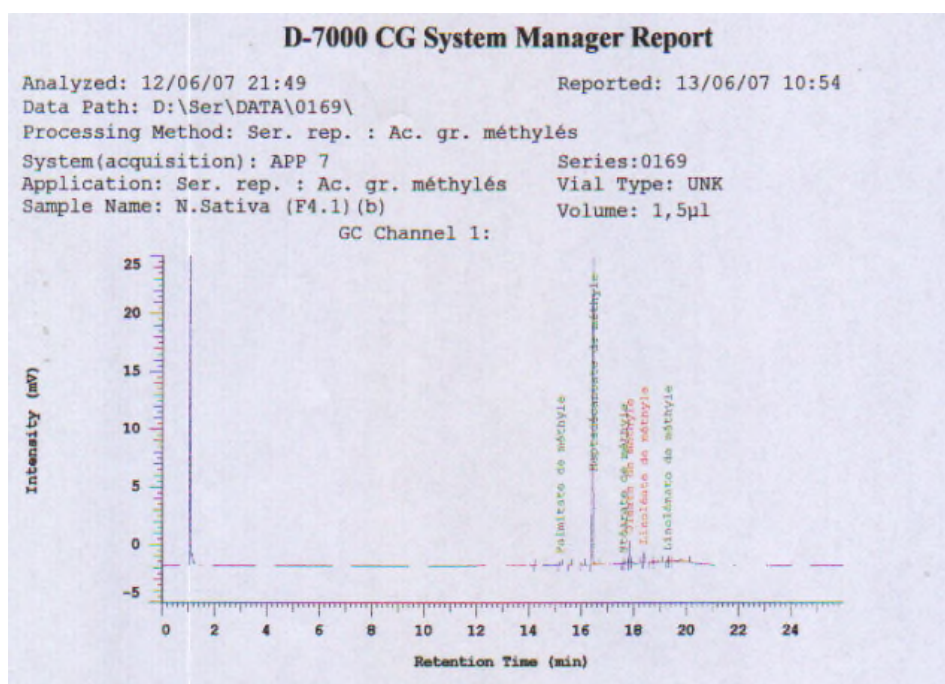


Figure 35 : Composition en acides gras de fraction neutre F4 de l'huile totale

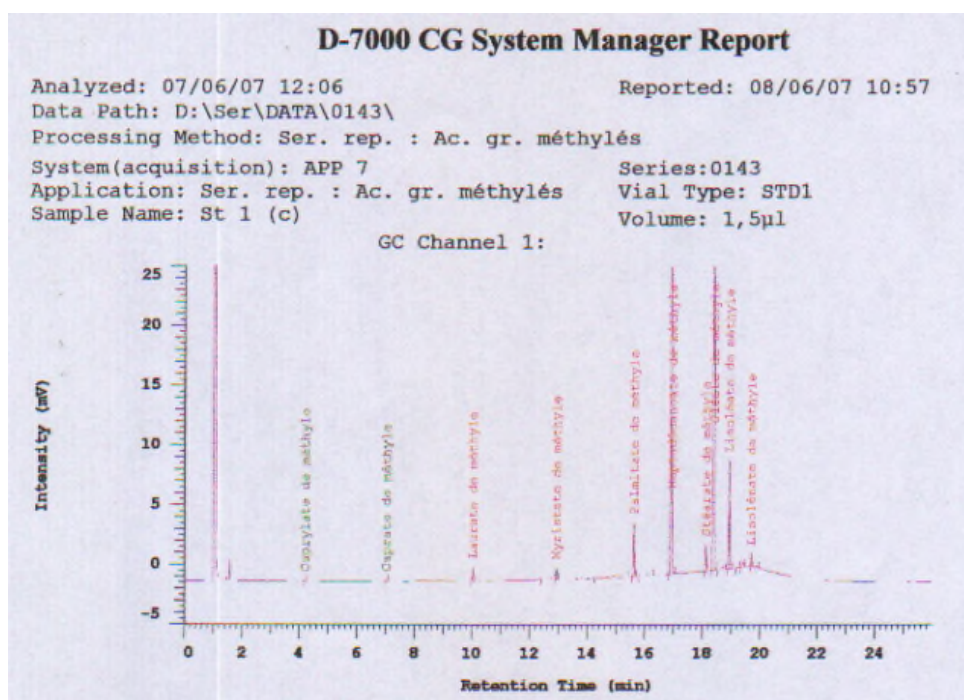


Figure 36 : Composition en acides gras de la solution des acides gras standards

La nature et les teneurs en acides gras de l'huile totale et de ses fractions neutres ont été déterminés grâce à l'utilisation des solutions d'acides gras standards en concentrations connues.

a) Rapport des acides identifiés par rapport au total

Les teneurs en acides gras exprimées dans le tableau 15 ont été calculées par rapport à la somme des aires intégrées de tous les pics, identifiés ou non. Ainsi, le taux des acides gras identifiés par rapport à la surface globale est représenté par le tableau 16 ou il en ressort qu'à l'exception de la fraction F4, la quasi-totalité des pics a été identifié.

b) Acides gras saturés majoritaires

D'une manière globale, l'acide gras saturé majoritaire est l'acide palmitique. Ce dernier est présent avec un taux de 9.44 % dans l'huile totale. C'est également l'acide gras majoritaire dans les trois premières fractions avec des taux respectifs de 4.49, 7.12 et 10.13 %. La quatrième fraction, contrairement aux premières fractions, présente l'acide stéarique comme l'acide gras saturé majoritaire avec un taux de 10.16 %. Dans cette fraction, l'acide palmitique n'est présent qu'à un taux de 3.56 % (Tableau 15).

Tableau 15: Identification des acides gras de l'huile totale de *Nigella sativa* et de ses quatre fractions neutres

Temps de rétention	Acides gras déterminés	teneur estimée (%)
L'huile totale		
12.93	Acide myristique	0.36
15.63	Acide palmitique	9.44
18.12	Acide stréarique	3.56
18.39	Acide oléique	24.26
18.99	Acide linoléique	62.01
19.70	Acide linolénique	0.35
Fraction 1		
10.69	Acide laurétique	2.92
13.61	Acide myristique	0.73
15.21	Acide palmitique	4.49
17.63	Acide stréarique	2.95
17.90	Acide oléique	26.51
18.48	Acide linoléique	62.01
19.15	Acide linolénique	0.44
Fraction 2		
10.57	Acide laurétique	0.68
12.59	Acide myristique	0.08
15.20	Acide palmitique	7.12
17.61	Acide stréarique	3.86
17.89	Acide oléique	28.33
18.46	Acide linoléique	59.56
19.13	Acide linolénique	0.36

Fraction 3		
12.58	Acide myristique	0.06
15.19	Acide palmitique	10.13
17.59	Acide stréarique	5.93
17.85	Acide oléique	24.61
18.42	Acide linoléique	55.82
19.13	Acide linolénique	0.31
Fraction 4		
12.32	Acide myristique	1.12
15.17	Acide palmitique	3.56
17.63	Acide stréarique	10.16
17.83	Acide oléique	33.81
18.38	Acide linoléique	16.5
19.22	Acide linolénique	15.22

L'acide myristique est l'acide gras insaturé minoritaire. Il est présent dans l'huile totale avec un taux de 0.36 %. Sa teneur est de 0.73, 0.08, 0.06 et 1.12 % pour les fractions neutres F1, F2, F3 et F4 respectivement. Il est aussi important de noter que l'acide laurétique a été déterminé uniquement dans les fractions F1 et F2 avec une teneur de 2.92 et 0.68 % respectivement.

Tableau 16 : Taux des acides gras identifiés dans l'huile de *Nigella sativa* et ses fractions neutres

Fraction	surface identifiée/ surface totale
Huile totale	99.99
F1	99.92
F2	99.99
F3	95.92
F4	79.64

c) Acides gras insaturés majoritaires

Avec une teneur de 62 %, l'acide palmitique est l'acide gras insaturé majoritaire de l'huile des graines de *Nigella sativa* locale. La fraction neutre F1 présente la même teneur en cet acide gras que l'huile totale. Les fractions neutres F2 et F3 présentent des taux plus faibles (59.56 et 55.82 % respectivement). Cependant, dans la dernière fraction (F4) l'acide oléique est l'acide gras insaturé est majoritaire, alors que l'acide linoléique ne représente que 16.5 % des acides gras totaux.

L'analyse des résultats indique aussi que l'acide insaturé dont la teneur est la plus faible est l'acide linoléique avec un taux ne dépassant pas 0.44 % et une teneur qui varie entre 0.31 % et 0.44 % dans l'huile totale et ses trois premières fractions neutres (HT : 0.35 %, F1 : 0.44 %, F2 : 0.36 %, F3 : 0.31 %). La dernière fraction neutre, F4, présente une teneur exceptionnellement élevée en cet acide gras représentant 15.22 %.

d) Rapport insaturé/saturé

Le taux des acides gras insaturés par rapport aux acides gras saturés a été calculé pour l'huile totale (HT) et ses quatre fractions neutres (F1, F2, F3 et F4). On souligne la richesse d'une huile en acides gras insaturés et donc la qualité de cette huile. Les rapports calculés sont présentés (Tableau 17).

Tableau17 : Rapports calculés des acides gras insaturés / acides gras saturé de l'huile totale (HT) et de ses quatre fractions neutres (F1, F2, F3 et F3).

Fraction	Insaturés/saturés
HT	6.49
F1	8.02
F2	7.52
F3	5.01
F4	3.07

Le taux des acides gras insaturés sur les saturés est de 6.49 pour l'huile totale des graines de *Nigella sativa* locale. Ce rapport est plus important pour la fraction F1 (8.02). Il diminue d'une fraction à une autre pour atteindre une valeur de 3.07 pour la fraction F4.

Notre étude montre que globalement l'huile de *Nigella sativa* cultivée en Algérie a une composition en acides gras assez proche de celles cultivée dans d'autres régions du monde.

Nickavar et ses collaborateurs (**Nickavar et al., 2003**) ont analysé la composition en acides gras de l'huile des graines de *Nigella sativa* cultivée en Iran. Une analyse comparative montre qu'à l'exception de l'acide Eicosadiénoïque, qui n'a pas été détecté dans l'huile de *Nigella sativa* cultivée en Algérie, la composition en acide gras est proche. L'acide gras saturé majoritaire dans l'huile iranienne est l'acide palmitique avec un taux de 12.5 % alors que l'acide gras insaturé majoritaire est l'acide linoléique (55.6 %). Le taux des acides gras identifiés dans l'huile totale est de 99.5% (**Nickavar et al., 2003**).

Dans une autre étude la composition de l'huile des graines de *Nigella sativa* cultivée en Tunisie a été comparée à une autre cultivée en Iran. L'étude montre une petite variation dans la composition en acides gras ou l'acide linoléique est présent avec un taux de 50.31 ± 0.25 % dans l'huile de Tunisie contre 49.15 ± 0.06 % dans l'huile d'Iran. L'acide palmitique est de 17.2 ± 0.15 %, l'acide myristique 0.35 ± 0.02 %, l'acide stéarique 2.84 ± 0.08 %, l'oléique 25.0 ± 0.24 % et l'acide linoléique est de 0.34 ± 0.06 % dans l'huile tunisienne. L'huile iranienne est composée d'acide myristique (0.41 ± 0.05 %), d'acide palmitique (18.4 ± 0.25 %), d'acide stéarique (3.69 ± 0.12 %), d'acide linoléique 49.15 ± 0.06 % et de l'acide linoléique (0.32 ± 0.05 %) (**Cheikh-Rouhou et al., 2007**).

La composition en acides gras varie sensiblement en fonction des espèces de Nigelles. En effet, l'étude menée par Kökdil et ses collaborateurs sur dix espèces différentes de Nigelles cultivées en Turquie montre une variation plus ou moins importante en acides gras et en taux d'acides saturés et insaturés (**Kökdil et al., 2005**). La teneur en acide gras semble aussi changer en fonction de la méthode utilisée pour l'extraction de l'huile (**Ramadan et Morsel, 2002**).

1.4. Composition en triglycérides

L'analyse des triglycérides n'est pas une étude courante vue les difficultés de sa réalisation. La première analyse des triglycérides de l'huile de *Nigella sativa* a été réalisée par Ramadan et Mörcel (2002) en utilisant un détecteur FID pour la détection des TG. Ces chercheurs ont identifié six triglycérides (TG); C48 :0 (3.5%), C50 :1 (1.5%), C52 :2 (17.0%), C54 :0 (3.8%), C54 :3 (42.9%) et C54 :6 (31.3%).

Dans la présente étude, les triglycérides de l'huile totale de *Nigella sativa* et de ses quatre fractions neutres ont été déterminés par HPLC à détection FID et ELSD. L'utilisation d'un deuxième détecteur (ELSD, Evaporating Light Scattering Detector) améliore la détection de ces composés. Les chromatogrammes sont présentés (Figures 37 à 40).

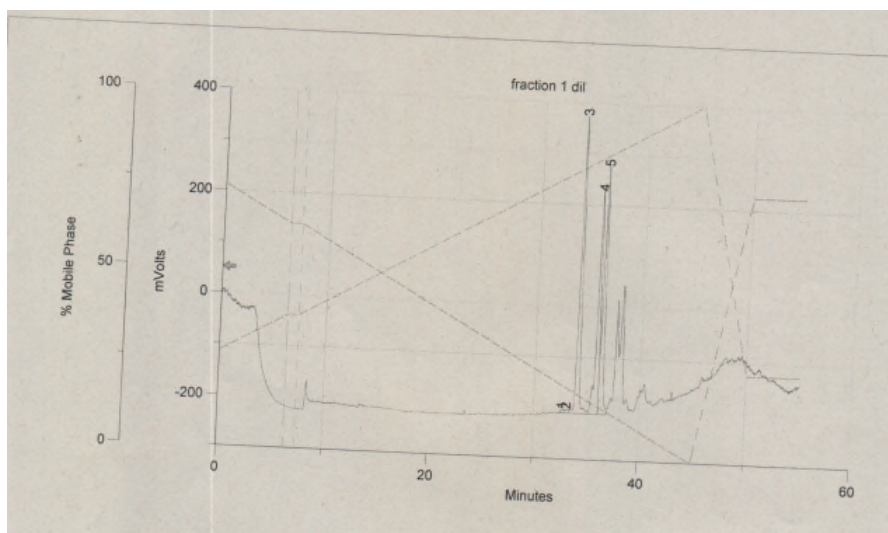


Figure 37: Chromatogramme HPLC-ELSD des triglycérides de la fraction neutre F1

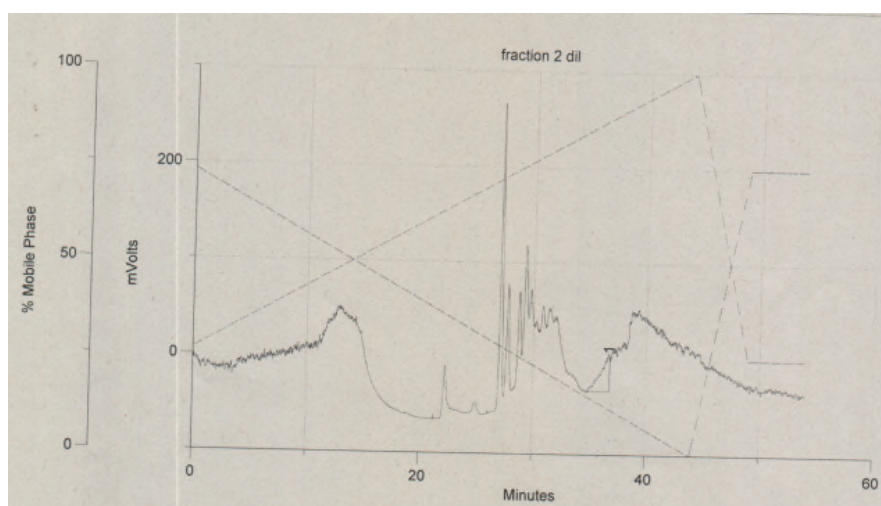


Figure 38: Chromatogramme HPLC-ELSD des triglycérides de la fraction neutre F2

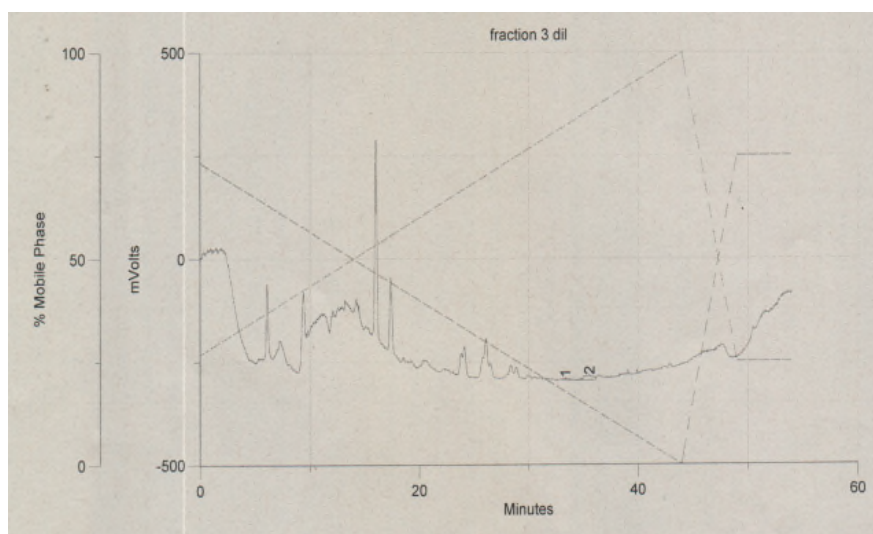


Figure 39 : Chromatogramme HPLC-ELSD des triglycérides de la fraction neutre F3

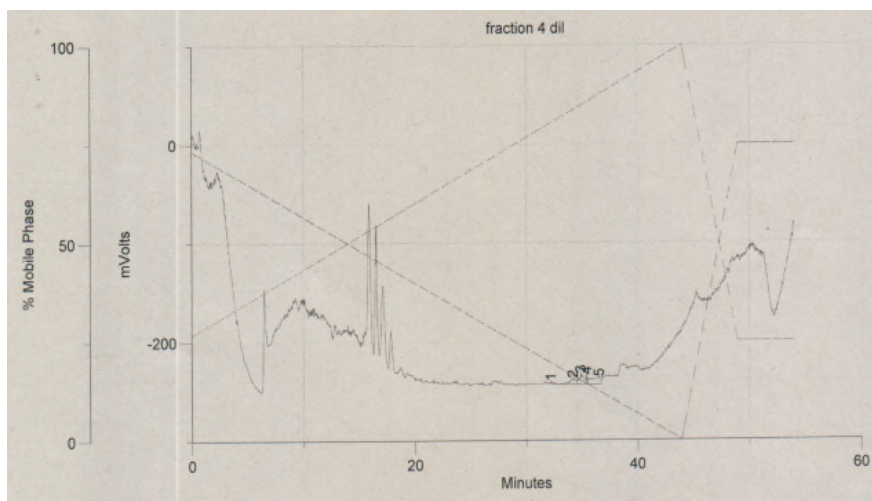


Figure 40 : Chromatogramme HPLC-ELSD des triglycérides de la fraction neutre F4

L'identification des triglycérides a été obtenue suite à la comparaison des temps de rétention de nos échantillons à ceux de l'huile des graines de sésame, réalisées dans les mêmes conditions. Le tableau 18 résume les temps de rétentions utilisés pour l'identification des TG.

Tableau 18 : Temps de rétention des différents triglycérides

Temps de rétention	Triglycérides
38.5	Trioléine
25.7	LLLn
27.6	OLnLn
30.6	LLL
32.7	OLL
33.3	PLL
35.1	OOL
35.7	POL
36.3	PPL
37.4	OOO
38.1	POO
40.0	SOO

L'étude des profils chromatographiques des différentes fractions a permis de déterminer leur composition en triglycérides (Tableau 19).

Tableau 19 : Détermination de la teneur en triglycérides de l'huile totale des graines de *Nigella sativa* cultivée localement et de ses quatre fractions neutres.

Temps de rétention	Triglycérides déterminés	% estimé
Fraction 1		
32.71	OLL	0.57
33.1	OOL	0.77
34.08	PLL	36.9
35.89	POL	30.4
36.33	PPL	31.36
37.5	OOO	Traces
37.9	SOL	Traces
38.0	POO	Traces
38.3	ND	Traces
Fraction 2		
25.7	LLLn	ND
27.6	OLnLn	ND
30.6	LLL	ND
32.4	OLL	ND
33.5	PLL	ND
36.75	PPL	ND
Fraction 3		
24.1	ND	16.2
25.7	LLLn	35.2
27.6	OLnLn	6.14
28.2	ND	6.4
30.1	LLL	Traces

33.38	PPL	4.4
35.58	POL	31.4
Fraction 4		
32.21	OLL	2.88
34.20	OOL	23.34
34.90	SLL	38.81
35.43	POL	4.67
36.53	PPL	40.29

Les résultats indiquent une variation assez importante dans la composition en TG dans les quatre fractions. En effet, dans la fraction F1, huit TG ont été détectés avec des taux différents. Les trois TG majoritaires sont les PLL, PPL et POL dont les teneurs sont respectivement 36.9, 31.36 et 30,4%. La fraction F2 présente six TG mais malheureusement la détermination des leurs taux n'a pas été possible. Dans la fraction F3, cinq TG ont été caractérisé dont le LLLn est le plus abondant avec un taux de 35.2 %. Enfin, dans la F4, cinq TG ont été identifiés. Le PPL est présent avec un taux de 40.29 % suivi par le SLL à un taux de 38.81 %.

1.5. Composition en stérols et alcools supérieurs

L'étude de la composition d'une huile végétale en stérols apporte des informations importantes quant à la qualité de cette huile. Ainsi, l'étude de la composition de l'huile des graines de *Nigella sativa* en stérols peut apporter certaines explications par rapport à ses effets pharmacologiques.

Après l'élimination des saponifiables, la teneur de l'huile totale des graines de *Nigella sativa* et ses quatre fractions neutres en stérols et alcools *supérieurs* a été déterminée dans la partie insaponifiable de l'huile totale. Rappelons que cette dernière ne constitue qu'environ 5 % de l'huile. Les chromatogrammes obtenus sont présentés (Figures 42 à 46).

D-7000 CG System Manager Report

Analyzed: 09/07/07 13:54 Reported: 09/07/07 14:45
 Data Path: D:\Ser\DATA\0194\
 Processing Method: Ser. rep. : Stér. & Alc.sup.
 System(acquisition): APP 7 Series:0194
 Application: Ser. rep. : Ac. gr. méthylés Vial Type: UNK
 Sample Name: N.Sativa (HT) Volume: 1,5µl

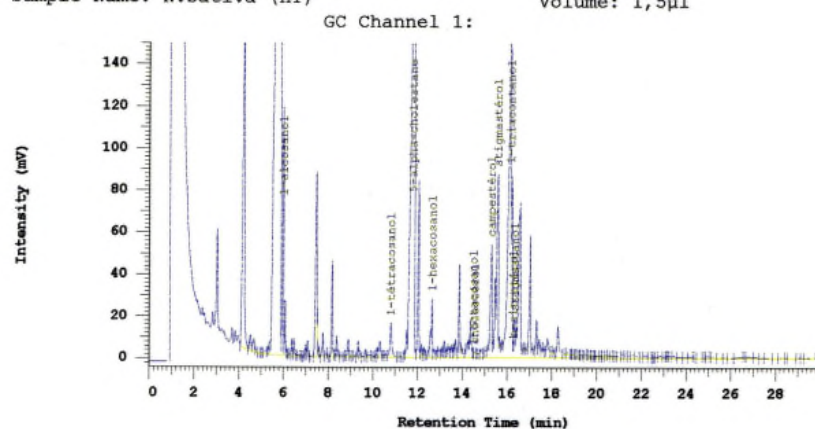


Figure 41: Chromatogramme des stérols et alcools supérieurs de l'huile totale

D-7000 CG System Manager Report

Analyzed: 09/07/07 09:34 Reported: 09/07/07 11:15
 Data Path: D:\Ser\DATA\0188\
 Processing Method: Ser. rep. : Stér. & Alc.sup.
 System(acquisition): APP 7 Series:0188
 Application: Ser. rep. : Ac. gr. méthylés Vial Type: UNK
 Sample Name: N.Sativa (F1) Volume: 1,5µl

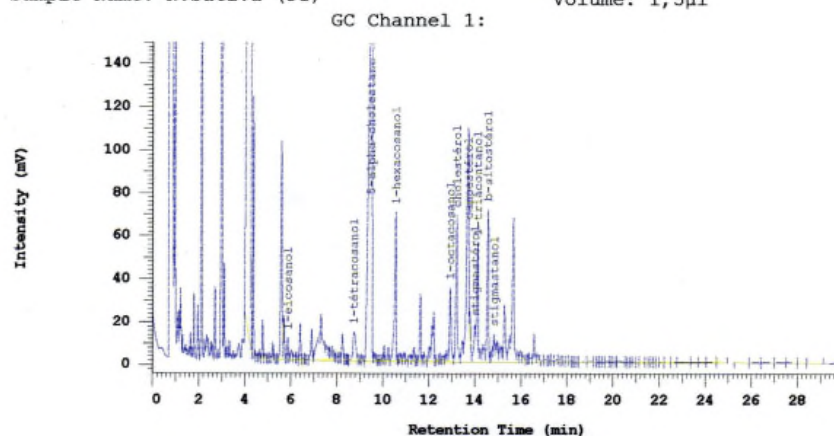


Figure 42: Chromatogramme des stérols et alcools supérieurs de la fraction 1

D-7000 CG System Manager Report

Analyzed: 09/07/07 12:27 Reported: 09/07/07 14:14
 Data Path: D:\Ser\DATA\0192\
 Processing Method: Ser. rep. : Stér. & Alc.sup.
 System(acquisition): APP 7 Series:0192
 Application: Ser. rep. : Ac. gr. méthylés Vial Type: UNK
 Sample Name: N.Sativa (F4) Volume: 1,5µl

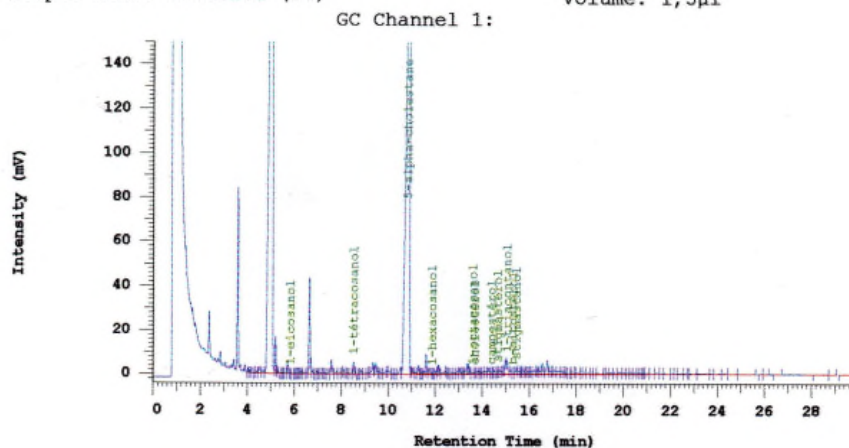


Figure 45 : Chromatogramme des stérols et alcools supérieurs de la fraction 4

L'utilisation des solutions des stérols et alcools supérieurs standards a permis l'identification de ces composés dans l'huile et dans ces fractions neutres grâce à la comparaison des temps de rétentions (**Tableau 20**). Les teneurs exprimées sont calculées dans la fraction des insaponifiables.

Tableau 20 : Composition en stérols et alcools supérieurs de l'huile totale des graines de *Nigella sativa* et de ses quatre fractions neutres.

Temps de rétention	Nature du composé	Teneur estimée (%)
L'huile totale		
6.00	1-eicosanol	1.79
10.81	1-tetracosanol	0.62
12.65	1-hexacosanol	0.50
14.48	1-octacosanol	0.001
14.55	Cholestérol	0.02
15.31	Campesterol	1.65

15.59	Stigmastérol	2.71
16.17	1-triacontanol	7.89
16.29	b-sitostérol	T (0.0007)
16.35	Stigmastanol	0.79
Fraction 1		
5.87	1-eicosanol	0.22
8.75	1-tetracosanol	0.95
10.57	1-hexacosanol	2.45
12.93	1-octacosanol	1.17
13.21	Cholestérol	2.39
13.71	Campestérol	5.60
14.00	Stigmastérol	0.64
14.12	1-triacontanol	2.11
14.58	b-sitostérol	2.34
14.83	Stigmastanol	0.41
Fraction 2		
5.89	1-eicosanol	0.04
8.87	1-tetracosanol	0.59
10.89	1-hexacosanol	0.20
13.01	1-octacosanol	0.14
13.27	Cholestérol	0.13
13.62	Campestérol	0.52

13.98	Stigmastérol	9.38
14.45	1-triacontanol	4.25
14.58	b-sitostérol	4.28
14.83	Stigmastanol	0.75
Fraction 3		
5.85	1-eicosanol	1.87
8.38	1-tetracosanol	1.02
11.86	1-hexacosanol	0.08
13.50	1-octacosanol	0.20
13.69	Cholestérol	1.62
14.32	Campestérol	0.03
14.76	Stigmastérol	0.19
15.13	1-triacontanol	0.30
15.27	b-sitostérol	0.40
15.41	Stigmastanol	0.09
Fraction 4		
5.83	1-eicosanol	0.02
8.85	1-tetracosanol	0.33
11.87	1-hexacosanol	0.01
13.60	1-octacosanol	0.05
13.67	Cholestérol	0.04
14.40	Campestérol	0.04

14.41	Stigmastérol	0.10
15.05	1-triacontanol	0.43
15.31	b-sitostérol	0.09
15.54	Stigmastanol	0.22

T : traces.

Remarque : le temps de rétention du standard interne, 5- α -cholestane, est environ 11 min.

Le calcul des taux des stérols de chaque fraction dans la fraction des insaponifiable est présentée sur le tableau suivant :

Tableau 21: Teneur globale de stérols et alcools supérieurs dans chaque fraction de l'huile des graines de *Nigella sativa*

Fraction	Taux stérols /insaponifiables (%)
Huile totale	15.41
F1	18.38
F2	20.28
F3	5.8
F4	1.33

L'examen approfondi des résultats de l'analyse indique une richesse de l'huile totale de *Nigella sativa* en différents stérols et alcools supérieurs. En effet une large gamme de stérols a été identifiée dans notre huile avec dix composés différents dans l'huile totale. Le 1-triacontanol est le composé majoritaire avec un taux de 7.89 %, suivi de stigmastérol (2.71 %) et le campestérol (1.65 %). Les stérols contenus dans l'huile totale représentent environ 15.4 % des insaponifiables.

La fraction F1 compte aussi dix composés identifiés. Les stérols et alcools supérieurs représentent 18.38 % des insaponifiables. Le stérol le plus abondant est le campestérol (5.6 %). Le 1-hexacosanol, le cholestérol, le b-sitostérol et le 1-triacontanol sont aussi présents mais avec des taux moins importants (2.45, 2.39, 2.34 et 2.11 % respectivement).

Les stérols identifiés dans la fraction F2 représentent 20.28 % des insaponifiables. Le stigmastérol est le stérol majoritaire avec un taux de 9.38 %. Le b-sistostérol et le 1-triacontanol sont présents avec les taux respectifs de 4.28 et 4.25 %.

Dans la fraction F3 on note une diminution importante dans la teneur en stérols. Leur taux n'excède pas les 5.8 % des insaponifiables. Le 1-eicosanol, le 1-tetracosanol et le cholestérol sont les stérols majoritaires avec les taux de 1.87, 1.02, et 1.62 % respectivement.

Les stérols et alcools supérieurs de la fraction F4 constituent uniquement 1.33 % des insaponifiables. Tous les composés sont présents avec des taux inférieurs à 1 %. Cependant le plus abondant de ces composés est le 1-triacontanol (0.43 %).

La comparaison de nos résultats avec ceux trouvés dans d'autres études révèle certaines divergences concernant le taux des stérols, leur nature et même le composé majoritaire. Ainsi, Atta (2003) avait identifié, dans l'huile de *Nigella sativa* cultivée en Egypte, cinq stérols, dont le b-sitostérol est le composé majoritaire avec une concentration de 960 ± 60 mg pour 100 g d'huile, approximativement 1 %.

Dans une autre étude, l'huile de *Nigella sativa* renferme 0.36 % de stérols et le b-sitostérol est présent avec un taux allant de 32.2 à 34.1 % des stérols totaux, le Δ^5 -avenastérol (27.8 à 27.9 %) et le Δ^7 -avenastérol (18.5 à 22.0 %). Stigmastérol, campestérol et lanostérol ont été détectés dans cette huile mais avec des taux plus faibles compris entre 17.6 et 19.5 % (Ramadan et Mörcel, 2002).

2. Effet hypoglycémiant des extraits des graines de *Nigella sativa*

2.1. Recherche de l'activité hypoglycémiant chez le rat diabétique

La glycémie, est le premier paramètre à prendre en considération lors de l'étude du diabète ou de l'étude des effets des différents traitements sur cette pathologie. La première mesure de la glycémie a été effectuée après 72H de l'induction du diabète. Elle permet de vérifier l'installation du diabète après destruction partielle du pancréas sous l'effet de la streptozotocine. Dans plusieurs cas la glycémie n'est pas importante, conséquence de l'effet protecteur de la nicotinamide sur le pancréas (Masiello *et al.*, 1999).

Une fois la glycémie vérifiée, le traitement des rats avec les différents extraits débute. La glycémie est mesurée au 15^{ème} et au 30^{ème} jour du traitement. Les taux de réduction de la glycémie sont calculés par rapport à la glycémie initiale de chaque groupe (Tableau 22).

Tableau 22 : Effet hypoglycémiant des extraits de *Nigella sativa*

Groupes d'animaux	Blood glucose (mg/dL)		% de reduction de la glycémie		
	Avant le traitement	Après le traitement		15 ^{ème} jour	30 ^{ème} jour
		15 ^{ème} jour	30 ^{ème} jour		
Rats diabétiques non traités (Control)	203.2 ± 4.7	192.6 ± 3.6	187.1 ± 8.3	-	-
Rats normaux	78.4 ± 3.1	72.3 ± 4.3	75.5 ± 3.6	-	-
Rats diabétiques + huile totale (400mg/Kg/jour)	208.3 ± 4.7	132.7 ± 6.3*	96.5 ± 3.1**	36.5	53.5
Rats diabétiques+ extrait méthanolique délipidé (400 mg/Kg/jour)	191.3 ± 3.8	178.4 ± 4.7	168.3 ± 5.6	6.5	11.8
Rats diabétiques traités par l'huile totale (100mg/Kg/jour)	143.5±1	93.6±5*	92.7±4*	34.55	35.4
Rats diabétiques traités par la fraction polaire de l'huile totale (100mg/Kg/jour)	129.6±2	88.9±2*	114.3±3	31.4	9.72
Rats diabétiques traités par la fraction neutre de l'huile totale (100mg/Kg/jour)	110±3	86±4	90±6	21.55	18
Rats diabétiques traités avec la metformin (65 mg/Kg/jour)	176.3 ± 7.2	109.1 ± 3.2*	97.3 ± 5.2**	37.9	44.6

Résultats exprimés en moyenne ± SE, n= 7, *P<0.05, **P<0.01

Les valeurs de la glycémie initiale varient d'un groupe à un autre. Les glycémies les plus importantes sont celles des groupes de control (rats diabétiques non traités ; 203.2 ± 4.7 mg/dL) et le groupe des rats traités avec 400mg/Kg/jour (208.3 ± 4.7 mg/dL). La glycémie initiale n'est pas très élevée pour les groupes de rats traités avec 100mg/Kg/jour de la fraction neutre de l'huile (110 ± 3 mg/dL) et les rats traités avec 100mg/Kg/jour de la fraction polaire de l'huile (129.6 ± 2 mg/dL). Le groupe de rats normaux ont une glycémie moyenne de 78.4 ± 3 mg/dL.

Après 15 jours du début du traitement, nous avons observé une réduction variable de la glycémie des différents groupes. Les rats traités avec l'extrait méthanolique délipidé (400 mg/Kg/jour) ont une glycémie réduite seulement de 6.5%. Ce taux atteint 11.8 % après 30 jours de traitement. Cependant, chez les rats traités avec 400 mg/Kg/jour de l'huile totale, la glycémie est réduite de 36.5% au bout de 15jours et atteint 53.5% après 30 jours de traitement.

Afin de vérifier si l'effet de l'huile totale est maintenu à une concentration plus faible, le traitement est réalisé par des doses de 100 mg/Kg/jour. Le taux de réduction de la glycémie de 34.55 %, après 15 jours de traitement ; est presque identique à celui observé de 36.5 % à 400 mg/Kg/jour. Cependant, la prolongation du traitement à 100 mg/Kg/jour à 30 jours ne réduit pas d'avantage la glycémie. Cette dernière est plutôt stabilisée du 15^{ème} au 30^{ème} jour de traitement (93.5 ± 5 mg/dL. et 92.7 ± 4 mg/dL).

Les fractions polaires et neutres de l'huile totale, obtenues par fractionnement de l'huile totale sur colonne de silice, ont été testées afin de déterminer la nature des constituants lipidiques responsables de l'effet hypoglycémiant observé. Les résultats montrent que la fraction polaire de l'huile totale testée à une dose de 100 mg/Kg/jour réduit la glycémie de 31.4 % après 15 jours de traitement. La fraction neutre testée avec la même concentration la réduit de 21.55 % après 15 jours. Cependant, cet effet n'est pas maintenu après 30 jours de traitement ou les taux de réduction de la glycémie sont de 9.72 % et 18 % pour la fraction polaire et la fraction neutre respectivement.

D'une manière globale, les résultats obtenus en utilisant l'huile et l'extrait méthanolique sont en adéquation avec plusieurs études réalisées sur l'effet hypoglycémiant de *Nigella sativa*. En 2001, Meral et ses collaborateurs ont montré que l'administration de 20 ml/Kg/jour de l'huile de *Nigella sativa* durant 2 mois réduit significativement la glycémie chez des lapins rendus diabétiques par l'administration de l'alloxan. L'effet hypoglycémiant de l'huile de *Nigella sativa* a été également observé chez les hamsters rendus diabétiques par la streptozotocine ou

l'huile de *Nigella sativa* diminuait la glycémie des animaux de 391 ± 3 mg/dl à 325 ± 5 mg/dl, 246 ± 6 mg/dl, 208 ± 3 mg/dl et 179 ± 3 mg/dl après respectivement la 1^{ère}, 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} semaine de traitement (**Fararh et al., 2004**).

La production hépatique du glucose par la gluconéogenèse a été significativement réduite au cours du traitement par rapport aux hamsters non traités (**Fararh et al., 2004**). Il a été démontré aussi que l'administration de la thymoquinone, un composé phénolique de l'huile essentielle de *Nigella sativa*, réduit le taux de la glycémie chez les hamsters rendus diabétiques par la streptozotocine, via la diminution de la gluconéogenèse hépatique (**Fararh et al., 2005**).

Dans une étude plus récente, l'administration orale de l'extrait méthanolique des graines *Nigella sativa* (300 mg/Kg/jour) à des rats rendus diabétiques par la streptozotocine durant 30 jours, réduit significativement la concentration sanguine élevée de glucose, des lipides, de l'insuline et corrige les niveaux altérés de la peroxydation lipidique et des enzymes antioxydants (**Kaleem et al., 2006**).

Dans une autre étude, les groupes de rats traités, respectivement, avec 400mg/kg /jour et 50mg/kg /jour de *Nigella sativa* et de thymoquinone, durant 12 semaines à partir du 2^{ème} jour de l'administration de la streptozotocine ont présentés une diminution significative du taux sanguin du glucose et une augmentation de la concentration plasmatique de l'insuline (**Kanter, 2008**).

L'administration orale de l'extrait méthanolique brut des graines de *Nigella sativa* (810 mg/kg/ jour) et de l'huile (2.5 ml/ kg/jour), pendant 25 jours, a conduit à une diminution significative de la glycémie et de la concentration sanguine des lipides (triglycérides et cholestérol) des rats rendus diabétique par l'alloxan (**Houcher et al., 2007**).

2.2. Effet des extraits des graines *Nigella sativa* sur les taux des lipides sanguins

Le métabolisme lipidique est étroitement lié à celui des glucides. Les deux métabolismes se rejoignent dans ce qu'on appelle le métabolisme énergétique. La perturbation de l'un a forcément des conséquences sur l'autre. C'est le cas dans les pathologies dites métaboliques, notamment le Diabète (**Kelley et al., 2002**). C'est pour cette raison que lors de cette étude les extraits des graines de *Nigella sativa*, appliqués certes pour l'étude de leur effet hypoglycémiant, ont été aussi examinés pour leur effet sur les lipides sanguins, à savoir, le cholestérol et les triglycérides. Les taux des triglycérides, cholestérol et urée ont été déterminés avant le début des traitements et à la fin de l'expérience (30^{ème} jour). Les résultats

des dosages révèlent que *Nigella sativa* agit d'une manière variable sur ces paramètres (Tableau 23).

Tableau 23: Effet de *Nigella sativa* sur les taux des triglycérides et cholestérol plasmatiques

Groupes d'animaux	Triglycerides (mg/dL)		Cholesterol total (mg/dL)	
	Avant le traitement	30 ^{ème} jour	Avant le traitement	30 ^{ème} jour
Rats diabétiques non traités (Control)	51 ± 5	67 ± 26	59 ± 8	73 ± 11
Rats normaux	23± 4	35 ± 14	38 ± 7	45 ± 8
Rats diabétiques + huile totale (400mg/Kg/jour)	35 ± 4	16± 3 ^{**}	78 ± 6	51 ± 4*
Rats diabétiques+ extrait méthanolique délipidé (400 mg/Kg/jour)	29 ± 6	25 ± 3	71± 4	59 ± 4*
Rats diabétiques traités par l'huile totale (100mg/Kg/jour)	148±4	93.5±8*	67.7±7	75.6±3
Rats diabétiques traités par la fraction polaire de l'huile totale (100mg/Kg/jour)	125±9	93±2*	75.6±2	93±2
Rats diabétiques traités par la fraction neutre de l'huile totale (100mg/Kg/jour)	32 ± 5	27.5 ± 3	66.2± 7	81.4 ± 2
Rats diabétiques traités avec la metformin (65 mg/Kg/jour)	33 ± 5	38 ± 10*	67 ± 6	72 ± 8

Résultats exprimés en moyenne ± SE, n= 7, *p<0.05, **p<0.01.

L'extrait méthanolique délipidé ne réduit pas de manière significative le taux des triglycérides. La réduction après 30 jours de traitement est seulement d'environ 13 %. L'effet de l'huile totale testée à une concentration de 400mg/Kg/jour durant 30jours réduit les triglycérides de 35 ± 4 mg/dL à 16 ± 3 mg/dL, soit un taux de réduction de 54.29%. Le même extrait testé à une concentration plus faible (100mg/Kg/jour) réduit significativement la

concentration des triglycérides d'environ 38% (de 148 à 93.5 mg/dL). La fraction polaire de l'huile totale administrée à la dose de (100mg/Kg/jour) réduit le taux des triglycérides de 25.6% alors que la fraction neutre appliquée avec la même concentration diminue, moins efficacement, le taux de ces lipides de 15.5%. Finalement, la métformine n'a aucun effet sur le taux des triglycérides.

Contrairement à l'effet notable sur les triglycérides, l'effet de l'huile des graines de *Nigella sativa* et de ses fractions sur le cholestérol total est moins important. Seul l'extrait méthanolique délipidé et l'huile totale à concentration de 400mg/Kg/jour ont un effet sur le cholestérol total. En effet, l'extrait méthanolique délipidé réduit le cholestérol de 17% alors que l'huile totale réduit significativement le cholestérol de 35% après 30 jours de traitement. A des concentrations plus faibles; l'huile ses fractions polaire et neutre ne réduisent pas le taux du cholestérol.

La cholestérolémie et la triglyceridémie sont des paramètres biochimiques qui varient en fonction de l'état physiologique de l'individu (obésité, diabète, syndromes métaboliques...). Dans le cas du diabète, la diminution de l'insuline provoque une augmentation des taux du cholestérol et des triglycérides (**Hennen, 2001; Devos, 2008**). Plusieurs études réalisées sur l'effet des graines de *Nigella sativa* sur l'évolution des lipides plasmatiques chez des animaux diabétiques ou normaux, révèlent que l'huile fixe de ces graines normalisent les niveaux sanguins de ces paramètres (**Zaoui et al., 2002, Mai Le et al., 2004, Al-Baeitawi et al., 2009**). De plus, Il a été rapporté que les acides gras contenus dans l'huile des graines de *Nigella sativa* sont responsables de l'effet de l'huile sur la cholestérolémie (**Al-Baeitawi et al., 2009**). Ces acides gras agissent en inhibant la synthèse du cholestérol par les hépatocytes (**Al-Baeitawi et al., 2009**).

Nos résultats concordent bien avec les études publiées en ce qui concerne l'effet de l'huile totale sur le taux du cholestérol (**Sanvlemente et al., 2009 ; Rangachari et al., 2011**). L'extrait méthanolique délipidé a aussi un effet sur la réduction de la cholestérolémie. Cet effet, bien qu'il ne soit aussi marqué que celui de l'huile totale, laisse suggérer que les composés qui sont actifs sur la réduction du taux du cholestérol, peuvent ne pas être des composés liposolubles. L'extrait méthanolique renferme généralement des composés polaires tels que les composés phénoliques hydrosolubles (**Zlata, 1992**).

Des études réalisées sur l'effet des extraits des graines de *Nigella sativa* sur les triglycérides chez des rats diabétiques, montrent encore une fois que l'huile fixe réduit significativement le taux des triglycérides plasmatiques (**Zaoui et al., 2002, Mai Le et al., 2004, Al-Baeitawi et**

al., 2009). Al- L'effet de l'extrait brut des graines de *Nigella sativa* sur la réduction de la triglycéridémie peut être attribué à la thymoquinone (Al-Baeitawi *et al.*, 2009). Nos résultats montrent que l'efficacité de la réduction des triglycérides varie énormément d'un extrait à un autre. L'huile fixe est plus active et ses constituants polaires semblent renfermer le ou les composés responsables de cet effet.

2.3. Mécanismes potentiels de l'effet hypoglycémiant de *Nigella sativa*

L'objectif de cette étude est de comprendre le mécanisme selon lequel les extraits des graines de *Nigella sativa* réduisent la glycémie chez les rats diabétiques. Pour cela, deux cibles d'action ont été choisies ; (i) la cible post-prandiale ; via l'inhibition de l'alpha-glucosidase intestinale et (ii) l'effet sur la régénération des îlots de Langerhans, détruits par l'injection de la streptozotocine. Le choix de ces deux cibles était fait en raison de leur accessibilité expérimentale et la facilité relative de la mise au point des méthodes d'études.

2.3.1. Effet hypoglycémiant post-prandial de *Nigella sativa*

L'hyperglycémie post-prandiale constitue une des conséquences de la diminution de l'insuline notamment dans le diabète de type 2 (Blicklé, 2000 ; Magnan et Ktorza, 2005). L'activité post-prandiale des extraits des graines *Nigella sativa* a été évaluée en administrant, par gavage gastrique, à des rats normaux 100 mg/Kg d'amidon et 100 mg/Kg de glucose. Le gavage avec l'amidon est utilisé pour étudier l'effet de l'huile totale des graines de *Nigella sativa* sur l'hydrolyse intestinale de l'amidon par les glucosidases intestinales (Shim *et al.*, 2003). Par contre, l'utilisation du glucose vise à vérifier l'effet des extraits sur l'absorption du glucose au niveau des intestins (Nistor, 2009).

La glycémie a été mesurée après 18h de mise à jeun des rats (G0). Après le dosage du glucose, chaque groupe de rat a reçu un volume de 2ml de l'extrait. Une solution d'amidon (ou de glucose) (100 mg/Kg) a été administrée 40 minutes après l'administration des extraits. Trente minutes plus tard, un deuxième prélèvement et dosage de la glycémie a été effectué (G1). La différence ($\Delta G1-G0$) entre les glycémies a été déterminée pour décrire l'effet post-prandial des extraits des graines de *Nigella sativa* (Tableau 24).

Les résultats montrent clairement l'effet positif de l'huile totale et de ses fractions polaire et neutre sur l'hydrolyse intestinale de l'amidon et sur le transport du glucose. Cet effet post-prandial est, cependant, variable en fonction de la cible moléculaire. Ainsi, L'huile totale (100 mg/Kg), administrée avant le gavage avec l'amidon, réduit significativement la différence de la glycémie ($p \leq 0.05$) de 28.%. De plus, seule la fraction polaire de cette huile réduit encore l'écart de la glycémie avec un taux de 45.72%. La fraction neutre n'a pas un effet significatif

du fait qu'elle ne réduit la variation de la glycémie que de 5.72 %. L'acarbose, tétraholoside de synthèse utilisé pour l'inhibition de l'alpha-glucosidase, réduit fortement la différence de glycémie lorsqu'on utilise l'amidon comme substrat.

Tableau 24 : Effet hypoglycémiant post-prandial des extraits de *Nigella sativa*

Amidon (100mg/Kg)	Δ G1-G0	Taux de réduction (%)	Glucose (100mg/Kg)	Δ G1-G0	Taux de réduction (%)
Groupe 1	0.35 $\pm$ 0.004	-	Groupe 1	0.66 $\pm$ 0.021	-
Groupe 2	0.25 $\pm$ 0.010*	28.58	Groupe 2	0.23 $\pm$ 0.022**	65.84
Groupe 3	0.19 $\pm$ 0.011*	45.72	Groupe 3	0.09 $\pm$ 0.012**	86.37
Groupe 4	0.33 $\pm$ 0.009	5.72	Groupe 4	0.17 $\pm$ 0.013**	74.25
Groupe 5	0.13 $\pm$ 0.011	62.86	Groupe 5	0.12 $\pm$ 0.022*	81.82

Groupe 1: rats non traités, Groupe 2: rats traités avec l'huile totale de *Nigella sativa* (100mg/Kg), Groupe 3: rats traités avec la fraction polaire de l'huile totale (100 mg/KG), Groupe 4: rats traités avec la fraction neutre de l'huile totale (100 mg/Kg), Groupe 5: rats traités avec l'acarbose (100 mg/Kg). * résultat significatif, comparé aux groupes 5 et 1, $p \leq 0.05$, **, $p \leq 0.01$ (n= 3)

Inversement, lorsqu'on examine l'effet de ces extraits sur la variation de la glycémie en présence du glucose, il apparaît que tous les extraits exercent un effet post-prandial significatif ($p \leq 0.01$). La fraction polaire est, cependant, la plus active avec un taux de réduction de la variation de la glycémie de plus de 86%.

La signification physiologique de ces résultats est que l'effet hypoglycémiant des extraits des graines de *Nigella sativa* est opéré via deux mécanismes distincts; **(i)** inhibition de l'hydrolyse des glucides par les glucosidases intestinales et **(ii)** inhibition du transport du glucose libéré lors de l'étape précédente, c'est-à-dire, après l'hydrolyse de l'amidon. D'une autre part, la détermination de la nature des molécules responsables de ces actions est d'une grande importance. Les composés de la fraction polaire de l'huile semblent être impliqués dans le premier mécanisme, par contre des constituants plus hydrophobes agissent aussi sur le transport membranaire du glucose, au même titre que les composés polaires contenus dans la fraction polaire de l'huile.

Jusqu'à présent une seule étude a été réalisée par Meddah et ses collaborateurs (2009) dans le but d'élucider l'effet hypoglycémiant post-prandial des extraits des graines de *Nigella sativa*. Ces chercheurs ont démontré que l'extrait aqueux de ces graines inhibait le transport membranaire du glucose (Na^+ /glucose co-transporter, SGLUT1).

2.3.2. Effet des extraits de *Nigella sativa* sur l' α -glucosidase

Dans cette étape et après avoir observé les effets des extraits des graines de *Nigella sativa* in vivo, nous avons mis au point un test, in vitro, sur l' α -glucosidase de levure pour vérifier la cible moléculaire. Pour ce test, nous avons utilisé l'huile totale de *Nigella sativa*, l'extrait méthanolique délipidé, la thymoquinone et les fractions de l'huile totale. Les sous-fractions des deux fractions polaire et neutre ont été obtenues par fractionnement de l'huile totale sur colonne de silice. L'effet de l'ensemble des ces extraits est comparé à l'action de l'acarbose, inhibiteur synthétique de α -glucosidase. Seuls les extraits ayant présentés des effets inhibiteurs de l' α -glucosidase ont été mentionnés. La détermination des taux d'inhibition à différentes concentrations a permis de calculer les valeurs de l' IC_{50} pour chaque extrait (Figure 46).

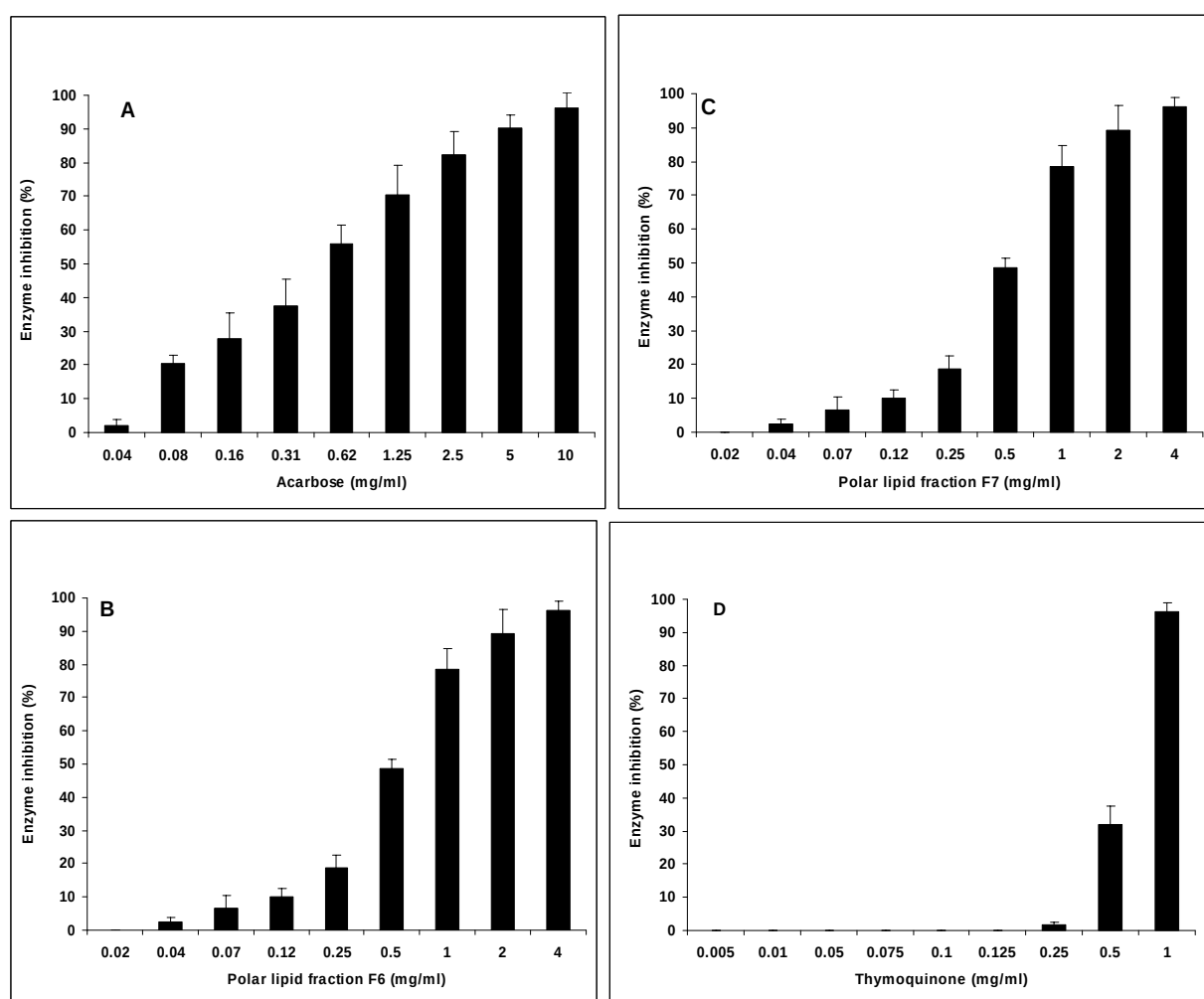


Figure 46: Inhibition de l' α glucosidase par les extraits de *Nigella sativa* **A)** inhibition de l' α -glucosidase par l'acarbose, **B)** inhibition de l' α -glucosidase par la fraction 6 (F6), **C)** inhibition de l' α -glucosidase par la fractions7(F7), **D)** inhibition de l' α -glucosidase par la thymoquinone (TQ)

L'huile totale, ses fractions neutres ainsi que l'extrait méthanolique délipidé, aux concentrations testées, ne présentent aucun effet significatif sur l' α -glucosidase. Cependant, l'enzyme est fortement inhibée par les fractions 6 et 7 (IC_{50} 0.51 ± 0.01 mg/ml et 0.55 ± 0.02 mg/ml, respectivement). Cet effet est comparable à ceux de l'acarbose (0.53 ± 0.06 mg/ml) et la thymoquinone (0.65 ± 0.05 mg/ml). L'inhibition de l'hydrolyse des glucides par les glucosidases dans le tube digestif, constitue la première cible du traitement de l'hyperglycémie post-prandiale (Schäfer and Högger, 2007). Les résultats montrent que c'est la fraction polaire de l'huile totale des graines de *Nigella sativa* qui agit mieux sur l' α -glucosidase. De plus IC_{50} des deux fractions polaires sont de la même grandeur que celle de l'acarbose, médicament utilisé dans la réduction de la glycémie post-prandiale chez les diabétiques (Kim et al., 2005; Schäfer and Högger, 2007).

2.4. Effet régénératif des îlots de Langerhans des extraits de *Nigella sativa*

Dans la présente étape de notre étude nous avons testé l'effet de quelques extraits de *Nigella sativa* sur la régénération des îlots de Langerhans chez les rats rendus diabétiques par le modèle N/STZ. La streptozotocine (65 mg/Kg) détruit les îlots de Langerhans dont la conséquence est la diminution de la production de l'insuline et l'apparition du diabète chez les rats. Dans ce cas, la régénération des îlots est quasi impossible, vue l'ampleur des lésions provoquées par la streptozotocine sur ces tissus (Masiello et al., 1999). Masiello et ses collaborateurs ont démontré que l'utilisation de nicotinamide, à la concentration de 230 mg/Kg, 15min avant l'injection de la streptozotocine permet une protection partielle du pancréas et préserve environ 40% des îlots de Langerhans. Le diabète ainsi développé est comparable à celui de type 2, sans l'effet associé de l'obésité.

L'analyse histo-pathologique du tissu pancréatique des différents groupes de rats a été réalisée après 17 jours de traitement avec les différents extraits. Les résultats montrent des effets variables, et ce en fonction du type de traitement utilisé (Figure 47). Le tissu pancréatique du rat du groupe témoin présente un aspect normal, composé d'un parenchyme plein ayant une structure lobulé constituée de lobules séparés par des tissus fibro-adipeux. Chaque lobule renferme des acini séreux, des îlots de Langerhans et des canaux excréteurs extra lobulaires (Figure 47a1). Les îlots de Langerhans sont de taille normale entourés par des acini (Figure 47a2), et un canal excréteur extra lobulaire de taille normale (Figure 47a3).

Le tissu pancréatique de rats du groupe 2 (diabétique non traité) est anormal. Il présente une atrophie lobulaire (Figure 47b) et une diminution du nombre et de la taille des îlots de Langerhans. Cet état des îlots est le résultat de l'effet de la streptozotocine dont la

conséquence est la diminution de la sécrétion de l'insuline et l'installation du diabète (Masiello et al., 1998).

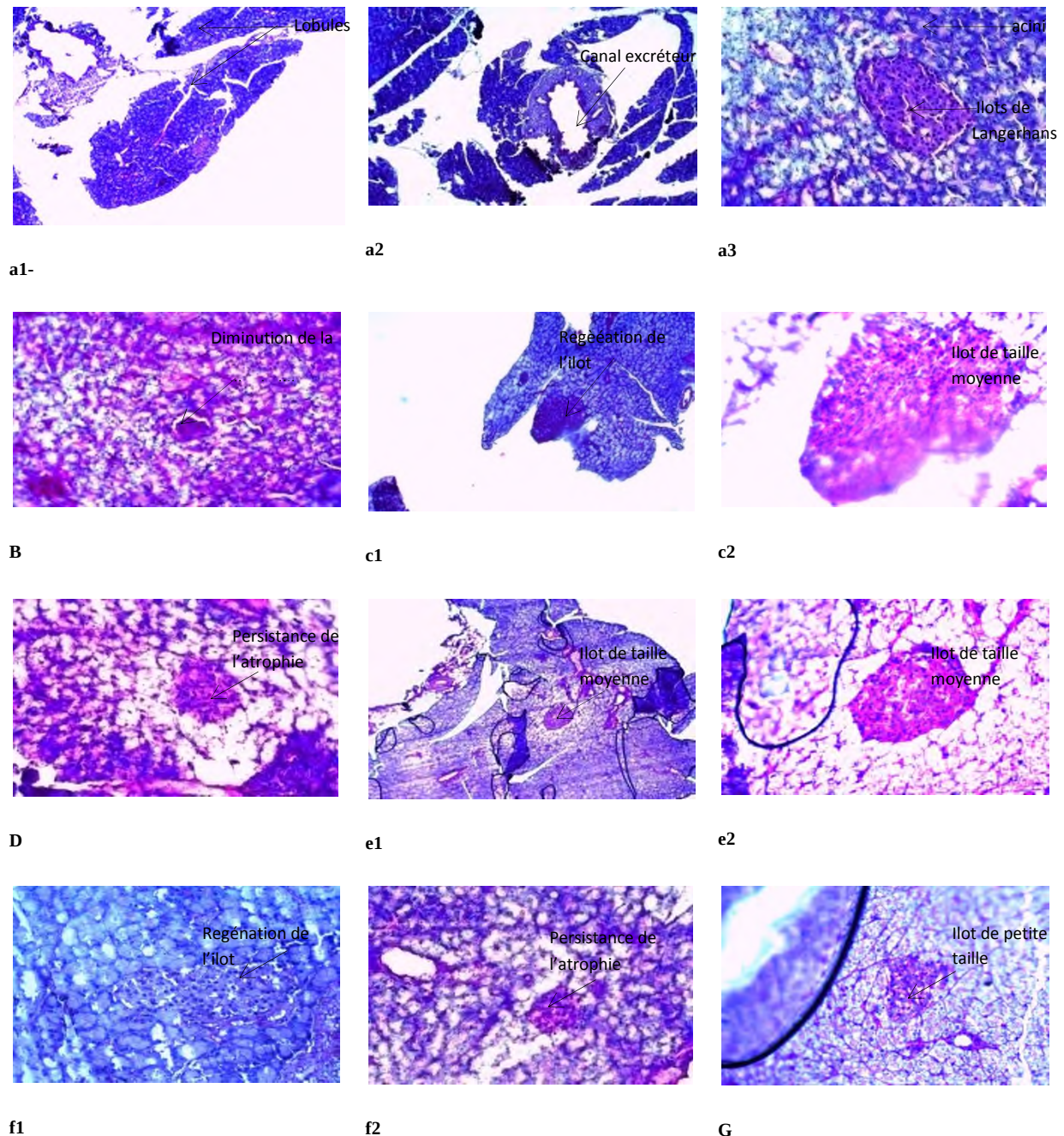


Figure 47: Effet des extraits de *Nigella sativa* sur le tissu pancréatique de rats rendus diabétiques par la N/STZ. **a1:** Tissu pancréatique de rat normal (groupe 1, G×10), **a2:** Tissu pancréatique de rat normal (groupe 1, G×40), **a3:** Tissu pancréatique de rat normal (groupe 1, G×40), **b:** Tissu pancréatique de rat diabétique non traité (groupe 2, G×40), **c1:** tissu pancréatique de rat traité avec 100mg/kg /jour de l'huile totale (groupe 3, G×10), **c2:** tissu pancréatique de rat traité avec 100mg/kg /jour de l'huile totale (groupe 3, G×40), **d:** tissu pancréatique de rat traité avec 100mg/kg /jour de la fraction polaire (groupe 4, G×40), **e1:** tissu pancréatique de rat traité avec 100mg/kg /jour de la fraction neutre (groupe 5, G×10), **e2:** tissu pancréatique de rat traité avec 100mg/kg /jour de la fraction neutre (groupe 5, G×40), **f1:** tissu pancréatique de rat traité avec 25mg/kg /jour de thymoquinone (groupe 6, G×40), **f2:** tissu pancréatique de rat traité avec 25mg/kg /jour de thymoquinone (groupe 6, G×40), **g:** tissu pancréatique de rat traité avec 25mg/kg /jour de métformine (groupe 7, G×40).

Le traitement des différents groupes avec les extraits lipidiques des graines de *Nigella sativa*, provoque des effets plus ou moins notables sur l'aspect des îlots. En effet, Le pancréas des rats du groupe 3 (traités avec 100 mg/kg/j, de l'huile totale de *Nigella sativa*) présente un aspect sub-normal et les îlots de Langerhans sont de taille moyenne (Figure 47 c1 et c2). La comparaison de leur taille avec celle des îlots des rats du groupe 2 (diabétiques non traités) indique une amélioration modérée.

Le traitement des rats du groupe 4 avec 100mk/kg/j de l'huile polaire ne provoque pas une amélioration de l'état du tissu pancréatique. La figure 48 d montre une absence de réponse au traitement et persistance des anomalies des îlots.

Le groupe 5 (traité avec 100 mg/kg/j de la fraction neutre) présente un tissu pancréatique présentant une augmentation assez importante de la taille des îlots de Langerhans (Figure 48 e1 et e2). Le pancréas des rats du groupe 6 (traité avec 25mg/kg/j avec la thymoquinone) indique une légère réponse au traitement qui se traduit par l'alternance d'îlots de petites et de moyennes tailles. Un îlot de taille moyenne (Figure 47f1) et de petite taille (Figure 47f2) sont représentés. Finalement, Le traitement par la métformine semble ne pas avoir amélioré ni la taille ni le nombre des îlots. L'aspect du pancréas des rats du groupe 7, traités avec 25mk/kg/j par la métformine, indique une absence de réponse au traitement et une persistance des lésions provoquées par la streptozotocine (Figure 47g).

Quelques études ont été réalisées sur les effets des extraits des graines de *Nigella sativa* sur le pancréas des animaux diabétiques ou normaux. Une dégénérescence et nécrose ont été observées sur les coupes histologiques des pancréas de lapins diabétiques non traités par rapport aux coupes de pancréas de lapins diabétique traités par l'huile des graines de *Nigella sativa*. Les ilots ont été infiltrés par des cellules mononuclées avec formation d'œdèmes ont été rapportées (Meral et al., 2001).

Les travaux de Kanter et ses collaborateurs indiquent que l'huile des graines de *Nigella sativa* exerce un effet protecteur sur les cellules β des ilots de Langerhans. Cet effet protecteur est dû à l'action de l'huile sur le stress oxydatif généré par le NO suite à l'action de la streptozotocine au niveau des ilots de Langerhans (Kanter et al., 2003, Kanter et al., 2004). Rchid et ses collaborateurs ont constatés que la fraction basic de *Nigella sativa* permettait de réduire le taux de la glycémie et de relancer la production de l'insuline à partir des ilots de Langerhans isolés (Rchid et al., 2004).

Les effets protecteurs de la thymoquinone ont été démontrés dans plusieurs études. Fararh et ses collaborateurs ont montré que l'administration de la thymoquinone avec une concentration de 50 mg/kg/jour aux hamsters, rendus diabétiques par la streptozotocine, réduit non seulement et d'une manière significative les taux du glucose mais aussi le taux de l'hémoglobine glycosylée. La thymoquinone agit également sur la diminution de la gluconéogenèse (**Fararh et al., 2005**). La thymoquinone, administrée à 3 mg/kg, semble protéger le pancréas contre le stress oxydatif généré par le NO (**El-Mahmoudy et al., 2005**).

En effet, un tissu pancréatique normal montre une structure lobulée renfermant des îlots de Langerhans de taille normale, des acini et des canaux exciteurs extra lobulaires. Les coupes histologiques de pancréas de rats diabétiques non traités présentent une atrophie lobulaire avec diminution de la taille et le nombre des îlots de Langerhans. Il s'agit des changements dégénératifs et nécrotiques et rétrécissement des îlots. Cela est le résultat de l'injection de la streptozotocine qui a un effet destructeur sur les cellules B des îlots Langerhans (**Masiello et al., 1998, Kanter, 2003**).

Le groupe 3, traité avec l'huile totale montre des îlots de Langerhans avec des tailles subnormales (moyenne). Ceci indique que l'huile totale, utilisée à des doses de 100 mg/Kg/jours pendant 30 jours, agit positivement sur ce tissu. Cette réponse est exprimée par l'augmentation de la taille des îlots de Langerhans. Il s'agit d'un changement régénératif et/ou prolifératif des îlots.

La comparaison des tissus des groupes traités avec la fraction polaire, la fraction neutre, la thymoquinone et la métformine a permis de tirer les conclusions suivantes; **(i)** le pancréas traité avec l'huile polaire ne présente pas de réponse au traitement. On a noté la persistance des anomalies retrouvées chez les rats diabétiques non traités, **(ii)** les pancréas des animaux traités avec l'huile neutre présentent une augmentation de la taille des îlots de Langerhans. Ce changement indique une régénération des cellules β pancréatique, **(iii)** le traitement avec la thymoquinone a permis la régénération /prolifération partielle. Ceci est traduit par l'alternance d'îlots de petite et de moyenne taille. Cette amélioration dans l'aspect des îlots est, cependant, modérée comparée à l'effet observé avec de la fraction neutre et **(vi)** le pancréas traité avec la métformine présente une persistance des lésions ce qui exclut l'effet de la métformine sur le pancréas.

D'un autre point de vue, l'effet hypoglycémiant, déterminé dans cette étude, peut être considéré comme relativement modéré à l'exception de celui de la fraction polaire, comparé aux résultats obtenus dans d'autres études : **Meral et al., 2001 ; Kanter et al., 2003; Kanter**

et al., 2004 ; Kaleem et al., 2006 ; Houcher et al., 2007. Ceci peut être expliqué par le choix de concentrations relativement faibles de l'huile totale (100 mg/kg/jour) alors que dans des études similaires les concentrations étaient nettement plus élevées. Par exemple, Kanter et ses collaborateurs ont utilisé un volume de 0.2 ml/kg/jour, pendant un mois, de l'huile essentielle des graines de *Nigella sativa*. Cette concentration a permis de réduire la glycémie, l'augmentation de l'insulinémie et de relancer la production de l'insuline après la régénération des îlots de Langerhans (**Kanter et al., 2003; Kanter et al., 2004**). Meral et ses collaborateurs ont utilisé 20 ml/kg/jour chez le lapin (**Meral et al., 2001**). Kaleem et ses collaborateurs ont utilisé des doses de 300mg/kg/jour de l'huile des graines de *Nigella sativa* pour observer une réduction de la glycémie (**Kaleem et al., 2006**). L'huile des graines de *Nigella sativa* et son extrait méthanolique brut ont été également utilisés à une concentration de 810 mg/kg/jour chez les rats rendus diabétiques par l'alloxan (**Houcher et al., 2007**).

L'effet hypoglycémiant de la thymoquinone à 50 mg/kg/jour a été également rapporté (**Fararh et al., 2005**). La métformine a été aussi utilisée avec des concentrations plus élevées que celle utilisée dans la présente étude (350 mg/kg/jour) et aucun effet n'a été observé (**Gawler et al., 1988**).

En conclusion, dans cette partie, nous avons confirmés l'activité hypoglycémiant des extraits des graines de *Nigella sativa*. Cette activité est surtout due à la fraction polaire de l'huile totale. Les autres fractions exercent bien un effet hypoglycémiant, mais relativement faible comparé à la fraction polaire.

3. Evaluation de l'hépatotoxicité des extraits de *Nigella sativa*

Après avoir démontré l'effet hypoglycémiant de quelques des extraits des graines de *Nigella sativa* nous nous sommes intéressés à l'approche toxicologique d'évaluer la toxicité hépatique subaiguë de ses extraits. Plusieurs méthodes ont été utilisées ; les tests sur les **PCLS**, dosage des paramètres enzymatiques et non enzymatiques de l'intégrité hépatique et l'examen histologiques des tissus après le traitement des rats diabétiques par les différents extraits des graines de *Nigella sativa*.

3.1. Evaluation de l'hépatotoxicité des extraits de *Nigella sativa* par la méthode des PCLS

Pour remplacer l'utilisation des cellules isolées qui avait quelques limitations et inconvénients comme la destruction des membranes des cellules, la rupture des jonctions cellulaires suite à l'utilisation des enzymes protéolytiques et la perte de la polarité normale des hépatocytes comparé à un foie sain (**Evdokimova et al., 2001**), le modèle des PCLS a été choisi pour

mieux évaluer l'huile totale des graines de *Nigella sativa* sur les hépatocytes. Le control de l'effet des extraits est obtenu par le dosage de l'ATP, exprimé en nmoles d'ATP/mg de protéines.

Trois extraits (méthanolique délipidé, l'huile totale et la fraction polaire de l'huile totale) ont été testés en présence et en absence d'un d'acétaminophen (paracétamol), agent hépatotoxique. Les effets des extraits et de l'acétaminophen sont comparés à l'action d'un composé hépato-protecteur, le N-acetyl-cysteine (NAC) (Figure 49).

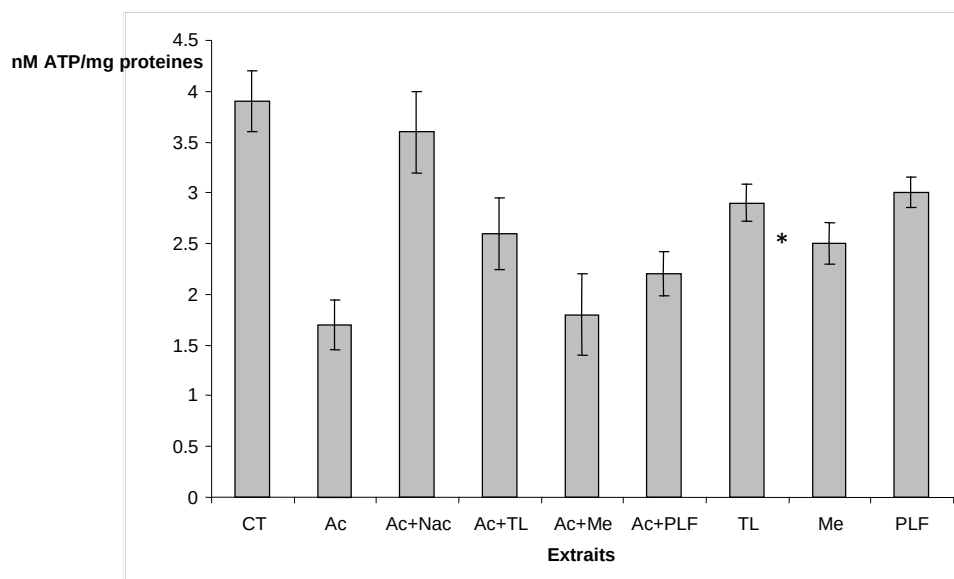


Figure 48 : Evaluation de l'hépto-toxicité des extraits des graines de *Nigella sativa*. **CT**: slices de control (sans traitement), **AC**: Slices traitées avec l'acétaminophen, **Ac+NAC**: Slices traitées avec acetaminophen + N-acetyl-cysteine, **Ac+TL**: slices avec l'acétaminophen et l'huile totale de *Nigella sativa*, **Ac+Me**: slices traitées avec acetaminophen + l'extrait méthanolique de *Nigella sativa*, **Ac+PLF**: slices traitées avec l'acétaminophen + la fraction polaire de l'huile de *Nigella sativa*, **TL**: slices traitées avec l'huile totale de *Nigella sativa*, **Me**: slices traitées avec l'extrait méthanolique de *Nigella sativa*, **PLF**: slices traitées avec la fraction polaire de l'huile de *Nigella sativa*. PCLS ont été incubées durant 24h à 37°C. Concentrations utilisées sont comme suit: **AC**: acetaminophen, 10 mM, **NAC**: N-acetyl-cystein: 10mM, **TL**: huile totale de *Nigella sativa* : 1 mg/ml, **Me**: extrait méthanolique de *Nigella sativa*: 1 mg/ml, **PLF**: fraction polaire de l'huile de *Nigella sativa*: 1 mg/ml. $P \leq 0.05$ comparés aux valeurs du control (à l'exception de PNAC), * amélioration significative ($p \leq 0.05$) comparé à AC+NAC.

Dans les conditions normales (CT) et en absence d'agents chimique, le niveau de l'ATP est d'environ 3.88 ± 0.3 nmol/mg. L'acétaminophen utilisé avec une concentration de 10 mM induit une diminution du taux de l'ATP jusqu'à 1.7 ± 0.3 nmol/mg. Par contre, la présence du NAC protège les tissus hépatiques contre l'effet toxique de l'acétaminophen. Cet effet se traduit par la conservation d'un taux quasi normal de l'ATP (3.6 ± 0.45 nmol/mg) comparé au slices normales.

Les extraits des graines de *Nigella sativa* ont été testés dans les mêmes conditions. En absence de l'acétaminophen, l'extrait méthanolique délipidé réduit le niveau de l'ATP à 2.4 ± 0.2 nmol/mg par rapport à 3.88 nmol/mg du control. En présence de l'acétaminophen, le taux de l'ATP est de 1.8 ± 0.3 nmol/mg. L'huile totale utilisée seule (en absence de l'acétaminophen) permet une génération de 2.9 ± 0.2 nmol/mg d'ATP et en présence de l'acétaminophen, le niveau de l'ATP est de 2.7nmol/mg. Finalement la fraction polaire seule engendre un niveau d'ATP de 3.0 ± 0.15 nmol/mg et en présence de l'acétaminophen, l'ATP décroît jusqu'à 2.25 ± 0.2 nmol/mg. La comparaison des niveaux d'ATP en présence des extraits des graines de *Nigella sativa* par rapport aux contrôles CT, AC et AC+NAC montre que :

- Les trois extraits n'ont pas un effet protecteur contre l'action de l'AC. Cela est observé lorsqu'on compare les taux de l'ATP dans les traitements AC+TL, AC+Me et AC+PLF à AC+NAC, l'amélioration du taux d'ATP n'est pas significative.
- Le traitement des slices avec uniquement (TL, Me et PLF) améliore globalement le niveau d'ATP, comparé au traitement AC ($p \leq 0.05$). Cependant, cette augmentation n'est aussi importante que celle observée dans le traitement AC+NAC. Seule la fraction PLF améliore significativement de taux d'ATP ($p \leq 0.05$). Par conséquence, ces trois extraits peuvent être considérés comme non hépato- protecteurs mais pas ou peu toxiques comparés à l'AC.

Des études réalisées sur l'effet hépato-protecteur des extraits des graines de *Nigella sativa* montrent que la thymoquinone, le composé actif de l'huile essentielle de *Nigella sativa*, exerce une activité hépato-protective (1mM) en inhibant la diminution de la viabilité cellulaire et le largage des enzymes induit par le TBHP, dans les cellules hépatiques isolées. Il est bien connu que la thymoquinone conduit une préservation du GSH intracellulaire, ce qui peut expliquer son effet hépato-protecteur (**Daba et Abdel-Rahman, 1998**).

Il a été rapporté que l'huile volatile des graines de *Nigella sativa* pouvait empêcher la peroxydation des lipides responsable de l'altération des cellules hépatiques chez les lapins rendus diabétiques (**Meral et al., 2001**). L'effet protecteur est le résultat de la diminution de l'activité des systèmes de défense antioxydants, comme le taux du GSH et la concentration de la céruloplasmine d'une part et la diminution de la teneur plasmatique de la malondialdéhyde (MDA) d'autre part (**Meral et al., 2001**).

3.2. Hépatotoxicité évaluée par les méthodes classiques chez le rat diabétique

Dans le but de mieux exploiter la toxicité des extraits des graines de *Nigella sativa* ayant donnés des effets hypoglycémians significatifs; le dosage des marqueurs d'intégrité

hépatique ont été réalisés, à la fin de l'expérience, sur les rats, traités avec les différents extraits des graines de *Nigella sativa*. L'analyse des marqueurs hépatiques des rats rendus diabétiques par la N/STZ et traités, durant 17 jours, avec l'huile totale des graines de *Nigella sativa*, ses fractions polaire et neutre, la thymoquinone et métformine révèle une absence de toxicité (Tableau 25).

Tableau 25 : Analyse des marqueurs hépatiques des rats traités par les extraits de *Nigella sativa*

Groupes de rats	Transaminases (ALAT) U/l	Transaminases (ASAT)U/l	γ -GT U/l	Bilirubine mg/dl	Phosphatase alcaline U/l
Groupe 1	56,52 $\pm$ 10,12	20,30 $\pm$ 4,04	1,35 $\pm$ 0,2	0,067 $\pm$ 0,007	331,9 $\pm$ 4,75
Groupe 2	22,06 $\pm$ 2,05**	29,98 $\pm$ 1,18*	0,87 $\pm$ 0,10**	0,021 $\pm$ 0,004**	430,15 $\pm$ 74,74*
Groupe 3	47,16 $\pm$ 3,31*	26,46 $\pm$ 2,95*	0,83 $\pm$ 0,08**	0,07 $\pm$ 0,005	304,43 $\pm$ 58,87*
Groupe 4	44,27 $\pm$ 1,77*	18,00 $\pm$ 3,32	0,8 $\pm$ 0,21**	0,047 $\pm$ 0,007*	299,77 $\pm$ 75,0
Groupe 5	42,33 $\pm$ 1,92*	20,35 $\pm$ 1,26	1,44 $\pm$ 0,4	0,059 $\pm$ 0,005	186,1 $\pm$ 54,98**
Groupe 6	39,94 $\pm$ 2,05*	20,91 $\pm$ 3,91	1,28 $\pm$ 0,5	0,049 $\pm$ 0,005*	305,72 $\pm$ 83,22
Groupe 7	60,74 $\pm$ 0,61	24,63 $\pm$ 0,43	3,58 $\pm$ 0,5**	0,04 $\pm$ 0,007*	310,71 $\pm$ 38,25

Groupe 1: rats normaux, **Groupe 2 :** rats diabétiques non traités, **Groupe 3:** rats diabétiques traités avec 100mg/kg/jour de l'huile totale de *Nigella sativa*, **Groupe 4:** rats diabétiques traités avec 100mg/kg/jour de la fraction polaire, **Groupe 5:** rats diabétiques traités avec 100mg/kg/jour de la fraction neutre, **Groupe 6:** rats diabétiques traités avec 25mg/kg/jour de thymoquinone, **Groupe 7:** rats diabétiques traités avec 25mg/kg/jour de métformine, (n=7 dans chaque groupe), * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, comparé au groupe normal

Le dosage des marqueurs hépatiques révèle, d'une manière générale, que les différents traitements ne présentent, a priori, aucun effet toxique. En effet, la concentration de l'ALAT n'augmente pas d'une manière significative chez les animaux traités par l'huile totale, l'huile polaire, l'huile neutre, La thymoquinone, et la métformine (26,46 $\pm$ 2,95, 18 $\pm$ 3,32, 20,35 $\pm$ 1,26, 20,91 $\pm$ 3,90, 24,63 $\pm$ 0,43 U/l respectivement) par rapport au groupe1 (rats normaux) (56,52 $\pm$ 10,12). Chez tous les groupes des rats diabétiques traités, à l'exception des animaux diabétiques traités avec la métformine, on note une réduction significative des taux de l'ALAT ($p \leq 0.05$).

Le taux des ASAT ne change pas d'une manière significative chez les différents groupes traités. Seul le groupe 3, traité avec 100mg /kg de l'huile totale présente une augmentation légère mais significative des ASAT (26,46 $\pm$ 2,95), comparé au groupe 1 normal (20,30 $\pm$ 4,04) ($p \leq 0.05$).

Le dosage de gamma GT révèle que les groupes présentent des valeurs normales et ne révèle aucune anomalie soulignant l'absence de cytolysé hépatique. En effet, le taux de gamma GT des rats diabétiques non traités (G2), rats diabétiques traités par l'huile totale (G3), rats diabétiques traités par la fraction polaire (G4) présente une légère diminution ($0,87 \pm 0,10$, $0,83 \pm 0,08$, $0,80 \pm 0,21$ U/l respectivement par rapport au groupe témoin ($1,35 \pm 0,2$ U/l). l'augmentation de la gamma GT des rats du groupe traité avec 100mg /kg de la fraction neutre n'est pas significative. Cependant, une augmentation remarquable de la concentration de gamma GT est observée dans le groupe traité par la métformine ($3,58 \pm 0,57$ U/l). Cette augmentation est très significative comparée au groupe normal ($p \leq 0.01$).

Pour la bilirubine totale, on note une diminution significative ($p \leq 0.05$) des concentrations des groupes traités par l'huile polaire, l'huile neutre, la thymoquinone, et la métformine ($0,047 \pm 0,007$, $0,059 \pm 0,005$, $0,049 \pm 0,005$, $0,040 \pm 0,007$ mg/dl respectivement) par rapport au groupe témoin ($0,067 \pm 0,007$ mg/dl). Une augmentation non significative du taux de la bilirubine totale est observée pour le groupe traité par l'huile totale ($0,070 \pm 0,005$ mg/dl) par rapport au groupe témoin. Cependant une diminution importante est notée dans le groupe G2 ($0,021 \pm 0,0004$ mg/dl).

D'après les résultats des dosages de la phosphatase alcaline, une diminution globale a été enregistrée pour l'ensemble des groupes traités. Cette diminution est significative pour les groupes 3 traités avec l'huile totale ($p \leq 0.05$). Il est important de signaler que la diminution du taux de la phosphatase alcaline est très significative pour les animaux traités avec la fraction neutre (G5) ($p \leq 0.05$).

Bien qu'une diminution globale des marqueurs hépatique ait été observée après les différents traitements avec l'huile totale de *Nigella sativa* et ses deux fractions neutre et polaire, la thymoquinone et la métformine, cela n'indique pas une quelconque toxicité. En effet, une toxicité hépatique se traduit par une augmentation des taux des marqueurs hépatiques dans le sang, résultat de lésions au niveau du tissu hépatique.

3.3. Histopathologie des tissus hépatiques des rats traités

Les résultats de l'analyse histo-pathologique du foie sont présentés sur la figure 49. Contrairement aux résultats du dosage des marqueurs hépatiques, qui n'ont révélé aucune toxicité apparente, l'analyse histo-pathologique, montre que quelques traitements causent des lésions hépatiques plus ou moins importantes (Figure 49).

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 sinusoidaux convergeant vers une veine Centro-lobulaire. L'espace porte d'un foie normale est composé de trois lumières : une veine, l'artère, et le canalicule biliaire (Figures 49 A1 et A2). En comparant le tissu hépatique de rat du groupe 1 avec celui du groupe 2 (diabétique non traité), on remarque que ce dernier présente un élargissement de l'espace porte à cause de la formation d'un œdème (Figure 49B).

Le foie des rats du groupe 3 (traité avec 100 mg/Kg/j de l'huile totale des graines de *Nigella sativa*) présente un élargissement de l'espace porte causé par un œdème d'une part, et d'une autre part, on remarque des manifestations inflammatoires dues à l'infiltration des cellules mononuclées. Ces manifestations indiquent une lésion hépatique ou hépatite (Figure 49 C). Le tissu hépatique des rats du groupe 4 (traité avec 100 mg/Kg/j de la fraction polaire de l'huile) présentent un aspect quasi normal avec un espace porte subnormal, sans infiltration inflammatoire (Figure 49D). Les rats du groupe 5 (traité avec 100mg/Kg/j de la fraction neutre de l'huile) présentent un élargissement de l'espace porte et une infiltration inflammatoire débutante dépassant pas la lame bourdante ce qui est synonyme d'une lésion hépatique (Figure 49 E). Le foie des rats du groupe 6 (traité par 25mg/Kg/j par la thymoquinone) présentent aussi un élargissement de l'espace porte relativement petit, sans infiltration inflammatoire (Figure 49 F). Le foie des rats du groupe 7 (traité par 25mk/kg/j par la métformine) est normal présentant un élargissement réduit de l'espace porte, sans infiltration inflammatoire (Figure 49 G).

La comparaison des coupes histologiques de foie des différents autres groupes nous a permis de constater que la persistance de l'œdème est due au diabète, alors que l'infiltration inflammatoire serait due à la fraction polaire. La diminution de l'élargissement de l'œdème, observée chez le groupe traité avec l'huile neutre, représente un effet hépato-protecteur exercé par cette fraction. Cet effet hépato-protecteur n'a pas été observé avec tous les autres traitements y compris la thymoquinone.

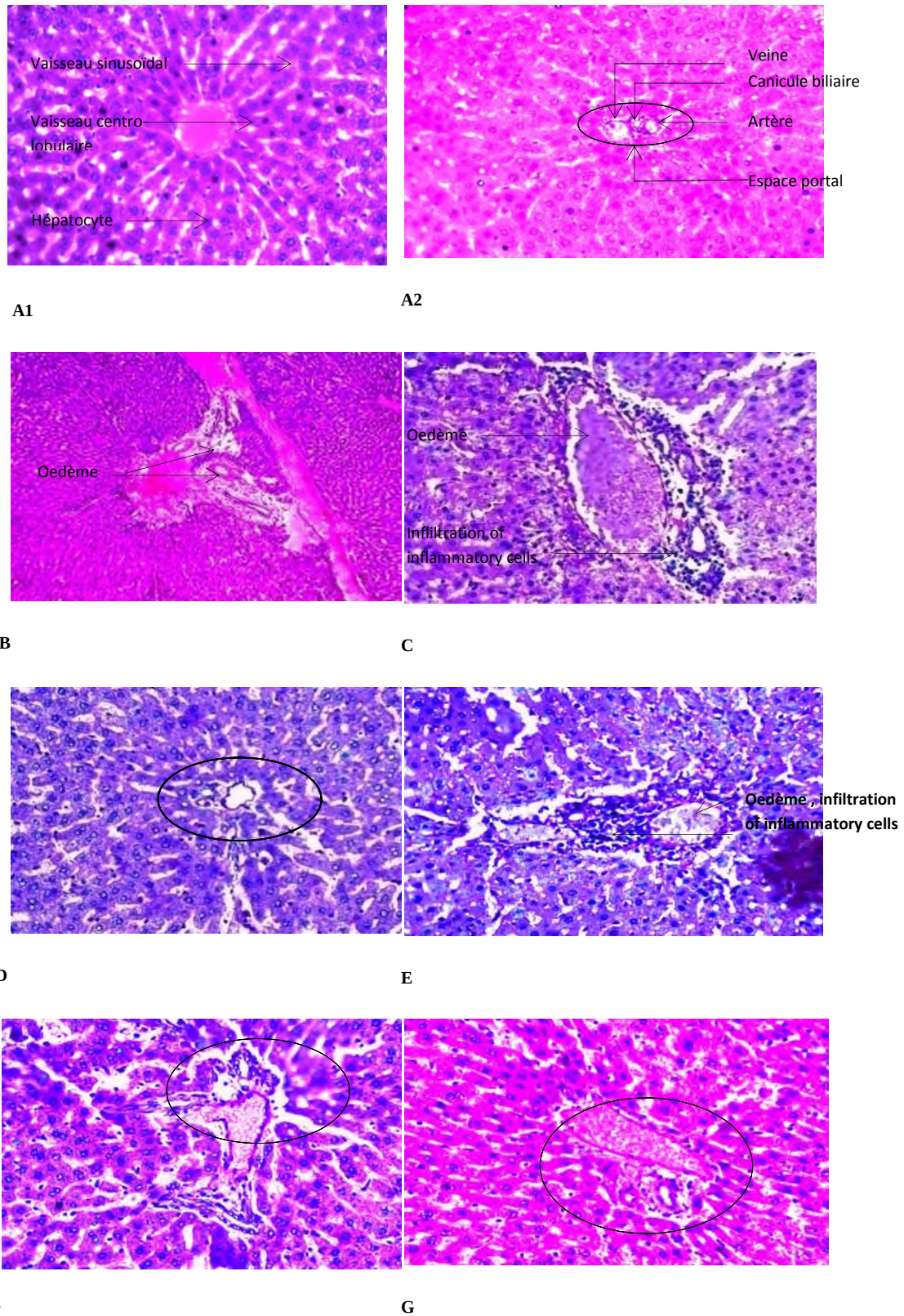


Figure 49: Effet des extraits des graines de *Nigella sativa* sur les tissus hépatiques des rats diabétiques. **A:** tissu hépatique de rat normal(groupe1), **A2:** tissu hépatique de rat normal(groupe1), **B:** tissu hépatique de rat diabétique(groupe2), **C:** tissu hépatique de rat diabétique traité avec l'huile totale (groupe3), **D:** tissu hépatique de rat diabétique traité avec la fraction polaire (groupe 4), **E:** tissu hépatique de rat diabétique traité avec la fraction neutre (groupe5) , **F:** tissu hépatique de rat diabétique traité avec TQ(groupe6), **G:** tissu hépatique de rat diabétique traité avec la métformine (groupe 7)

Contrairement aux données publiées, la thymoquinone, l'huile des graines de *Nigella sativa* et, notamment, sa fraction polaire présentent une certaine hépato-toxicité. Cette dernière reste néanmoins modérée du moment qu'elle n'a pas affectée les marqueurs hépatiques enzymatiques et non enzymatiques.

L'effet toxique de la thymoquinone n'a pas été démontré mais au contraire cette molécule présentait un effet hépato-protecteur (**Daba et Abdel-Rahman, 1998**). La culture des hépatocytes isolée en présence de l'agent hépatotoxique TBHP (2mM) et de la thymoquinone (1mM) diminue significativement la libération des enzymes hépatiques et augmente le taux du glutathion (**Daba et Abdel-Rahman, 1998**). Dans une étude plus récente, il a été démontré que l'huile essentielle de *Nigella sativa* (0.2ml/kg) administrée par voie intra-péritonéale, chez des rats, réduit les effets délétères des lésions d'ischémie –reperfusion provoquées au niveau du foie (**Lei et al., 2012**). *Nigella sativa* protège le foie aussi contre l'effet toxique des métaux tel que le plomb et le cadmium (**Kapoor, 2009 ; Zafeer et al., 2012**).

Meral et ses collaborateurs ont constaté que l'huile totale des graines de *Nigella sativa* améliore le système de défense antioxydant du foie chez les lapins rendus diabétiques par l'injection de 150 mg/kg de l'alloxan. En effet, l'huile totale a permis la réduction du taux de MDA des lapins diabétiques d'une part, et l'augmentation de la concentration du GSH et celui de la céruloplasmine d'une autre part (**Meral et al. 2001**). Cette même étude a démontrée aussi que l'huile des graines de *Nigella sativa* a permis aussi de constater que l'aspect morphologique du tissu hépatique demeure normal (**Meral et al., 2001**).

Kanter a déterminé un effet neuroprotecteur de la thymoquinone et de l'huile des graines de *Nigella sativa* vis-à-vis du toluène ou dans le cas de neuropathie expérimentale du nerf sciatique. Ces effets sont observés avec des concentrations de l'huile des graines de *Nigella sativa* de l'ordre de 400 mg/kg/jour et de 50 mg/kg/jour pour la thymoquinone (**Kanter, 2007ab et 2008**).

Un effet cyto et géno-toxique en fonction de la concentration de la thymoquinone a été rapporté (**Khader et al., 2009**). En effet, la thymoquinone induit un effet antiprolifératif à une concentration de 20µM 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, elle induit une géni-toxicité significative à une concentration $\geq 20\mu\text{M}$. La thymoquinone peut être métabolisée en espèces réactive et augmente le stress oxydatif qui contribue à la déplétion des enzymes antioxydants

et provoque l'oxydation de l'ADN dans les hépatocytes traités avec des concentrations élevées de la thymoquinone (**Khader *et al.*, 2009**).

La présente étude a été organisée en trois parties complémentaires. Lors de la première partie, nous avons essayé de caractériser l'huile de *Nigella sativa*, obtenue selon un protocole d'extraction ayant subi quelques modifications, mis au point par Ramadan et Mörsel, lors de leurs différentes études sur l'huile de ces graines (**Ramdan et Mörsel, 2002 a, 2002b**). Cette caractérisation a concernée la détermination des propriétés physico-chimiques de l'huile, la caractérisation de sa teneur en acides gras, phytostérols et triglycérides.

La deuxième partie de l'étude avait comme objectif l'étude des propriétés hypoglycémiantes de certains extraits, notamment l'huile. L'étude de l'effet hypoglycémiant a permis de déterminer deux niveaux d'action de l'huile de *Nigella sativa* dans son processus hypoglycémiant.

La troisième partie était consacrée à l'étude de la toxicité de l'huile et ses fractions au niveau hépatique. La toxicité a été testée pour les extraits à des concentrations ayant donné un effet hypoglycémiant notable.

L'huile de *Nigella sativa* a été extraite en deux étapes, en utilisant deux solvants, le méthanol puis l'hexane. Lors de la première étape, c'est-à-dire, avec le méthanol, l'extraction a été réalisée sous pression et à chaud, en utilisant le soxhlet. Une fois l'extrait méthanolique est refroidi, l'huile est obtenue après une deuxième extraction avec de l'hexane. Cette méthode indirecte permet d'enrichir l'huile en composés dont la polarité est plus importante que lorsqu'on réalise une extraction en une seule étape c'est-à-dire avec l'hexane directement (**Ramdan et Mörsel, 2002 b**). Le rendement d'extraction de l'huile ainsi obtenue avoisine les 28%. Cette valeur est légèrement plus faible que celles cités dans différentes études (**Üstun, 1990 ; Ramdan et Mörsel, 2002 a, 2002b; Atta, 2003; Cheikh-Rouhou et al., 2007**). Les méthodes d'extractions employées peuvent expliquer la différence (**Benkaci-Ali et al., 2007**).

Le fractionnement de l'huile sur une colonne de silice (Silice 60 ,70-230 Mesh) a donné deux grandes sous fractions ; neutre (97% environ) et polaire (3% environ) proches des taux trouvés par **Ramdan et Mörsel (2002b)**.

Les paramètres physico-chimiques, sont dans l'ensembles très proches de ceux des huiles étudiées a travers le monde (**Üstun, 1990 ; Ramdan et Mörsel, 2002 a, 2002b ; Atta, 2003 ; Cheikh-Rouhou et al., 2007, Benkaci-Ali et al., 2007**). Les quelques différences

mentionnées sont dues essentiellement aux différentes méthodes d'extraction et aux biotopes des différentes cultures (**Benkaci-Ali et al., 2007**).

Ce qui ressort aussi de cette étude est notamment **le taux des insaponifiables**. Cet indice requière une importance majeure car il représente le taux des composés biologiquement actifs, il s'agit des phytostérols, les vitamines liposolubles et les autres métabolites secondaires lipophiles différents des lipides classiques. En effet, **nous avons déterminé que notre huile est sensiblement plus riche en ces composés que les autres huiles étudiées**. La méthode d'extraction en utilisant le méthanol en première étape semble être un facteur important ayant aboutit à l'enrichissement de l'huile en ces composés actifs.

Cette étape de la caractérisation a permis de déterminer la teneur en acides gras de l'huile totale de *Nigella sativa* et dans ses quatre fractions neutres. L'étude montre que notre huile renferme tous les acides gras cités dans les différentes études (**Üstun, 1990 ; Ramdan et Mörsel, 2002b ; Atta, 2003 ; Nickavar et al., 2003 ; Cheikh-Rouhou et al., 2007**).

La recherche en particulier du taux des acides gras insaturés et surtout du rapport des insaturés sur les saturés requière une importance cruciale dans cette étude. Nous avons déterminé que le rapport des insaturés/saturés dans l'huile totale est de 6.49 et qu'il varie d'une fraction à une autre. La valeur la plus importante a été observée pour la fraction F1 (8.02%). Il est connu que plus ce rapport est élevé, plus la teneur en acides gras insaturés est importante. L'intérêt de cette donnée a été révélé par différentes études qui ont décrit les effets biologiques des acides gras insaturés. Ainsi et à titre d'exemple, il a été rapporté que l'absorption de l'acide linoléique (oméga 3) ne change pas significativement le taux de cholestérol sanguin. Il diminue, par contre, le taux de triglycérides sanguins (**Von Schacky, 2006**). Il semble aussi diminuer légèrement le niveau de pression artérielle (**Geleijnse et al., 2002**) ainsi que la fréquence cardiaque (**Mozaffarian, 2007**) et réduit l'agrégation plaquettaire (**Lev et al., 2010**).

Ces acides gras semblent jouer un rôle thérapeutique contre la pathologie du diabète. , il a été rapporté que l'acide palmitoléique réduit l'hyperglycémie et l'hypertriglycéridémie chez les souris KK-A^y présentant un diabète de type 2 spontané. La réduction de l'hyperglycémie et de l'hypertriglycéridémie est due au fait que cet acide gras augmente la sensibilité à l'insuline. Son action est aussi au niveau du métabolisme hépatique des lipides chez ces mêmes souris (**Zhi-Hong Yang et al., 2011**).

Dans une autre étude, une formulation composée des omégas 3 et des tripterpènes isolés de l'huile essentielle du fenugrec inhibe les enzymes digestives clés impliquées dans le diabète : α -amylase pancréatique et la maltase in vivo. Cette formulation réduit significativement la glycémie, la triglycéridémie, et la cholestérolémie (cholestérol total) et le taux du LDL-Cholestérol et ce dans le sang et dans le foie. Ce qui contribue au le maintien de l'homéostasie des lipides plasmatiques (**Hamdan et al., 2011**).

Les triglycérides apportés par les différents aliments ne sont pas directement utilisés par l'organisme. Ils sont hydrolysés dans le duodénum après leur émulsifiassions avec les sels biliaires. L'hydrolyse par les lipases pancréatiques et les colipases libère les acides gras qui seront par la suite absorbés au niveau de l'intestin (**Armand, 2008**). La nature des acides gras libérés lors de ce processus pourrait nous donner une idée sur la qualité des triglycérides contenus dans l'huile consommée. Ainsi, l'analyse des triglycérides de *Nigella sativa* peut nous renseigner sur les acides gras qui seront assimilés par l'organisme.

Les triglycérides ont été déterminés dans les quatre fractions neutres de l'huile de *Nigella sativa*. Les résultats ont révélé que ces composés sont constitués des acides gras qui ont déjà été déterminés lors de la précédente étude, à savoir les acides gras saturés : l'acide palmitique et l'acide stéarique et les acides gras insaturés : l'acide oléique, l'acide linoléique et l'acide linolénique. Les triglycérides détectés sont constitués essentiellement d'acides gras insaturés. L'intérêt biologique réside dans le fait que ces composés pourraient constituer un apport supplémentaire en acides gras insaturés dont l'action biologique en général et antidiabétique en particulier a été démontrée (**Zhi-Hong Yang et al., 2011, Hamdan et al., 2011**).

Les phytostérols sont des composés bioactifs, qui se trouvent dans tous les aliments d'origine végétale. Ils sont connus pour leur action sur l'inhibition de l'absorption intestinale du cholestérol et par conséquent, la diminution de la cholestérolémie (**Nigon et al., 2000**).

L'analyse de la composition de l'huile totale de *Nigella sativa* et de ses fractions neutres, a montré que cette dernière possède une teneur importante et une composition riche et variée en phytostérols. Le 1-triacontanol, le stigmastérol, le campésterol et le b-sitostérol sont les phytostérols et stanols les plus abondants dans l'huile de *Nigella sativa*. Leur effet sur la teneur sérique en cholestérol a été bien étudié, et de nombreux essais cliniques ont prouvé

que les produits commerciaux enrichis en phytostérols permettent de réduire le taux de cholestérol sérique (**Sanclemente et al., 2009**).

L'Absorption intestinale du cholestérol est un processus qui se déroule en plusieurs étapes où stérols et stanols végétaux peuvent agir : **i**) en atténuant l'expression du gène NPC1L1, ce qui peut entraîner une absorption d'un taux plus faible de cholestérol à partir de la lumière intestinale, **ii**) en l'abaissement le taux d'estérification du cholestérol par le (ACAT2 acyl-CoA cholestérol acyltransférase) et, par conséquent, sur la quantité de cholestérol sécrété par les chylomicrons ANDC) et **iii**) une régulation positive de l'expression des transporteurs ABC, ABCG5 et ABCG8 dans les cellules intestinales, ce qui peut entraîner une excrétion accrue du cholestérol par les membranes basales des entérocytes de la lumière intestinale (**Sanclemente et al., 2009**).

Dans une autre étude, on a démontré que le γ -sitostérol isolé de *Lippia nodiflora*, étudié pour sa propriété antidiabétique chez des rats rendus diabétiques par la streptozotocine, augmente le taux de l'insuline en relançant sa sécrétion en réponse au glucose. L'administration orale de γ -sitostérol (20mg /kg) une fois par jour pendant 21 jours chez les rats diabétiques a entraîné une diminution significative de la glycémie et de l'hémoglobine glycosylée avec une augmentation significative du niveau plasmatique d'insuline, du poids corporel et de la consommation alimentaire (**Rangachari et al., 2011**).

De plus, le γ -sitostérol a présenté une activité anti-hyperlipidémique : diminution significative du cholestérol sérique total, de triglycérides et de lipoprotéines des VLDL chez les rats traités. Une diminution significative a aussi été observée dans les taux des marqueurs hépatiques d'alanine aminotransaminase (ALAT), taux d'aspartate aminotransférase (ASAT), la phosphatase alcaline et de la phosphatase acide chez les rats traités avec le γ -sitostérol par rapport aux rats diabétiques non traités (**Rangachari et al., 2011**).

Toutes ces études nous permettent une orientation vers une hypothèse concernant le rôle des constituants majeurs de l'huile de *Nigella sativa* dans ses propriétés hypoglycémiantes, hypo-lipidémiques et protectives.

L'étude de l'effet hypoglycémiant de *Nigella sativa* et ses différents extraits chez les rats rendus diabétiques par la Nicotinamide/streptozotocine (230/65 mg/Kg) nous a permis de définir plusieurs niveaux sur lesquels *Nigella sativa* agit pour réduire au final la glycémie.

Dans la première étape, nous avons démontré que c'est l'huile totale de *Nigella sativa* qui permettait une meilleure réduction de la glycémie. En effet, à une concentration de 400 mg/Kg et durant 30 jours de traitement la glycémie est réduite près de 53 % et de plus de 35% lorsqu'une concentration quatre fois plus faible de l'huile est utilisée (100 mg/Kg durant 30 jours). La fraction neutre semble plus efficace dans cet effet que la fraction polaire (18 % de réduction avec la fraction neutre contre 9.72 % pour la fraction polaire dans les mêmes conditions de traitement).

Les tests qui ont été menés, dans cette étude, sur l'effet de l'huile de *Nigella sativa* sur la glycémie post- prandiale d'un côté et sur l'inhibition de l' α glucosidase d'un autre côté, contribuent à la conclusion que l'huile de *Nigella* réduit la glycémie chez les rats diabétique selon un processus post-prandial. L'analyse des résultats indique que c'est les constituants de la fraction polaire de l'huile de *Nigella sativa* qui sont essentiellement responsables de cet effet hypoglycémiant post-prandial.

La dernière partie de l'étude de l'effet hypoglycémiant et portant sur l'effet sur les îlots de Langerhans, indique clairement que *Nigella* agit aussi au niveau du pancréas. La régénération des îlots après leur destruction par la streptozotocine pourrait être un facteur important dans la relance de la production de l'insuline, c'est ce qui a été aussi démontré dans quelques études, notamment celles de Kanter et ses collaborateurs (2003, 2004). Dans notre étude nous avons démontré que c'est la fraction neutre de l'huile totale qui est responsable de cette régénération.

Plusieurs dizaines d'études ont été réalisées sur l'activité hypoglycémiant de *Nigella sativa*. Ces études ont signalé l'effet hypoglycémiant soit de l'extrait méthanolique de la nigelle (Kaleem et al., 2006; Houcher et al., 2007), soit la thymoquinone (Fararh et al., 2005; Kanter, 2008) soit l'huile essentielle (Kanter et al., 2003, Fararh et al., 2004, Kanter et al., 2009) ou l'extrait aqueux (Meddah et al., 2009) et finalement l'huile fixe (Meral et al., 2001, Houcher et al., 2007).

Ces travaux et d'autres ont démontré que ces différents types d'extrait agissent à des niveaux métaboliques différents : régulation hépatique de la production de glucose (Fararh et al., 2004) , stimulation de la production de l'insuline (Meral et al., 2001; Rchid et al., 2004; Kanter , 2008, Kanter et al., 2009) et post-prandiale (Meddah et al., 2009).

Nous arrivons donc à la conclusion que l'effet hypoglycémiant traditionnellement observé avec l'utilisation de *Nigella sativa* pourrait s'agir d'un phénomène synergique où chaque constituant agirait à un niveau précis et différent. Le résultat serait une diminution de la glycémie globale.

L'huile de *Nigella sativa* a été fractionnée sur colonne de silice en deux fractions ; neutre et polaire. L'analyse de la fraction neutre et de ses quatre sous fractions a montré une richesse de ces fractions en acides gras insaturés, en triglycérides dont les acides gras qui les constituent sont essentiellement insaturés, une grande richesse en phytostérols et alcools supérieurs. De plus les propriétés physico-chimiques de l'huile totale indiquent que cette dernière est de grande qualité.

Ces constituants peuvent être, même en partie, responsables de certaines activités hypoglycémiantes et hypolipidémiques de l'huile de *Nigella sativa*. Rappelons que l'acide palmitoléique réduit l'hyperglycémie et l'hypertriglycéridémie chez les souris KK-A^y présentant un diabète de type 2 spontané. Il augmente aussi la sensibilité à l'insuline et que son action est observée aussi au niveau du métabolisme hépatique des lipides chez ces mêmes souris (**Zhi-Hong Yang et al., 2011**). Aussi, une formulation composée des oméga3 et des tripterpènes isolés de l'huile essentielle du fenugrec inhibe l' α -amylase pancréatique et la maltase in vivo. Cette formulation réduit significativement la glycémie, la triglycéridémie, la cholestérolémie (cholestérol total) et le taux du LDL-Cholestérol dans le sang et dans le foie (**Hamdan et al., 2011**).

L'acide linoléique agit sur l'obésité des souris obèse résistantes à l'insuline et ce en modulant le métabolisme hépatique (**Noto et al., 2006**)

Les stérols, tel que le γ -sitostérol réduit la glycémie et l'hémoglobine glucosylée et augmente la concentration plasmatique d'insuline (**Rangachari et al., 2011**). Le γ -sitostérol possède aussi une activité anti-hyperlipidémique et hépato-protectrice (**Rangachari et al., 2011**).

Les constituants de la fraction polaire sont en cours d'étude. La comparaison avec les résultats de **Ramadan et Morsel (2002)** nous permet de prédire qu'ils peuvent être des glycolipides. Cependant une analyse chimique approfondie serait indispensable pour le confirmer.

Les effets protecteurs de *Nigella sativa* ont fait l'objet de plusieurs études. Ces effets sont observés au niveau hépatique et pancréatique (**Yeldiz et al., 2008 ; Kanter et al., 2009 ;**

Zafeer et al.,2012), nephretique (**Yeldiz et al.,2010 ; Saleem et al., 2012 ; Ulu et al., 2012**), respiratoire et pulmonaire (**Kanter , 2009 ; Tayman et al., 2012**).

Les études portant sur la toxicité de *Nigella sativa* et de ses composants sont plus rares. Néanmoins, Zaoui et ses collaborateurs (2002) ont étudié la toxicité aigue de l'huile fixe de *Nigella sativa* chez les souris. Les DL50 ont été déterminées pour des doses uniques, administrées par voie orale et intra-péritonéale. Pour une dose de 28,8ml/Kg (voie orale), la DL50 varie de 26.2 à 31.6. La DL50 pour une concentration de l'huile de 2,06 ml/Kg. (voie intra-péritonéale) est comprise entre 1,86 et 2,26 mg/Kg (**Zaoui et al., 2002**).

La toxicité chronique a été aussi étudiée chez les rats traités quotidiennement avec une dose orale de 2 ml/Kg pendant 12 semaines. Aucun changement dans les concentrations des enzymes hépatiques et ceux des organes: cœur, foie, reins et le pancréas, n'a été observé. Cependant, le taux de cholestérol sérique, de triglycérides et de glucose ainsi que le nombre de leucocytes et de plaquettes ont diminué de façon significative par rapport aux valeurs de contrôle. Une augmentation significative du niveau d'hématocrite et d'hémoglobine a été également observée. Un ralentissement du gain de poids a également été observé chez les rats traités par rapport aux animaux témoins (**Zaoui et al., 2002**).

Ces résultats indiquent la faible toxicité de l'huile fixe *Nigella sativa* et suggère une large marge de sécurité pour les doses thérapeutiques de l'huile fixe de *Nigella sativa*, mais les changements dans le métabolisme de l'hémoglobine et la baisse du nombre des leucocytes et des plaquettes ont incité Zaoui et ses collaborateurs à émettre des réserves quand aux conditions de l'utilisation de cette huile.

Dans une étude plus récente, la toxicité de la thymoquinone fut évaluée (**Khader et al., 2009**). La thymoquinone a été appliquée à des cultures primaires d'hépatocytes de rat, et les deux effets cyto-et géno-toxiques ont été testés. Les Indices mitotiques et les taux de l'apoptose et de nécrose ont été déterminés en tant que paramètres de cyto-toxicité, tandis que des aberrations chromosomiques et des cellules mononuclées ont été utilisées en tant que paramètres de géno-toxicité. Dans cette étude, il a été démontré que la thymoquinone présentait des effets cyto-et génotoxiques d'une manière dépendante de la concentration: La thymoquinone induit d'importants effets anti-prolifératifs à 20 uM et la cytotoxicité aiguë à des concentrations plus élevées. La Thymoquinone augmente de façon significative les taux de cellules nécrotiques à des concentrations comprises entre 2,5 et 20uM.

En outre, la thymoquinone induit la génotoxicité significative à des concentrations supérieures à 1,25 uM. Ces observations corroborent avec des études précédentes pour lesquelles la thymoquinone provoque une déplétion du glutathion et des dommages au foie, mais en contradiction avec les rapports indiquant propriétés antioxydantes et anti-clastogènes : la thymoquinone pourrait être métabolisée en espèces réactives et augmenter le stress oxydatif, ce qui contribue à l'épuisement des enzymes anti-oxydantes et des dommages à l'ADN dans les hépatocytes traités avec des concentrations élevées de thymoquinone (**Khader et al., 2009**)

La présente étude avait comme objectif, l'évaluation de l'hépto-toxicité de l'huile de *Nigella sativa*. Lors de la première étape de l'évaluation de l'hépto-toxicité, nous avons utilisé la méthode des PCLS. L'extrait méthanolique, l'huile totale et la fraction polaire de l'huile ont été testés pour leur toxicité en présence et en absence d'agent hépatotoxique : l'acétaminophen. Les résultats indiquent que ces extraits n'ont pas d'effet hépatoprotecteur notable, mais ne sont pas non plus hépatotoxiques.

Dans la deuxième partie de l'étude de toxicité, les extraits ont été évalués pour hépatotoxicité à des concentrations les plus faibles ayant donné des effets hypoglycémiantes notables et dans une durée équivalente à la durée du traitement de l'hyperglycémie.

Les résultats des dosages des paramètres enzymatiques et non enzymatiques (la bilirubine totale) hépatiques n'ont montré aucun signe de lésion hépatique, donc pas d'effet toxique. L'analyse des coupes histologique des tissus hépatiques a montré en revanche que l'huile totale et sa fraction polaire induisaient des lésions avec ou sans état inflammatoire. La thymoquinone, aussi, a provoqué des lésions avec manifestation inflammatoire, ce qui contredit les résultats de plusieurs études.

Finalement, vue l'importance des résultats de l'évaluation de la toxicité, des études plus approfondies devraient être réalisées afin de mieux élucider la réelle toxicité de l'huile de *Nigella sativa*, de ses fractions polaires et de la thymoquinone.

Conclusion

La présente étude a permis de caractériser l'huile des graines de *Nigella sativa*, d'étudier ses propriétés hypoglycémiantes et d'évaluer sa toxicité hépatique. Les résultats les plus importants sont :

1- L'huile totale de *Nigella sativa* est, sans doute, la fraction responsable de l'effet hypoglycémiant. Ses caractéristiques physico-chimiques indiquent qu'elle est une huile d'une grande qualité biologique. Son fractionnement par chromatographie sur colonne a permis d'obtenir deux grandes fractions : a) **la fraction neutre**, fractionnée elle-même en quatre sous fractions, et b) **La fraction polaire**. Son fractionnement par chromatographie a permis d'obtenir trois sous fractions polaires.

L'analyse fine par GC et HPLC de l'huile totale et de ses fractions neutres a permis aussi de déterminer leur composition en acides gras, en triglycérides et en stérols et alcools supérieurs. Ces résultats indiquent, encore une fois la richesse de cette huile en composés lipidiques bioactifs, ce qui permettrait d'expliquer les propriétés pharmacologiques en générale et hypoglycémiantes en particulier de *Nigella sativa*.

2- Les tests biologiques utilisés pour déterminer l'effet hypoglycémiant de l'huile totale et de ses fractions ont permis à la fois de confirmer cet effet mais aussi de distinguer deux mécanismes différents selon lesquels l'huile de *Nigella* agirait pour réduire l'hyperglycémie : il s'agit du processus post-prandial et de l'action de l'huile sur le pancréas, notamment sur les îlots de Langerhans.

Ce que nous avons apporté de nouveau dans cette partie est la détermination des types de molécules lipidiques impliquées dans les deux mécanismes. Nous avons démontré que la fraction polaire est responsable de l'effet hypoglycémiant post-prandial, alors que la fraction dite neutre est impliquée dans la régénération des îlots de Langerhans après leur destruction par la streptozotocine.

Ces résultats nous conduisent à l'idée selon laquelle l'huile totale réduit efficacement la glycémie chez les rats rendus diabétiques par la streptozotocine selon une synergie entre les deux mécanismes employés par ses différentes fractions.

3- La toxicité de l'huile totale de *Nigella sativa* a été d'abord évaluée sur des tranches fines de foie (PCLS). Cette approche a montré clairement que l'huile de *Nigella sativa* n'avait pas un effet hépatoprotecteur contre le l'acétaminophen (le paracétamol). Cependant, le test indique en même temps que l'huile n'était pas hépatotoxique. Dans un deuxième temps, 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 appliquées, c'est-à-dire, quantité des extraits administrés et durée du test.

L'ensemble des résultats ouvrent de nouvelles perspectives dans l'étude de l'effet hypoglycémiant de *Nigella sativa*, à savoir :

- La caractérisation des molécules de la fraction polaire impliquées dans l'inhibition de l'alpha glucosidase. Cette étude permettrait de proposer de nouvelles molécules d'origine naturelle pour réduire l'hyperglycémie post-prandiale. Rappelons ici que les molécules commercialisées actuellement et utilisées pour cet effet présentent d'énormes inconvénients notamment des effets secondaires peu tolérés par les patients.

- L'étude approfondie de l'effet de la fraction neutre sur la régénération du pancréas. Ceci passe aussi par la caractérisation de ces composés et l'examen minutieux de l'effet en utilisant des approches techniques et expérimentales plus précises tel que le marquage radio-immunologique de l'insuline ...etc. Cette étude permettrait, peu être, de franchir une nouvelle étape dans le traitement du diabète.

Références Bibliographiques

- Abdelmeguid NE, Fakhoury R, Kamal SM, Al Wafai RJ. Effects of *Nigella sativa* and thymoquinone on biochemical and subcellular changes in pancreatic β -cells of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Diabetes*. 2010; 2(4): 256-266.
- Abdel-Zaher Ahmed O, Mahran S Abdel-Rahman, Fahmy M ELwasei. Protective effect of *Nigella sativa* oil against tramadol-induced tolerance and dependence in mice: Role of nitric oxide and oxidative stress. *NeuroToxicology*. 2011; 32 (6): 725-733.
- Abena A et Willem JP. 6^{ème} Symposium International d'Aromathérapie et plantes médicinales (1^{ère} partie). *Phytothérapie*. 2004 ; 5: 162-169.
- Acad B, Dent N-C. Diabète de type II et parodontopathies: Rapport de l'académie nationale de chirurgie dentaire. 2007; 50 : 133-140.
- ADA . American Diabetes Association. Economic costs of diabetes in the U.S. in 2007. *Diabetes Care*. 2008; 31:596–615.
- Ahmad A, Husain A, Mujeeb M, Khan SA, Najmi AK, Siddique NA, Zoheir A. Damanhour, Anwar F. A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2013; 3(5): 337-352
- Alarcon-Aguilara FJ, Roman-Ramos R, Perez-Gutierrez S, Aguilar-Contreras A, Contreras-Weber CC, Flores-Saenz JL. Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *Journal of Ethnopharmacology*. 1998;61:101–110.
- Al-Awadi F.M, Khattar M, Gumaa KA. On the mechanism of the hypoglycaemic effect of a plant extract. *Diabetologia*. 1985, 28: 432-434.
- Al-Beitawi NA, El-Ghousein SS, Nofel AH. Replacing bacitracin methylene disalicylate by crushed *Nigella sativa* seeds in broiler rations and its effects on growth blood constituents and immunity. *Livestock Sciences* 2009; 125: 304-307.
- Albisser AM, Leibel BS, EwartTG, Davidovac Z, Botz Z, Zingg W. An artificial endocrine pancreas. *Diabetes*. 1974; 23: 389-396.
- Ali BH. The effect of *Nigella sativa* oil on gentamicin nephrotoxicity in rats. *Am J Chin Med* 2004;32:49-55.
- Ali L, A.K. Azad Khan, M.I.R. Mamun, M. Mosihuzzaman, N. Nahar, M.N.E. Alan,B. Rokeya, Studies on the hypoglycemic effects of fruits pulp, seed and whole plant of *Momordica charantia* on normaland diabetic model rats. *Planta Medica*.1993; 59: 408–412.
- Aljabre Salih Hamad Mohamad, Mohamad Akram Randhawa, Naeem Akhtar, Omar Mohamad Alakloby, Abdulrahman Mohamad Alqurashi, Ali Aldossary. Antidermatophyte activity of ether extract of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005; 101(1–3):116-119
- Al-Jishi S.A, B. Abuo Hozafa Effect of *Nigella sativa* on blood hemostatic function in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003; 85(1):7-1
- Al-Naggar TB, Gomez-Serranillos MP, Carretero ME, Villar AM. Neuropharmacological activity of *Nigella sativa* L. extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003; 88: 63-68.
- Altan MF, Kanter M, Donmez S, Kartal ME, Buyukbas S. Combination therapy of *Nigella sativa* and human parathyroid hormone on bone mass, biomechanical behavior and

- structure in streptozotocin-induced diabetic rats. *Acta Histochemica* 2007; 109: 304-314.
- ANAES. Suivi du patient diabétique de type 2 à l'exclusion du suivi des complications. Rapport 1999.
- Anwar B M, Tayyab M. Effect of *Nigella sativa* on lipid profile in albino rats. *Gomal Journal of Medical Sciences*. 2007; 5(1). 6-12.
- Archambeaud F. Actualité thérapeutiques dans le diabète de type 2. *Actualités pharmaceutiques hospitalières*. 2008; 14 :13-17.
- Armand M. Digestibilité des matières grasses chez l'homme. *Sciences des Aliments*. 2008; 28 :84-98.
- Ashraf M, Ali Q, Iqbal Z. Effect of nitrogen application rate on the content and composition of oil, essential oil and minerals in black cumin (*Nigella sativa*) seeds. *Journal of the Science of food and agriculture*. 2006; 86: 871-876.
- Atta Mohamed Bassim. Some characteristics of nigella (*Nigella sativa* L.) seed cultivated in Egypt and its lipid profile. *Food Chemistry*. 2003; 83(1): 63-68.
- Atta-Ur-Rahman, Khurshid Zaman . Medicinal plants with hypoglycemic activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 1989; 26(89): 1-55.
- Bailey CJ, Day C. Traditional plant medicines as treatment for diabetes. *Diabetes Care*. 1989; 12: 553-64
- Banerjee S, Azmi AS, Padhye S, Singh MW, Baruah JB. Structure- activity studies potential of thymoquinone analogs in pancreatic cancers. *Pharmaceutical Research*. 2010; 27 (6): 1146-1158.
- Bays H, Mandarino L, DeFronzo R. Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*. 2004; 89:463–78.
- Beletate V, El Dib RP, Atallah AN. Zinc supplementation for the prevention of type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Revue* . 2007(1) (CD005525).
- Benhaddou-Andaloussi A, Martineau L, Vuong T, Meddah B, Madiraju P, Settaf A, et al. The in vivo antidiabetic activity of *Nigella sativa* is mediated through activation of the AMPK pathway and increased muscle glut4 content. *Evid Based Complement Alternative Medicine*. 2011; 538671.
- Benhaddou-Andaloussi A, Martineau LC, Spoor D, Settaf A, Haddad PS. Antidiabetic activity of *Nigella sativa* seed extract in cultured pancreatic cells, skeletal muscle and adipocytes. *Pharm Biol*. 2008; 46: 96–104.
- Benhaddou-Andaloussi A, Martineau LC, Vallerand Y, Afshar A, Settaf A, Haddad PS. Multiple molecular targets underlie the antidiabetic effect of *Nigella sativa* seed extract in skeletal muscle, adipocyte and liver cells. *Diabetes Obesity and Metabolism*. 2010; 12: 148-157.
- Benkaci–Ali Farid, Aoumeur Baaliouamer, Brahim Y. Meklati Farid Chemat. Chemical composition of seed essential oils from Algerian *Nigella sativa* extracted by microwave and hydrodistillation. *Flavour and Fragrance Journal*. 2007; 22 (2):148–153

- Benkaci-Ali F, Baaliouamer A, Meklati BY. Kinetic study of microwave extraction of essential oil of *Nigella sativa* L. seeds. *Chromatographia*. 2006; 64: 227-231.
- Bennaghmouch L, Hajjaji , Gmira N. Flavonoides d'Ajuga iva (L) Schreb (Labiée). Actes de l'Institut d'Agronomie Vétérinaire (Maroc). 2002 ; 22 (1) : 25-30.
- Bergmeyer HU, Scheibe P, Wahlefeld AW. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clinical chemistry*. 1978; 24: 58-73.
- Bézanger-Beauquesne L, Pinkas M, Tork M. les plantes dans la thérapeutiques moderne. 2ème Edition Maloine S.A. Paris ; 1986.
- Bhandari MR, Nilubon Jong-Anurakkun, Gao Hong, Jun Kawabata. α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of Nepalese medicinal herb Pakhanbhed (*Bergenia ciliata*, Haw.) *Food Chemistry*. 2008;106: 247–252.
- Bhartham K, Bhartham N, Park HK, Lee KW. Binding mode analysis and pharmacophore model development for sulfonamide chalcone derivatives, a new class of α - glucosidase inhibitors. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 2008; 26:1202-1212.
- Bhavna Sharma, Chandrajeet Balomajumder, Partha Roy. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2008; 46:2376–2383
- Blicklé JF, Sapin R, Andréas E. Contribution of total and intact proinsulins to hyperinsulinism in subjects with obesity, impaired glucose tolerance or type 2 diabetes. *Diabetes and metabolism*. 2000;26 :274-280.
- Blicklé JF. Physiopathologie du diabète de type 2 :Quelles implications thérapeutiques ? *La Revue de Médecine Interne*. 2003; 24 : 709–710.
- Blumenthal M. The Complete German Commission E Monographs – Therapeutic Guide to Herbal Medicines. American Botanical Council, Austin, TX 1998.
- Blumer I. Clinical practice guidelines for the prevention and management of diabetes in Canada. *Canadian Diabetes Association: Executive summary* 2009: 1-15.
- Bogan JS, Hendon N, McKee AE, Tsao TS, Lodish HF. 2003. Functional cloning of TUG as a regulator of GLUT4 glucose transporter trafficking. *Nature*. 425:727-33.
- Böhme P, Chamagne L. Epidémiologie du diabète dans la zone Interreg III. Réseau trans frontalier du Diabète ORSAS Lorraine. 2006; 23 :8-9.
- Bonnier, G. La grande flore en couleur. *Ed Belin - Paris*. Tome1; 1990. pp: 17
- Boskabady MH, Keyhanmanesh R, Khameneh S, Doostdar Y, Khakzad MR. Potential immunomodulation effect of the extract of *Nigella sativa* on ovalbumin sensitized guinea pigs. *Journal of Zhejiang University Sciences B*. 2011; 12(3): 201-209.
- Boskabady MJ, Mohsenpoor N, Takaloo L. Antiasthmatic effect of *Nigella sativa* in airways of asthmatic patients. *Phytomedicine*. 2010; 17(10):707-713.
- Boskabady MH, Nassim Vahedi, Sediqa Amery, Mohammad Reza Khakzad. The effect of *Nigella sativa* alone, and in combination with dexamethasone, on tracheal muscle responsiveness and lung inflammation in sulfur mustard exposed guinea pigs. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011; 137(2): 1028-1034.
- Boudiaf, 2006 Boudiaf, K. Etude des effets anti-xanthine oxydoréductase et anti-radicalaires des extraits des graines de *Nigella sativa*. Thèse de magistère. Université Ferhat Abbas. (Sétif) Algérie. 2006.

- Boudiaf Kaouthar, Zahira Houcher, Widad Sobhi, Mustapha Benboubetra. Evaluation of Antioxidant and Anti-Xanthine Oxidoreductase Activities of *Nigella sativa* Linn seeds' extracts. Journal of Applied Biological Sciences. 2010; 4 (1): 007-016.
- Boudiba A, Mimouni-Zerguini S. Améliorer la prévention et les soins du diabète en Algérie. Diabetes voice. 2008 ; 53(2) :45- 48.
- Boulos PB, Faber RG, Whitfield PF, Parkin JV, Hobsley M. Relationship between insulin and histamine-stimulated gastric secretion before and after vagotomy. Gut.1983; 24: 549-556.
- Bourgou S, Pichette A, Marzouk B, Legault J. Bioactivities of black cumin essential oil and its main terpenes from Tunisia. South African Journal of Botany. 2010; 76, 210–216.
- Brown H, Sanger F, Kitai R. The structure of pig and sheep insulins. Biochemistry Journal. 1955; 60:556–65.
- Buysschaert M. Diabétologie clinique : 3^{ème} édition. De Boeck & Larcier Bruxelles. 2006 ; 15-79.
- Büyüköztürk S, Gelincik A, Özşeker F, Genç S, Şavran FO, Kıran B et al. *Nigella sativa* (black seed) oil does not affect the T-helper1 and T-helper 2 type cytokine production from splenic mononuclear cells in allergen sensitized mice. Journal of Ethnopharmacology. 2005; 100: 295-298.
- Caballero AE. Long –term benefits of insulin therapy and glycemic control in overweight and obese adults with type 2 diabetes. Journal of Diabetes and its Complications. 2009; 23: 143-152.
- Callet A. Administration orale d'insuline par double encapsulation : Développement du système nanoparticulaire par coacervation complexe complexe Insuline/Chitosane. Thèse de Doctorat. Université de Strasbourg. 2010.
- Calope J, Limat S, Frnandez C. pharmacie clinique et thérapeutique. 3^{ème} édition: Elsevier Masson. Paris 2008; 417-427.
- Campos MG, Martha Oropeza, Carlos Torres-Sosa, Manuel Jiménez-Estrad, Ricardo Reyes-Chilp. Sesquiterpenoids from antidiabetic *Psacalium decompositum* block ATP sensitive potassium channels. Journal of Ethnopharmacology. 2009;123: 489–493.
- Capeau J. Voies de signalisation de l'insuline: mécanismes affectés dans l'insulino-résistance. Medecine&Sciences. 2003; 19: 834-839.
- Carpentier JL. Insulin receptor internalization: molecular mechanisms and insulin resistance in mice. Journal of Clinical Investigation. 2009 ; 119:531-9.
- Cermak R, Landgraf, S., and Wolfram, S. (2004) Quercetin glucosides inhibit glucose uptake into brush-border-membrane vesicles of porcine jejunum. British journal of Nutrition. 2004; 91: 849–855.
- Chambers B, Camire M. Can cranberry supplementation benefit adults with type 2 diabetes? Diabetes Care. 2003; 26:2695–2696.
- Chandalia M, Carg A, Lutjohann D, Von Bergmann K, Grundy SM, Brinkley LJ. Beneficial effects of high dietary fiber intake in patients with type 2 diabetes mellitus. The New England Journal of Medicine. 2000; 342: 1392-1398.
- Chandra A, Mahdia AA, Ahmed S, Singh RK. Indian herbs result in hypoglycemic responses in streptozotocin –induced diabetic rats. Nutrition Research. 2007; 27: 161-168.

- Cheikh-Rouhou Salma, Souhail Besbes, Basma Hentati, Christophe Blecker, Claude Deroanne, Hamadi Attia *Nigella sativa* L.: Chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction. *Food Chemistry*.2007; 101(2):673-681.
- Cheikh-Rouhou S, Besbes S, Lognay G, Blecker C, Deroanne C, Attia H. Sterol composition of black cumin (*Nigella sativa* L.) and Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) seed oil. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2008; 21: 162-168.
- Chiu Woo C, Alan Prem Kumar, Gautam Sethi, Kwong Huat Benny Tan. Thymoquinone: Potential cure for inflammatory disorders and cancer. *Biochemical Pharmacology*. 2012; 83(4):443-451.
- Chop GA et Terry A. use of canonical variate analysis to differentiate onion cultivars by mineral content as measured by ICP-AES. *Food Chemistry*. 2009 ; 115 (3) : 1108–1113.
- Daba MH, Abdel-Rahman, MS. Hepatoprotective activity of thymoquinone in isolated rat hepatocytes. *Toxicology Letters*. 1998; 95: 23-29.
- Daisy P, Eliza J, Ignacimuthu S, Influence of *Costus speciosus* (Koen.)Sm. Rhizome extracts on biochemical parameters in STZ induced diabetic rats. *Journal of Health Sciences*. 2008; 54: 1–7
- De Smet PA. Herbal remedies. *New England Journal of Medicine*. 2002; 347(25): 2046-57.
- Defronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes : Metabolic and molecular implication for identifying diabetes genes. *Diabetes Research*. 1997; 5: 177–269.
- Devos P. Effets propres de l'insuline par rapport au contrôle glycémique. *Réanimation*. 2008; 2 : 8- 11.
- Diallo D, Rokia Sanogo, HamsétouYasambou, Aminata Traoré, Kassoum Coulibaly, Ababacar Maïga. Étude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam.(Rhamnaceae), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *Comptes Rendus en Chimie*. 2004; 7 : 1073–1080.
- Djerroumi A., et Nacef M. 100 plantes médicinales d'Algérie. Edition Palais du livre. Alger. 2004.
- Dogterom P. Development of a simple incubation system for metabolism studies with precision-cut liver slices. *Drug Metabolism and Disposition*.1993; 21: 699-704.
- Doumas BT, Perry BN, Sasse EA, Staumfjord JV Jr. Standardization in bilirubin assays: Evaluation of selected methods and stability of bilirubin solutions. *Clinical Chemistry*. 1973; 19: 984-993.
- Drouin P, Blicklé JF, Charbonel B, Eschxege E, Guillausseau PJ, Polouin PF, et al. Diagnostic et classification du diabète sucré : les nouveaux critères. *Diabetes & Metabolism*.1999 ; 25 :72-83.
- Duman H, Forte JG. What is the role of SNARE proteins in membrane fusion? *American Journal of Cell Physiology*. 2003; 285: C237–C249.
- Eddouks M, Lemhadri A, Michel JB. Caraway and caper: potential antihyperglycaemic plants in diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004; 94:143-148.
- Eddouks M, Ouahidi ML, Farid O, Moufid A, Khalidi A, Lemhadri A. L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc. *Phytothérapie*. 2007; 5: 194–203.

- Eddouks M, Maghrani M, Lemhadri A. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the southeast region of Morocco (Tafilalet). *Journal of Ethnopharmacology*. 2009; 82(2-3): 97-103.
- Eidi A, Eidi M, Darzi R. Anti-diabetic effect of *Olea europaea* L. in normal and diabetic rats. *Phytotherapy Research*. 2009; 23(3): 347-350.
- Eidi M, Eidi A, Zamanizadeh H. Effect of *Salvia officinalis* L. leaves on serum glucose and insulin in healthy and streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005; 100:310-3.
- Eidi E, Eidi M, Sokhteh M. Effect of fenugreek seeds (*Trigonella foenum-graecum* L.) on serum parameters in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutrition research*. 2007; 27: 728-733.
- Eidi M, Eidi E, Esmaeili. Antidiabetic effect of garlic (*Allium sativum* L.) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*. 2006; 13:(9-10) : 624-629.
- Eisenberg DM, Kessler RC, Foster C, et al. Unconventional medicine in the United States. *New England Journal of Medicine*. 1998; 328: 246-52
- El Gazzar M, El Mezayen R, Marecki JC, Nicolls MR, Canastar A, Dreskin SC. Anti-inflammatory effect of thymoquinone in a mouse model of allergic lung inflammation. *International Immunopharmacology*. 2006; 6: 1135-1142.
- El Tahir K, Mohammad A, Al-Harbi M. The respiratory effects of the volatile oil of the black seed (*Nigella sativa*) in guinea-pigs: Elucidation of the mechanism(s) of action. *General Pharmacology: The Vascular System*. 1993; 24 (5):1115-1122.
- El-Dakhakhny M, N.J Madi, N Lambert, HPT Ammon. *Nigella sativa* oil, nigellone and derived thymoquinone inhibit synthesis of 5-lipoxygenase products in polymorphonuclear leukocytes from rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002; 81 (2):161-164
- El-Hilaly J, Hmamouchi M, Lyoussi B. Ethnobotanical studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate provine (Northern Morocco). *Journal of Ethnopharmacology*. 2002 (a); 86: 149-58.
- El-Hilaly J, Lyous B. Hypoglycaemic effect of the lyophilized aqueous extract of *Ajuga reptans* in normal and streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2002 (b); 80: 109-113.
- Eliza J, Daisy P, Ignacimuthu S, Duraipandian V. Antidiabetic and antilipidemic effect of eremanthin from *Costus speciosus* (Koen.) Sm., in STZ-induced diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*. 2009; 182: 67-72
- El-Mahmoudy A, Shimizu Y, Shiina T, Matsuyama H, El-Sayed M, Takewaki T. Successful abrogation by thymoquinone against induction of diabetes mellitus with streptozotocin via nitric oxide inhibitory mechanism. *International Immunopharmacology*. 2005; 5: 195-207.
- El-Najjar N, Raimo A, Ketola, Teemu Nissilä, Timo Mauriala, Maxim Antopolsky. Impact of protein binding on the analytical detectability and anticancer activity of thymoquinone. *Journal of Chemical Biology*. 2011;4: 97-107.

- El-Saleh SC, Al-Sagair OA, Al-Khalaf MI. Thymoquinone and *Nigella sativa* oil protection against methionine-induced hyperhomocysteinemia in rats. *International journal of cardiology*. 2004; 93: 19-23.
- Elte JWF, Blicklé JF, Reprint of: Thiazolidinediones for the treatment of type 2 diabetes. *European Journal of Internal Medicine*. 2011, doi:10.1016/j.ejim.2011.08.002
- Ernst E . Plants with hypoglycaemic activity in humans. *Phytomedicine*. 1997; 4(1): 73-8
- Evdokimova E, Taper H, Buc Calderon P. Role of ATP and glycogen reserves in both paracetamol sulfation and glucuronidation by cultured precision-cut rat liver slices. *Toxicology in vitro*. 2001; 15: 683-690.
- Farah KM, Atoji Y, Shimizu Y, Takewaki T. Insulinotropic properties of *Nigella sativa* oil in streptozotocin-induced plus nicotinamide diabetic hamster. *Research in Veterinary Sciences*. 2002; 73:279-282.
- Farah KM, Shimizu Y, Shiina T, Nikami H, Ghanem MM, Takewaki T. Thymoquinone reduces hepatic glucose production in diabetic hamsters. *Research in Veterinary Sciences*. 2005; 79:219-223.
- Fararh KM , Atoji Y, Shimizu Y, Shiina T, H Nikami, T Takewaki. Mechanisms of the hypoglycaemic and immunopotentiating effects of *Nigella sativa* L. oil in streptozotocin-induced diabetic hamsters. *Research in Veterinary Science*. 2004; 77 (2):123-129.
- Favier F, Fianu A, Naty N, Le Moullec N, Papoz L. Essai de prévention primaire du diabète de type 2 et du syndrome métabolique à la Réunion : *Revue Médicale de l'Assurance Médicale*. 2005 ; 36 (1) : 5-13.
- Fehri B, Aiache JM, Memmi A. Hypotension, hypoglycémie et hypouricémie enregistrées à la suite d'administration répétée d'un extrait aqueux de feuilles d'*Olea europaea* L. *Journal de la Pharmacie Belge*. 1994 ;49(2): 101-8.
- Fred-Jaivesimi AA, Wilkins MR, Abo KA. Hypoglycaemic and amylase inhibitory activities of leaves of *Spondias mombin* Linn. *African Journal of Medical Sciences*. 2009; 38: 343-349.
- Geleijnse JM, EJ Giltay, DE Grobbee, ART Donders, FJ Kok Blood pressure response to fish oil supplementation: metaregression analysis of randomized trials. *Journal of hypertension*. 2002; 20 (8), 1493-1499
- Gelot P, C. Bara-Passot, E. Gimenez-Arnau, N. Beneton, H. Maillard, P. Celerier. Éruption bulleuse à l'huile de nigelle. *Annales de Dermatologie et de Vénéréologie*. 2012 ; 139 (4) :287-291.
- Gerber SH, Sudhof TC. Molecular determinants of regulated exocytosis. *Diabetes*. 2002; 51(suppl1):S3-S11.
- German M, Ashcroft S, Docherty K, Edlund H, Edlund T, Goodison S. The insulin gene promoter, a simplified nomenclature. *Diabetes*. 1995; 44:1002-4
- Gerozissis K. Brain insulin: regulation, mechanisms of action and functions. *Cell Mol Neurobiol*. 2000; 23:1-25.
- Ghedira K. L'olivier. *Phytothérapie*. 2008 ; 6: 83-89
- Ghedira K. La nigelle cultivée : *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae). *Phytothérapie*. 2006;4:1-7.

- Gilani AH, Aziz N, Khurram IM, Chaudhary KS, Iqbal A. Bronchodilator, spasmolytic and calcium antagonist activities of *Nigella sativa* seeds (Kalonji): a traditional herbal product with multiple medicinal uses. *Journal Pakistan Medical Association*. 2001; 51:115-120.
- Gimenez F, Brasier M, Calop J, Dine T, Tchiakpé L. *Pharmacie clinique et thérapeutique*. 2^{ème} édition, Masson Paris 2002 ; 387-395.
- Girard J, Halimi S , Virally M, Bliklé JF, Simone D, Guillausseau PJ. Type 2 diabetes mellitus: epidemiology, pathophysiology, unmet needs and therapeutical perspectives. *Diabetes & Metabolism*. 2007 ; 4 :231-244.
- Goetz P, Le Jeune R. *Galega officinalis*. *Phytothérapie*. 2008 ; 5:212-217.
- Goetz P. *Phytothérapie du diabète*. *Phytothérapie*. 2007; 5: 212–217
- Gonzalez M, Zarzuelo A, J omez M. Hypoglycemic activity of olive leaf. *Planta Medica*. 1992; 58: 513-5.
- Grace MH, RibnickyDM, Kuhn P, Poulev A, Logendra S, Yousef GG, et *al*. Hypoglycemic activity of a novel anthocyanin-rich formulation from lowbush blueberry, *Vaccinium angustifolium* Aiton. *Phytomedicine*. 2009; 16:406–415.
- Gras V, Bouffandeau B, Montravers P, Lalau DJ. Effect of metformin on survival rate in experimental sepsis. *Diabetes Metabolism*. 2006; 32 :147-150.
- Gray AM , Abdel-Wahab YH, Flatt PR, The traditional plant treatment, *Sabucus nigra* (Elder), exhibits insulin-like and insulin releasing actions in vitro . *Journal of Nutrition*. 2000; 130:15–20
- Grimaldi A, Jacqueminet S, Heurtier A, Bosquet F, Masse-Bœuf N, Halbron M, Sachon C. *Guide pratique du Diabète*. 3^{ème} édition Masson. Paris. 2005; 19-102.
- Grover JK, Yadav S, Vats V. Medicinal plants of India with anti-diabetic potentiel. *Journal of Ethnopharmacolgy*. 2002 ; 81: 81-100.
- Guignard JL. *Botanique systématique moléculaire*. 12^{ème} Edition Masson.Paris. P: 304.
- Haddad PS, Depot M, Settaf A, Cherrah Y (2001). Use of antidiabetic plants in Morocco and Quebec. *Diabetes Care*, 24: 608–609.
- Haddad PS. Multiple molecular targets underline the antidiabetic effect of *Nigella sativa* seed extract in skeletal muscle, adipocyte and liver cells. *Diabetes Obesity and Metabolism*. 2010; 12:148-157.
- Hajhashemi V, Ghannadi A., Jafarabadi H. Black cumin seed essential oil, as a potent analgesic and anti-inflammatory drug. *Phytotherapy Research*. 2004; 18: 195-199.
- Halimi S (a). Le diabète de type 2 ou diabète non insulino-dépendant (DNID) : *Corpus Médical*. Faculté de Médecine de Grenoble. 2005 ; 223 : 2-12.
- Halimi S (b). Les glitazones : *Revue de Médecine Interne*. 2005 ; 26 : 54-57.
- Halimi S, Debaty I, Vellaret L. Muller M. Les nouveaux traitements du diabète de type 2 : *La Revue de la Médecine Interne* 2008 ; 29 : 881-890.
- Halimi S, Grimaldi A, Gerson M, Rostoker G, Altman JJ, Attali C, et *al*. Traitement médicamenteux du Diabète de type 2. Recommandations professionnelles AFSSAPS et HAS. 2006 ; 1-45.

- Halimi S. Metformin: 50 years old, fit as a fiddle, and indispensable for its pivotal role in type 2 diabetes management. *Diabetes Metabolism*. 2006;32:555–6.
- Hamden Khaled, Henda Keskes, Sahla Belhaj, Kais Mnafigui, Abdelfattah feki, Nouredine Allouche. Inhibitory potential of omega-3 fatty and fenugreek essential oil on key enzymes of carbohydrate-digestion and hypertension in diabetes rats. *Lipids in Health and Disease*. 2011; 10:226-230.
- Harzallah H, Kouidhi B, Flamini G, Bakhrouf A, Mahjoub T. Chemical composition, antimicrobial potential against cariogenic bacteria and cytotoxic activity of Tunisian *Nigella sativa* essential oil and thymoquinone. *Food Chemistry*, 2011; 129(4):1469-1474.
- Hausamen TU, Helger R, Rick W, Gross W. Optimal conditions for the determination of serum alkaline phosphatase by a new kinetic method. *Clinica Chimica Acta*. 1967;15:241-245.
- Heiss A, Matthias Kropf, Susanne Sontag, Anton Weber. Seed morphology of *Nigella S.L.* (ranunculaceae): Identification, diagnostic traits, and their potential phylogenetic relevance. *International Journal of Plant Sciences*. 2011; 172(2):267–284.
- Hennen G. *Endocrinologie* : Edition de Boeck Université. 2001 ; 94-95.
- Henri M. Obésité et insulino-résistance :Etude longitudinale avec un traceur du transport du glucose, le [¹²⁵I]-6-déoxy-6-iodo-D-glucose. Thèse doctorat. Université de Grenoble.2011.
- Hosseinzadeh H, Parvardeh S. Anticonvulsant effects of thymoquinone, the major constituent of *Nigella sativa* seeds, in mice. *Phytomedicine*. 2004; 11:56-64.
- Houcher Z, Boudiaf K, Benboubetra M, Houcher B. Effects of methanolic extract and commercial oil of *Nigella sativa* L. on blood glucose and antioxidant capacity in alloxan-induced diabetic rats. *Pteridines*. 2007, 18: 8-18.
- Houghton PJ, Zarka R, de las Heras B, Hoult JR. Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Medica*.1995; 61: 33-36.
- Jendrassik L, Gróf P. Simplified photometric methods for the determination of the blood bilirubin. *Biochem Z* .1938; 297:81-89.
- Jensen M, De Meyts P. Molecular mechanisms of differential intracellular signaling from the insulin receptor. *Vitamins & Hormones*. 2009; 80:51-75.
- Johnston K, Sharp P, Clifford M, Morgan L. Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Letters*. 2005; 579: 1653–1657.
- Jouad H, Maghrani M, Eddouks M. Hypoglycaemic effect of *Rubus fruticosus* L. and *Globularia alypum* L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002; 81: 351-356.
- Kaleem M, Kirmani D, Asif M, Ahmed Q, Bano B. Biochemical effect of *Nigella sativa* L. seeds in diabetic rats. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2006; 44:745-748.
- Kanter M, Akpolat M, Aktas C. Protective effects of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds on beta-cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats: a light and electron microscopic study. *Journal of Molecular Histology*. 2009; 40: 379-385.

- Kanter M, Coskun O, Budancamanak M. Hepatoprotective effects of *Nigella sativa* L and *Urtica dioica* L on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and liver enzymes in carbon tetrachloride-treated rats. *World Journal of Gastroenterology*. 2005; 11: 6684-6688.
- Kanter M, Coskun O, Korkmaz A, Oter S. Effects of *Nigella sativa* on oxidative stress and β -cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2004; 279: 685-691.
- Kanter M, Meral I, Dede S, Gunduz H, Cemek M, Ozbek H, Uygan I. Effects of *Nigella sativa* L. and *Urtica dioica* L. on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and some liver enzymes in CCl₄-treated rats. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*. 2003;50:264-268.
- Kanter M, Meral I, Yener Z, Ozbek H, Demir H. Partial regeneration / proliferation of the β -cells in the islets of langerhans by *Nigella sativa* L. in streptozotocin-induced diabetics rats. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 2003; 201: 213-219.
- Kanter M, Sen S, Donmez S, Aktas C, Ustundag S, Erboga M. Protective effects of irbesartan and alpha lipoic acid in STZ-induced diabetic nephropathy in rats. *Renal Failure*. 2010; 32:498-505.
- Kanter M. Effect of *Nigella sativa* and its major constituent, thymoquinone on sciatic nerves in experimental diabetic neuropathy. *Neurochemistry Research*. 2008; 33(1):87-96.
- Kanter M. *Nigella sativa* and derived thymoquinone prevents hippocampal neurodegeneration after chronic toluene exposure in rats. *Neurochemistry Research*. 2007; 33: 579-588.
- Kanter M. Protective effect of quercetin on liver induced biliary obstruction in rats. *Journal of Molecular Histology*. 2010, 42: 39-46.
- Kanter M. Protective Effects of *Nigella sativa* on the Neuronal Injury in Frontal Cortex and Brain Stem After Chronic Toluene Exposure. *Neurochemical Research*. 2008; 33 (11): 2241-2249.
- Kendall DM. Thiazolidinediones. The case for early use. *Diabetes Care*. 2006; 29: 154–157.
- Keyhanmanesh R, Boskabady MH, Eslamizadeh MJ, Khamneh S, Ebrahimi MA. The effect of thymoquinone, the main constituent of *Nigella sativa* on tracheal responsiveness and white blood cell count in lung lavage of sensitized guinea pigs. *Planta Medica*. 2009; 76:218-22.
- Khader M, Bergsen N, Eckel PM. In vitro toxicological proprieties of thymoquinone. *Food Chemistry and toxicology*. 2009; 47 (1): 129-133.
- Khader M, Bresgen N, Eckl PM. In vitro toxicological properties of thymoquinone. *Food Chemistry Toxicology*. 2009;47:129-133.
- Khader M, Eckl PM, Bresgen N. Effects of aqueous extracts of medicinal plants on MNNG-treated rat hepatocytes in primary cultures. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007; 112: 199-202.
- Khader M, N. Bresgen, P.M. Eckl. Antimutagenic effects of ethanolic extracts from selected Palestinian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010; 127(2): 319-324.
- Khan N, Sharma S, Sultana S. *Nigella sativa* (black cumin) ameliorates potassium bromated-induced early events of carcinogenesis: diminution of oxidative stress. *Human and Experimental Toxicology*. 2003; 22 (4): 193-203.

- Kim SH, Hyun SH, Choung SY. Antidiabetic effect of cinnamon extract on blood glucose in db/db mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006; 104: 119–123.
- Klip A, Tsakiridis T, Marette A, Ortiz PA, 1994. Regulation of expression of glucose transporters by glucose: a review of studies in vivo and cell cultures. *FASEB Journal*. 1994; 8: 43–53.
- Kobayashi, Y., Suzuki, M., Satsu, H., Arai, S., Hara, Y., Suzuki, K., Miyamoto, Y., and Shimizu, M. Green tea polyphenols inhibit the sodium-dependent glucose transporter of intestinal epithelial cells by a competitive mechanism. *Journal of Agrical Food Chemistry*. 2000; 48, 5618–5623.
- Kojima, H., M. Fujimiya, T. Terashima, H. Kimura, and L. Chan. Extrapancratic proinsulin/insulin-expressing cells in diabetes mellitus: is history repeating itself? *Endocrinological Journal*. 2006; 53:715-22.
- Kökdil Gamze, Hüseyin Yılmaz. Analysis of the fixed oils of the genus *Nigella* L. (Ranunculaceae) in Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2005; 33 (12):1203-1209.
- Krumdieck CL, Dos Santos JE, Ho KJ. A new instrument for the rapid prepration of tissue slices. *Analytical Biochemistry*. 1980, 104: 118-123.
- Kumari K, Augusti KT. Lipid lowering effect of S-methyl cysteine sulfoxide from *Allium cepa* Linn in high cholesterol diet fed rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007; 109: (3): 367-371.
- Kwon K, Peter Eck, Shenglin Chen, Christopher P. Corpe, Je-Hyuk Lee, Michael Kruhlak , Mark Levine. Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. *The FASEB Journal*. 2007; 21: 366-377.
- Lamhadri A., N.-A. Zeggwagh , M. Maghrani , H. Jouad, M. Eddouks. Antihyperglycaemic effect of the aqueous extract of *Origanum vulgare* growing wild in Tafilalet region. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004; 92: 251-256
- Laviolle B. Les hypoglycémisants oraux. Service de pharmacologie, Centre d’investigation clinique, L’INSERM. 2008 ; 203 : 1-7.
- Le PM, Benhaddou-Andaloussi A, Elimadi A, Settati A, Cherrah Y, Haddad PS. The petroleum ether extract of *Nigella sativa* exerts lipid-lowering and insulin –sensitizing actions in the rat. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004;94:251-259.
- Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An Antidiabetic Thiazolidinedione Is a High Affinity Ligand for Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ). *The Journal of Biological Chemistry*. 1995; 270 :12953-12956.
- Lemhadri A, NA. Zeggwagh, M. Maghrani, H. Jouad, M. Eddouks. Antihyperglycaemic activity of the aqueous extract of *Origanum vulgare* growing wild in Tafilalet region. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004; 92: 251–256.
- Lev EI, Solodky A, Harel N : Treatment of Aspirin-Resistant Patients with Omega-3 Fatty Acids versus Aspirin Dose Escalation. *Journal of Vascular Surgery*. 2010; 52 (2) : 520-526.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 1951; 193: 265–275.

- Lupidi G, Scire A, Camaioni E, Khalife KH, De Sanctis G, Tanfani F, Damiani E. Thymoquinone, a potential therapeutic agent of *Nigella sativa*, binds to site I of human serum albumin. *Phytomedicine*. 2010; 17(10): 714-720.
- Maeda N. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ ACRP30. *Natural Medicine*. 2002; 8: 731–737.
- Maggs DG, Buchanan TA, Burant F. Metabolic effects of troglitazone monotherapy in type 2 diabetes mellitus. A randomized, double-blind, placebocontrolled trial. *Annals of Internal Medicine*. 1998; 128 :176–185.
- Magnan C, Ktorza A. Production and secretion of insulin by the pancreatic β -cell. *EMC-Endocrinologie*. 2005; 2: 241-264.
- Mahfouz M, Abdel-Maguid R, El-Dakhakhny M. The effectsof “Nigellone-Therapy” on the histaminopexic power of the blood sera of asthmatic patients. *Arzneimittel-Forsch. Drug Research*. 1965; 15: 1230–31.
- Mahmoud M R, El-Abhar HS, Saleh S. The effect of *Nigella sativa* oil against the liver damage induced by *Schistosoma mansoni* infection in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002;79:1-11.
- Maity S, Kar A, Banerjee S, Chakraborty A, Santra SC .Effects of gamma irradiation on long-storage seeds of *Oryza sativa* (cv. 2233) and their surface infecting fungal diversity. *Radiation Physics and Chemistry*. 2009; 78(11): 1006-1010.
- Majdalawieh AF, Hmaidan R, Carr R. *Nigella sativa* modulates splenocyte proliferation, Th1/Th2 cytokine profile, macrophage function and NK anti-tumor activity . *Journal of Ethnopharmacology*. 2010; 131(2): 268-275.
- Mariod AA, Ibrahim RM, Ismail M, Ismail N. Antioxidant activity and phenolic content of phenolic rich fractions obtained from black cumin (*Nigella sativa*) seedcake. *Food Chemistry*. 2009; 116(1):306-312.
- Marles RJ, Farnsworth NR. Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine*. 1995; 2: 13-189.
- Maroo J, Vasu VT, Gupta S. Dose dependent hypoglycemic effect of aqueous extract of *Enicostemma littorale* Blume in alloxan induced diabetic rats. *Phytomedicine*. 2003; 10: 196-199.
- Martineau LC, Couture A, Spoor D, Benhaddou-Andaloussi A, Harris C, Meddah B, *et al*. Anti-diabetic properties of the Canadian lowbush blueberry *Vaccinium angustifolium*. *Phytomedicine*. 2006; 13, 612–623.
- Masiello P, Broca C, Gross R, Roye M, Manteghetti M, Hillaire-Buys D, Novelli M, Ribes G. 1998. Experimental NIDDM, development of a new model in adult rats administered streptosotocin and nicotinamide. *Diabetes*; 47: 224-229
- Massin N, Galery J, Basille C, Théron-Girard L, Bry-Gauillard H,Cédrin-Durnerin I, Hugues JN. Thérapeutiques: Faut-il traiter par métformine les femmes infertiles présentant un syndrome des ovaires polykystiques ? *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*. 2003; 31 : 265-274.
- Meddah B, Ducroc R, Faouzi MEA, Eto B, Mahraoui L, Benhaddou- Andaloussi A, Martineau LC, Cherrah Y, Haddad PS. *Nigella sativa* inhibits intestinal glucose absorption and improves glucose tolerance in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009; 121:419-424.

- Meral I, Yener Z, Kahraman T, Mert N. Effect of *Nigella sativa* on glucose concentration, lipid peroxidation, anti-oxidant defence system and liver damage in experimentally-induced diabetic rabbits. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2001;48: 593-599.
- Miyazaki Y, Mahankali A, Matsuda M, Mahankali S, Hardies J, Cusi K. Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*. 2002; 87: 2784–91.
- Moussard C. Biologie moléculaire, biochimie des aliment et communication cellulaire. Edition De Boeck Université. Bruxelles. 2005 : 195-214.
- Mozaffarian D, Marfisi RM, Levantesi G , Silletta MG, Tavazzi L, Tognoni G, et *al*. Incidence of new-onset diabetes and impaired fasting glucose in patients with recent myocardial infarction and the effect of clinical and lifestyle risk factors. *The Lancet*. 2007; 370(9588):667-675.
- Mukherjee PK. Plant products with hypocholesterolemic potentials. Edition *Advances in Food and Nutrition Research*. Elsevier Academic Press, USA. 2000: 323–324.
- Muniyappa R, Chen H, R. Muzumdar, Einstein FH, Yan X, Yue LQ, Barzilai N, Quon NJ. Comparison between Surrogate Indexes of Insulin Sensitivity/Resistance and Hyperinsulinemic Euglycemic Clamp Estimates in Rats. *American Journal of Physiology and Endocrinology and Metabolism*. 2009; 297: E1023–E1029
- Nickavar B, Mojab F, Javidnia K, Amoli M. Chemical composition of the fixed and volatile oils of *Nigella sativa* L. from Iran. *Natureforsch*. 2003. 58:629–631.
- Nigon F, Serfaty-Lacrosnière C, Chauvois D, Phytostérols (Les). Une nouvelle approche diététique de l'hypercholestérolémie. *Sang Thrombose Vaisseaux*. 2000; 12 (8): 483-90.
- Nikakhlagh Soheila, Fakher Rahim, Faezeh Hossein Nejad Aryani, Amir Syahpoush, Mehri Ghafouryan Brougerdnya, Nader Saki Herbal treatment of allergic rhinitis: the use of *Nigella sativa*. *American Journal of Otolaryngology*. 2011; 32(5):402-407
- Ohkuwa Tetsuo, Yuzo Sato, Makoto Naoi. Hydroxyl radical formation in diabetic rats induced by streptozotocin. *Life Sciences*. 1995; 56 (21):1789-1798
- OMS. Rapport de l'atelier interrégional de l'OMS sur l'utilisation de la médecine traditionnelle dans les soins de santé primaires : Oulan-Bator, Mongolie ; 23-26 août 2007; pp 94.
- OMS. Stratégie de l'OMS pour la Médecine Traditionnelle pour 2002–2005, pp 78
- Otoom SA, Al-Safi SA, Kerel ZK, Alkofahi A. The use of medicinal herbs by diabetic Jordanian patients. *Journal of Herbal Pharmacotherapy*. 2006, 6: 31-41.
- Pan Y, Baochang Cai, Kelin Wang , SuminWang ,Shuyuan Zhou, Xiaochun Yu , Bin Xu , Long Chend. Neferine enhances insulin sensitivity in insulin resistant rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009 ; 124 : 98–102.
- Pari L, Sankaranarayanan C. Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Life Sciences*. 2009; 85: 830-834.
- Perlemuter L, Collin de l'Hortet G, Sélam, JL. Diabète et maladies métaboliques. 3^{ème} édition Masson. Paris. 2000; 149-180.
- Pfeifer MA, Halter JB, Porte JD. Insulin secretion in diabetes mellitus. *Diabetes*. 1981 ; 35 : 123-130.

- Philippe Brandle M, Carrel J, Diem P, Keller U, Kuntschen F, Ruiz J, Stahl M, Weissenberger B, Spinas GA. Recommandations sur le traitement du diabète de type 2 : Déclaration de consensus de la société suisse d'endocrinologie-diabétologie. Forum Médical Suisse. 2009; 3(9) : 50-55.
- Piras A, Rosab A, Marongiua B, Porcedda S, Falconieric D, Dessib MA, Ozcelikd B, Kocae U. Chemical composition and in vitro bioactivity of the volatile and fixed oils of *Nigella sativa* L. extracted by supercritical carbon dioxide. Industrial Crops and Products. 2013; 46: 317– 323
- Portha B. Signalisation intracellulaire et exocytose de l'insuline. MTE 2000; 2: 37–46.
- Prasath GS, Subramanian SP. Modulatory effects of fisetin, a bioflavonoid, on hyperglycemia by attenuating the key enzymes of carbohydrate metabolism in hepatic and renal tissues in streptozotocin- induced diabetic rats. European Journal of Pharmacology. 2011; 663 (3): 492-496.
- Proud CG. Regulation of protein synthesis by insulin. Biochemistry Society of Trans. 2006; 34:213-6.
- Racah D. Épidémiologie et physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré. EMC-Endocrinologie. 2004; 1(1): 29–42.
- Rains JL, Jain SK. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. Free Radical and Biological Medicine. 2011; 50:567-75.
- Raith D et Zick Y. Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. Diabetes Care. 2001; 24: 588-597.
- Ramadan MF, Mörsel JT. Characterization of phospholipid composition of black cumin (*Nigella sativa* L.) seed oil. Nahrung/Food. 2002a; 46:240-244.
- Ramadan MF, Mörsel JT. Neutral lipid classes of black cumin (*Nigella sativa* L.) seed oils. European food research and technology. 2002 (b); 214:202-206.
- Ramadan MF, Mörsel JT. Analysis of glycolipids from black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.) and niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) oilseeds. Food Chemistry. 2003; 80(2):197-204
- Ramadan MF, Mörsel JT. Direct isocratic normal-phase HPLC assay for fat soluble vitamins and β -carotene in oil seeds. European food research and technology. 2002 (c). 214: 521-527.
- Ramadan MF, Asker MMS, Tadros A. Antiradical and antimicrobial properties of cold-pressed black cumin and cumin oils. European Food Research and Technology. 2012; 234: 833–844.
- Rangachari Balamurugan, Veeramuthu Duraipandiyar, Savarimuthu Ignacimuthu. Antidiabetic activity of γ -sitosterol isolated from *Lippia nodiflora* L. in streptozotocin induced diabetic rats. European journal of pharmacology. 2011; 30:410-418
- Rates SMK. Plants as source of drugs. Toxicon. 2001; 39: 603-13
- Raverot G. Diabète sucré de types 1 et 2 de l'enfant et de l'adulte: Edition La Collection Hippocrate. 2005 ; 11-233.
- Rchid H, Chevassus H, Nmila R, Guiral C, Petit P, Chokaïri M, Sauvair Y. *Nigella sativa* seed extracts enhance glucose-induced insulin release from rat-isolated Langerhans islets. Fund Clinical Pharmacology. 2004;18:525-529.

- Rodier M. Définition et classification du diabète. Médecine nucléaire imagerie fonctionnelle et métabolique. Edition Centre Hospitalier Universitaire-Nîmes. 2001 ; 25(2): 91-93.
- Rogozhin Eugene A. , Yulia I. Oshchepkova, Tatyiana I. Odintsova, Natalia V. Khadeeva, Olga N. Veshkurova, Tsezi A. Egorov, Eugene V. Grishin, Shavkat I. Salikhov Novel antifungal defensins from *Nigella sativa* L. seeds *Plant Physiology and Biochemistry*. 2011; 49(2):131-137.
- Saleem U, Ahmad B, Rehman K, Mahmood S, Alam M, Erum A. Nephro-protective effect of vitamin C and *Nigella sativa* oil on gentamicin associated nephrotoxicity in rabbits. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012; 25(4): 727-730.
- Saleh Y, Mudaliar SR, Henry RR. Metabolic and vascular effects of the thiazolidinedione troglitazone. *Diabetes Review*. 1999; 7: 55–76.
- Salem ML. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *International Immunopharmacology*. 2005; 5 (13–14):1749-1770.
- Salemi O. Pratiques alimentaires des diabétiques: Etudes de quelques cas à Oran (Algérie). *Economie rurale*. 2010; 4 :80-95.
- Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001; 414: 799-806.
- Sanclemente T, Marques-Lopes I, Fajó-Pascual M, Cofán M, Jarauta E, Ros E, Puzo J, García-Otín AL. A moderate intake of phytosterols from habitual diet affects cholesterol metabolism. *Journal of physiology and biochemistry*. 2009; 65(4):397-404
- Sateesh Belemkar, Kalpesh Dhameliya, Muslim K. Pata .Comparative study of garlic species (*Allium sativum* and *Alliumporrum*) on glucose uptake in diabetic rats. *Journal of Taibah University Medical Sciences*. 2013; 8: (2): 80-85.
- Satoa H, Genet C, Strehle A, et al. (2007) Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea*. *Biochemistry and Biophysic Research Communication*. 2007; 362(3, 4): 793-8
- Schäfer A, Högger P. Oligomeric procyanidins of French maritime pine bark extract (Pycnogenol) effectively inhibit α - glucosidase. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2007; 77: 41-46.
- Sharma B, G. Viswanath, Rajani Salunke, Partha Roy Effects of flavonoid-rich extract from seeds of *Eugenia jambolana* (L.) on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic mice. *Food Chemistry*. 2008; 110(3) 697-705.
- Shetty A, Paramahans V. Salimath. Reno-protective effects of fenugreek (*Trigonella foenum greacum*) during experimental diabetes. *e-SPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism*. 2009 ;4: e137–e142
- Shih CC, Cheng-Hsiu Lin, Wei-Li Lin, Jin-BinWu. *Momordica charantia* extract on insulin resistance and the skeletal muscle GLUT4 protein in fructose-fed rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2009; 123: 82–90.
- Shobana S, Sreerama YN, Malleshi NG. Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet (*Eleusine coracana* L.)seed coat phenolics: Mode of inhibition of α -glucosidase and pancreatic amylase. *Food Chemistry*. 2009; 115: 1268–1273.
- Sigal R, Malcolm J, Arnaout A. Prevention of cardiovascular events in diabetes. *Clinical Evidence*. 2006; 15: 623-645.

- Simonis-Bik AM, Eekhoff EM, Moor MH, Kramer M, Boosmsma D, Heine RJ. Gene variants in the novel type 2 diabetes loci CDC123/CAMK1D, THADA, ADAMTS9, BCL11A, and MTNR1B affect different aspects of pancreatic beta-cell function. *Diabetes*. 2010; 59: 293-301.
- Singh J, Kakkar P. Antihyperglycemic and antioxidant effect of *Berberis aristata* root extract and its role in regulating carbohydrate metabolism in diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009; 123: 22–26.
- Song J, Kwon O, Chen S, Daruwala R, Eck P, Park JB, Levine M. Flavonoid inhibition of sodium-dependent vitamin C transporter 1 (SVCT1) and glucose transporter isoform 2 (GLUT2), intestinal transporters for vitamin C and glucose. *Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277: 15252–15260.
- Steiner DF, Chan SJ, Welsh JM, Kwok SC. Structure and evolution of the insulin gene. *Annual Review of Genetic*. 1985; 19: 463–84.
- Stuart CA, Howell ME, Zhang Y, Yin D. Insulin-stimulated translocation of glucose transporter (GLUT) 12 parallels that of GLUT4 in normal muscle. *Journal of clinical Endocrinology and Metabolism*. 2009; 94:3535-42.
- Suckale J, Solimena M. The insulin secretory granule as a signaling hub. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2010; 21:599-609.
- Suzuki GO, Chikage Nishiuchi, Asami Tsuru, Eri Kako, Jian Li, Maki Yamamoto, Yasuhiko Mukai Cellular localization of mitotic RAD21 with repetitive amino acid motifs in *Allium cepa*. *Gene*. 2013;514 (2):75-81.
- Swamy SM, Tan BK. Cytotoxic and immunopotentiating effects of ethanolic extract of *Nigella sativa* L. seeds. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000, 70: 1-7.
- Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in b-cells of the rat pancreas. *Physiology Research*. 2001; 50: 536–46.
- Taleb –Snouci D, Ghomaira H, Kroufa D, Bouderbala S, Prost J, DuBois C, Bouchnaka M. Antioxidant effect of *Ajuga iva* aqueous extract in streptozotocin induced diabetic rats. *Phytomedicine*. 2009; 16: 623-631.
- Tan MH. How pioglitazone affects glucose and lipid metabolism. *Experimental Clinical and Endocrinological Diabetes*. 2000;108(suppl 2):S224–33
- Tayman C, Cekmez F, Kafa IM, Canpolat FE, Cetinkaya M, Tonbul A. Protective effects of *Nigella sativa* oil in hyperoxia-induced lung injury. *Arch Bronconeumology*. 2012; 49(1):15-21.
- Tenekoon KH, Jeevathayaparan S, Kurukulasooriya AP, Karunanayake EH: Possible hepatotoxicity of *Nigella sativa* seeds and *Dregea volubilis* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*. 1991 ;31: 283–9, 1991
- Thomas DE, Elliot EJ, Naughton GA. Exercise for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2006; 3:CD002968
- Tian Z, Y-M Liu, S-B Chen, J-S Yang, P-G Xiao, L Wang, E Wu. Cytotoxicity of two triterpenoids from *Nigella glandulifera*. *Molecules*. 2006; 11:693–699.
- Tuter M, Aksoy HA, Ustun G, Riva S, Secundo F, Ipekler S. Partial purification of *Nigella sativa* L. seed lipase and its application in hydrolytic reactions. enrichment of γ -linolenic acid from borage oil. *Journal of the American Oil Chemist's Society* 2003; 80: 237-241.

- Ulu R, Dogukan A, Tuzcu M, Gencoglu H, Ulas M, Ilhan N. Regulation of renal organic anion and cation transporters by thymoquinone in cisplatin induced kidney injury. *Food Chemistry and Toxicology*. 2012; 50(5): 1675-1679.
- United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS Group). Intensive blood glucose control with sulfonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998 ; 352 : 837-853.
- Üstün G, Kent L, Çekın N, Cıvelekoğlu H. Investigation of the technological properties of *Nigella sativa* (black cumin) seed oil. *Journal of American Oil Chemists' Society*. 1990; 67: 958–960.
- Vickers AE, Fisher RL. Organ slices for the evaluation of human drug toxicity. *Chemico-Biological Interactions* 2004; 150: 87-96.
- Vincent D, Bayrou O, Chaprelon AC, Terlaud C. Diabète non insulino-dépendant (DNID, diabète de type 2). *Le Vademecum Thérapeutique : la conduite pratique du traitement*. Edition Masson. Paris. 2001: 215-223.
- Von Schacky Clemens. A review of omega-3 ethyl esters for cardiovascular prevention and treatment of increased blood triglyceride levels. *Vascular Health and Risk Management*. 2006; 2(3):251–262.
- Wang Z, Day N, Trifillis P, Kiledjian M. An mRNA stability complex functions with poly (A)-binding protein to stabilize mRNA in vitro. *Molecular and Cellular Biology*. 1999; 19: 4552–4560.
- Webster Keith A, Howard Prentice, Nanette H. Bishopric: Oxidation of Zinc Finger Transcription Factors: Physiological Consequences. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2001; 3(4): 535-548.
- Weng J, Li Y, Wu W. Effect of intensive insuline therapy on β -cell fonction and glycaemic control in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: a multicentre randomized parallel-group trial. *Lancet*. 2008 ; 371 :1753-1760.
- Wens J, Sunaert P, Nobels F, Feyen L, Crombruggen P-V, Bastiaens H, Royen P-V. Diabète de type II : Recommandation de bonnes pratiques. 2007 ; 02 : 7-10.
- White MF. IRS and the common path to diabetes. *American Journal of Physiology and Endocrinology and Metabolism*. 2002; 283: 413-422.
- WHO Traditional Medicine Strategy 2002-2005, Document WHO/EDM/TRM/2002.1, WHO, Geneva. 2002; p. 24.
- Ye CL, De-Hui Dai, Wei-Lian Hu. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil from onion (*Allium cepa* L.). *Food Control*. 2013; 30: (1): 48-53.
- Yeh GY, Eisenberg DM, Kaptchuk TJ, Phillips RS. Systematic review of herbs and dietary supplements for glycemic control in diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26: 1277–1294.
- Yildiz F, Coban S, Terzi A, Savas M, Bitiren M, Celik H. Protective effects of *Nigella sativa* against ischemia-reperfusion injury of kidneys. *Renal Failure*. 2010; 32(1): 126-131.
- Youngren JF. Regulation of insulin receptor function. *Cell Molecular and Life Science*. 2007; 64:873-91.

- Zaoui A, Cherrah Y, Alaoui K, Mahassine N, Amarouch H, Hassar M. Effects of *Nigella sativa* fixed oil on blood homeostasis in rat. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000; 79:23-26.
- Zaoui A, Cherrah Y, Mahassini N, Alaoui K, Amarouch H, Hassar M. Acute and chronic toxicity of *Nigella sativa* fixed oil. *Phytomedicine*. 2000; 91: 69-74.
- Zhi-Hong Yang, Hiroko Miyahara, Akimasa Hatanaka. Chronic administration of palmitoleic acid reduces insulin resistance and hepatic lipid accumulation in KK-A^yMice with genetic type 2 diabetes. *Lipids in Health and Disease*. 2011; 10: 120-125.

Pteridines

Vol. 22, 2011, pp. 97 - 104

Hepatotoxicity and Langerhans Islets Regenerative Effects of Polar and Neutral Lipids of *Nigella sativa* L. in Nicotinamide/streptozotocin-Induced Diabetic Rats

Sobhi Widad^{1,2}, Khettal Bachra², Belmouhoub Messaoud², Atmani Djebbar³, Duez Pierre⁴, Benboubetra Mustapha¹

¹Laboratory of Applied Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Setif, Algeria, ²Laboratory of Vegetal Biotechnology and Ethnobotany, Faculty of Life and Nature Sciences, University of Bejaia, Algeria, ³Laboratory of Applied Biochemistry, Faculty of Life and Nature Sciences, University of Bejaia, Algeria, ⁴Laboratory of Pharmacognosy, Bromatology and Human Nutrition, Faculty of Pharmacy, Université Libre de Bruxelles (ULB), Belgium.

Date received: 2011/08/10

Abstract

The extracted oil from *Nigella sativa* seeds is reported to be effective against various diseases and chemically-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. The effect of oral administration of *Nigella sativa* total, polar and neutral oils was investigated on hepatoprotective status in streptozotocin/nicotinamide (STZ-N)-induced diabetic rats. The toxicity was assessed biochemically by monitoring aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), gamma-glutamyl transpeptidase (γ -GT) and alkaline phosphatase (AP) activities as well as bilirubin titre and histologically under light microscope. The study was also undertaken to evaluate the effect of oil fractions on the regeneration of pancreatic Langerhans islets in treated diabetic rats.

Biochemical analysis showed that lipid fractions from total oil of *Nigella sativa* seeds are not hepatotoxic. However, histological study of the liver demonstrated major and minor tissue damages with the neutral fraction exhibiting the most protective effect. At the end of the experiment period (17 days) of treatment with thymoquinone (25mg/kg bw/day) or neutral lipid fraction (100mg/kg bw/day), a positive effect on the regenerative of Langerhans islets, initially distorted by STZ, was observed. Thus, the hypoglycaemic effect of neutral lipid fraction could be a result of the regeneration of the pancreatic Langerhans islets.

Key words: *Nigella sativa* seeds, polar and neutral lipids, diabetes, streptozotocin, hepatotoxicity, regenerative effect on Langerhans islets.

Introduction

The hypoglycaemic effect of the seeds and oil of *Nigella sativa* Linn, family *Ranunculaceae*, an annual medicinal plant widely used in traditional medicine all over the world, is well documented. Different studies indicate that various extracts from the seeds and its major phenolic compound, thymoquinone, exhibit an anti-diabetic activity by either decreasing the levels of both blood glucose and lipids or increasing the release of insulin (1-3) or by the inhibitory effect on intestinal glucose absorption (4,5).

Beside the well established strong antioxidant properties, the oil of *Nigella sativa* seeds was effective against various diseases and chemically-induced hepa-

totoxicity and nephrotoxicity (6). The protective effect of the oil of *Nigella sativa* seeds and thymoquinone on liver and Langerhans islets was described in many studies (7,8). In fact, it was reported that *Nigella sativa* seeds uptake decreases lipid peroxidation, increases the antioxidant defence system and also prevents the lipid-peroxidation-induced liver damage in experimentally induced diabetic rabbits (9).

Volatile oil of *Nigella sativa* seeds reduces the level of glucose in streptozotocin/nicotinamide (STZ-N)-induced diabetic hamster and increases the rate of insulin production (10). Few years later, it has been reported that thymoquinone reduces the level of blood glucose and its hepatic production through a decrease in hepatic gluconeogenesis (11). The administration of

Correspondence to: Widad SOBHI, Department of Physical and Chemical Biology, Faculty of Life and Nature Sciences, University of Bejaia, Targa Ouzermour, 06000 Bejaia, Algeria, Tel. + 213 (0) 553688956.
E-mail: sobhiwidad@yahoo.fr

3mg/kg bw/day of thymoquinone abrogates the hyperglycaemic and hypo-insulinemic response to STZ in rats (8). Administration of volatile oil of *Nigella sativa* seeds prior to STZ induction of diabetes gave a protective effect by decreasing lipid peroxidation and serum nitric oxide (NO), and increasing antioxidant enzyme activity in diabetic rats with an increase in staining intensity for insulin and the number of preserved β -cell (2,12). Increasing glucose-induced insulin release from the β -cells of the Langerhans islets was also observed by using defatted whole extract and basic subfractions of the *Nigella sativa* seeds (13). The effect of total oil of *Nigella sativa* seeds on rat blood homeostasis and its hepatotoxicity has been well investigated (14,15).

Tested on isolated rat hepatocytes, thymoquinone (1mM) was found to be a hepato-protective agent, by reducing the leakage of cytosolic enzymes, alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST), against the toxicity induced by t-butyl hydroperoxide (TBHP) (7).

Recently, Kanter reported that *Nigella sativa* and thymoquinone therapy causes morphologic improvement in neurodegeneration in frontal cortex, brain stem and hippocampus after chronic toluene exposure in rats (16,17). *Nigella sativa* and thymoquinone, used in the treatment of STZ-induced diabetic rats, increased significantly the area of insulin immunoreactive -cells and the histological evaluation of the tissues in treated diabetic animals showed fewer morphologic alterations (17,18). Thymoquinone demonstrated cyto- and genotoxic effects in a concentration-dependent manner (19).

As far as we are aware of, up to date no hepatotoxicity effect of *Nigella sativa* oil was reported. In this study, by looking at the biochemical hepatic markers and histologically on liver slides, we investigated the hepatotoxicity effect of *Nigella sativa* total oil, polar and neutral lipid fractions of total oil and thymoquinone. In parallel, we looked at the regenerative effect of these compounds on Langerhans islets in STZ-N-induced diabetic rats with comparison to the anti-diabetic drug metformin.

Material and methods

Plant materials and extraction procedure

Nigella sativa seeds were purchased from a local herb store in Bejaia, Algeria, and identified by Doctor Benabdelmoumene in the laboratory of plant biology (University of Bejaia, Algeria) where specimens are deposited for future reference. The seeds were powdered in a mixer. 40 g of the powdered seeds were added to 200 ml of methanol and extraction was car-

ried out by steam distillation and dried under vacuum. The obtained extract was subject to a second extraction with the organic solvent hexane (three times 50 ml) then dried yielding a defatted methanolic extract and the lipid fractions.

The total oil was then applied on a silica gel 60 G (70-230 mesh, Merck) column (30cmx3cm). The total neutral lipid fraction (TNLF) was eluted by chloroform (5x100ml), whereas the total polar lipid fraction (TPLF) was obtained by acetone-methanol (50:50, 5x100ml).

Induction of diabetes

Animals:

Female healthy albino rats of Wistar strain, aged 8 weeks and weighting between 180 and 220g, were obtained from the Centre for Research and Development (CRD) at the pharmaceutical group company SAIDAL (Algiers, Algeria). They were housed in plastic cages with a 12/12-h light/dark cycle at an ambient temperature of 22-24°C and humidity of approximately 50%. Animals were fed standard diet and water *ad libitum*. All experiments were in compliance with the guidelines for the care and use of laboratory animals published by the US National Institute of Health (NIH publication No 85-23, revised 1985) with approval of SAIDAL ethic committee.

Experimental protocol:

Prior to experimentation, rats were maintained for three weeks on a normal diet before inducing diabetes by administration of N/STZ. The rats were randomly allotted into one of seven experimental groups:

Group I: control

Group II: diabetic untreated

Group III: diabetic treated with 100mg/kg bw/day of total volatile oil

Group IV: diabetic treated with 100mg/kg bw/day of total polar lipids

Group V: diabetic treated with 100mg/kg bw/day of total neutral lipids

Group VI: diabetic treated with 25 mg/kg bw/day of thymoquinone

Group VII: diabetic treated with 25 mg/kg bw/day of metformin

Diabetes was induced in all groups except group A by a single intra-peritoneal injection of nicotinamide (230 mg/kg) followed, after 15min, by a single intra-peritoneal injection of STZ (65 mg/kg) freshly dissolved in 5mmol/L citrate buffer, pH 4.5 (2,12) according to the protocol reported by Masiello and co-workers (20) with slight modification. Animals of group I (control normal rats) and of group II (untreated diabe-

tic rats) received daily a volume of tap water equivalent to administered treatment volumes by intra-gastric gavage. Two days after STZ-N treatment, development of diabetes was confirmed by measuring blood glucose levels in a tail vein blood samples. Rats with blood glucose levels of 110 mg/dl or higher were considered as diabetic and included for the study. Serum glucose levels in control animals remained normal for the duration of the study (17 days). We took advantage of the partial protection of nicotinamide against the beta-cytotoxic effect of STZ to create a new experimental diabetic syndrome in adult rats that appears closer to non insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) or type 2. This model compared to other available animal models, with regard to insulin responsiveness to glucose and sulfonylureas, yielded a maximum of animals with moderate and stable non-fasting hyperglycemia with a partial preservation of pancreatic insulin stores.

Biochemical analysis

Five days after N/STZ administration, we confirmed the development of diabetes by measuring the blood glucose using the glucose oxidase method (kit from Elitech Diagnostic, France) on overnight fasted rats. Animals showing fasting blood sugars (FBS) more than 110 mg/dl were considered as diabetic and included in the study.

At the end of experimental period (17th day), rats were fasted overnight and blood was taken, centrifuged and serum separated. Effect of each fraction on FBS level was evaluated. Serum levels of transaminases ALT and AST (kits QCA.S.A, Spain) were determined according to Bergmeyer method (21), gamma-glutamyl transpeptidase (γ -GT) (kits, QCA.S.A, Spain) was determined according to the Szass methods (1969), total bilirubin (kits, QCA.S.A,

Amposta /Spain) according to the Jandrossik-Grof method (22) modified by Doumas (23) and alkaline phosphatase (AP) (kits, QCA.S.A, Amposta/Spain) according to the method described by Hausamen and his collaborators (24). Results were compared with that of tymoquinone and standard antidiabetic drug metformin.

Histopathological procedures

After the blood sample collection, all animals were killed under pentobarbital anaesthesia (60 mg/kg bw; Sigma, Poole, UK). Liver and pancreatic tissues were harvested and tissue fragments were fixed in 10% neutral formalin solution, embedded in paraffin, and sectioned at 3 μ m thickness using a microtome (Leica Microsystems, Leica RM 2125 RT). Slices were treated with xylene and ethanol, and then stained with haematoxylin and eosin (H&E). The preparations were evaluated by means of an optical bright-field microscope and photographed (Optiphot 2, Nikon, Tokyo, Japan).

Statistical analysis

The results were expressed as Mean $\pm$ SEM. The Student's t-test was used for analyzing the data between treated and control groups. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

The use of N-STZ has induced diabetes in all rats but glycaemia was not as high as reported previously when induced by STZ alone (2,8,9,11,12,25,26). This is due to the protective effect of nicotinamide (230mg/kg bw) on the pancreatic β cells, to an extent

Table 1. Measurement of the hepatic activity of four enzymes and bilirubin concentrations in serum of normal, diabetic, and diabetic treated with total oil, polar and neutral lipid fractions of *Nigella sativa* seeds, in rats.

Group I: normal rats, **Group II:** diabetic rats, **Group III:** diabetic rats treated with 100mg/kg bw/day of total oil of *Nigella sativa* seeds, **Group IV:** diabetic rats treated with 100mg/kg bw/day of polar fraction of *Nigella sativa* seeds total oil, **Group V:** diabetic rats treated with 100mg/kg bw/day of neutral fraction total oil of *Nigella sativa* seeds, **Group VI:** diabetic rats treated with 25mg/kg bw/day of thymoquinone, **Group VII:** diabetic rats treated with 25mg/kg bw /day of metformin. Each group contains 7 rats.

AST = aspartate transaminase, ALZ = alanine transaminase, γ -GT = gamma-glutamyl transpeptidase, AP = alkaline phosphatase

ANIMALS	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	γ -GT (IU/L)	Bilirubin (mg/L)	AP (IU/L)
Group I	56.5 $\pm$ 10.1	20.3 $\pm$ 4.04	1.35 $\pm$ 0.22	0.067 $\pm$ 0.007	332 $\pm$ 4.75
Group II	82.1 $\pm$ 2.05	40.0 $\pm$ 1.18	0.87 $\pm$ 0.10	0.021 $\pm$ 0.004	430 $\pm$ 74.7
Group III	47.2 $\pm$ 3.31	26.5 $\pm$ 2.95	0.83 $\pm$ 0.08	0.071 $\pm$ 0.005	304 $\pm$ 58.9
Group IV	44.3 $\pm$ 1.77	18.0 $\pm$ 3.32	0.81 $\pm$ 0.21	0.047 $\pm$ 0.007	300 $\pm$ 75.0
Group V	42.3 $\pm$ 1.92	20.4 $\pm$ 1.26	1.44 $\pm$ 0.41	0.059 $\pm$ 0.005	186 $\pm$ 55.0
Group VI	39.9 $\pm$ 2.05	20.9 $\pm$ 3.91	1.28 $\pm$ 0.51	0.049 $\pm$ 0.005	306 $\pm$ 83.2
GroupVII	60.7 $\pm$ 0.61	24.6 $\pm$ 0.43	3.58 $\pm$ 0.50	0.048 $\pm$ 0.007	311 $\pm$ 38.3

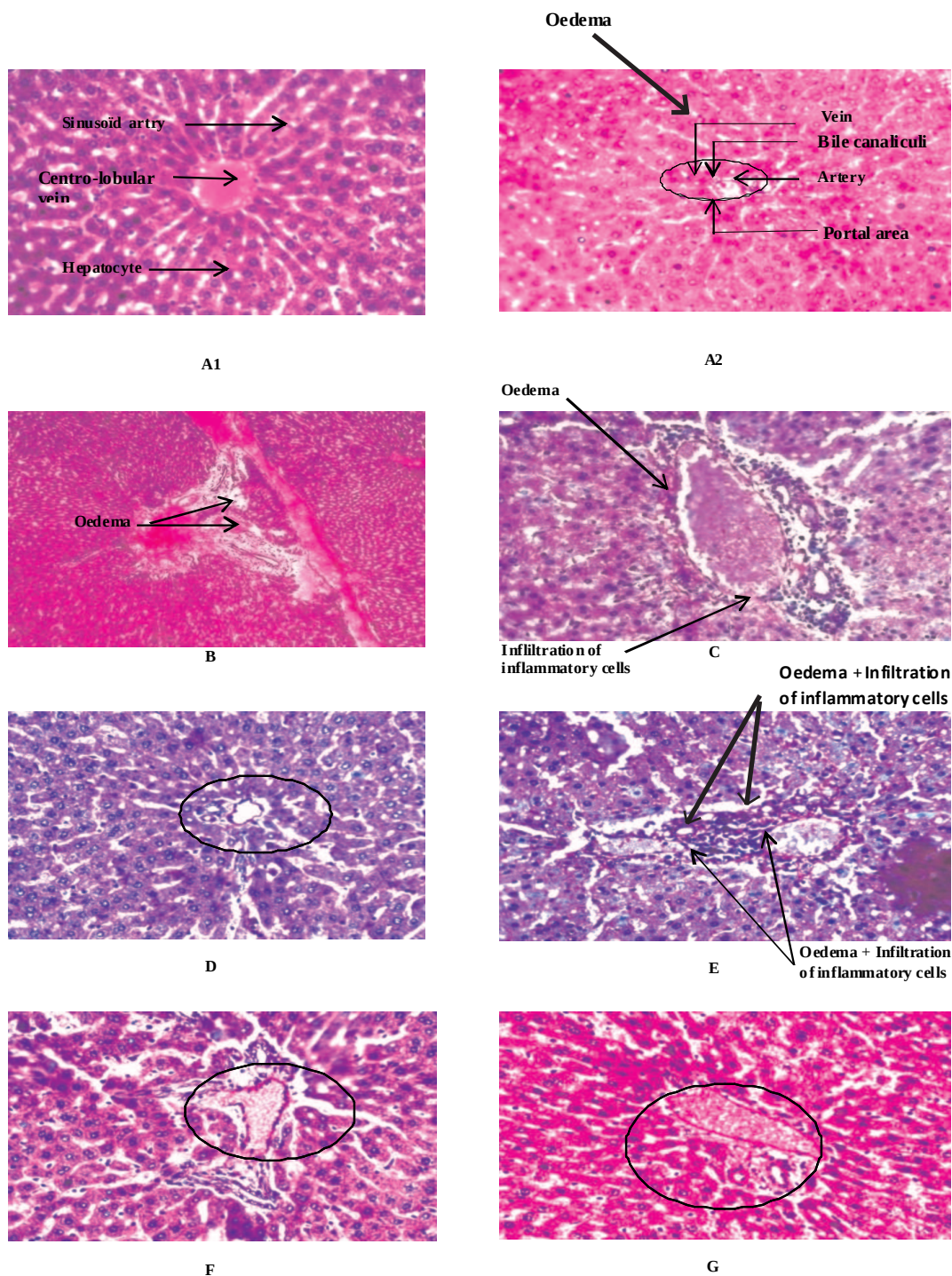


Figure 1. Effect of *Nigella sativa* extract on liver tissue, Histology of liver tissues from normal rats (A1&A2), untreated diabetic rats (B); diabetic rats treated (for 17 days) with total *Nigella sativa* seeds oil at 100mg/kg/day (C), lipid polar (D) and neutral (E) fractions from total *Nigella sativa* seeds oil at 100mg/kg bw/day; thymoquinone at 25 mg/kg bw/day (F) and metformin at 25 mg/kg bw/day (G). Diabetes was induced by N/STZ. Magnification (X425) Slides are stained with haematoxylin and eosin (H&E).

of 40 % or more in favor of the development of type II diabetes without the obesity effect (20). At the end of the experimental period, treatment with total oil, polar

and neutral lipid fractions (at 100mg/kg bw/day for 17 days) caused a significant ($p < 0.01$) decrease in fasting blood glucose (FBG), by 17.7 %, 28.46% and 16.51%

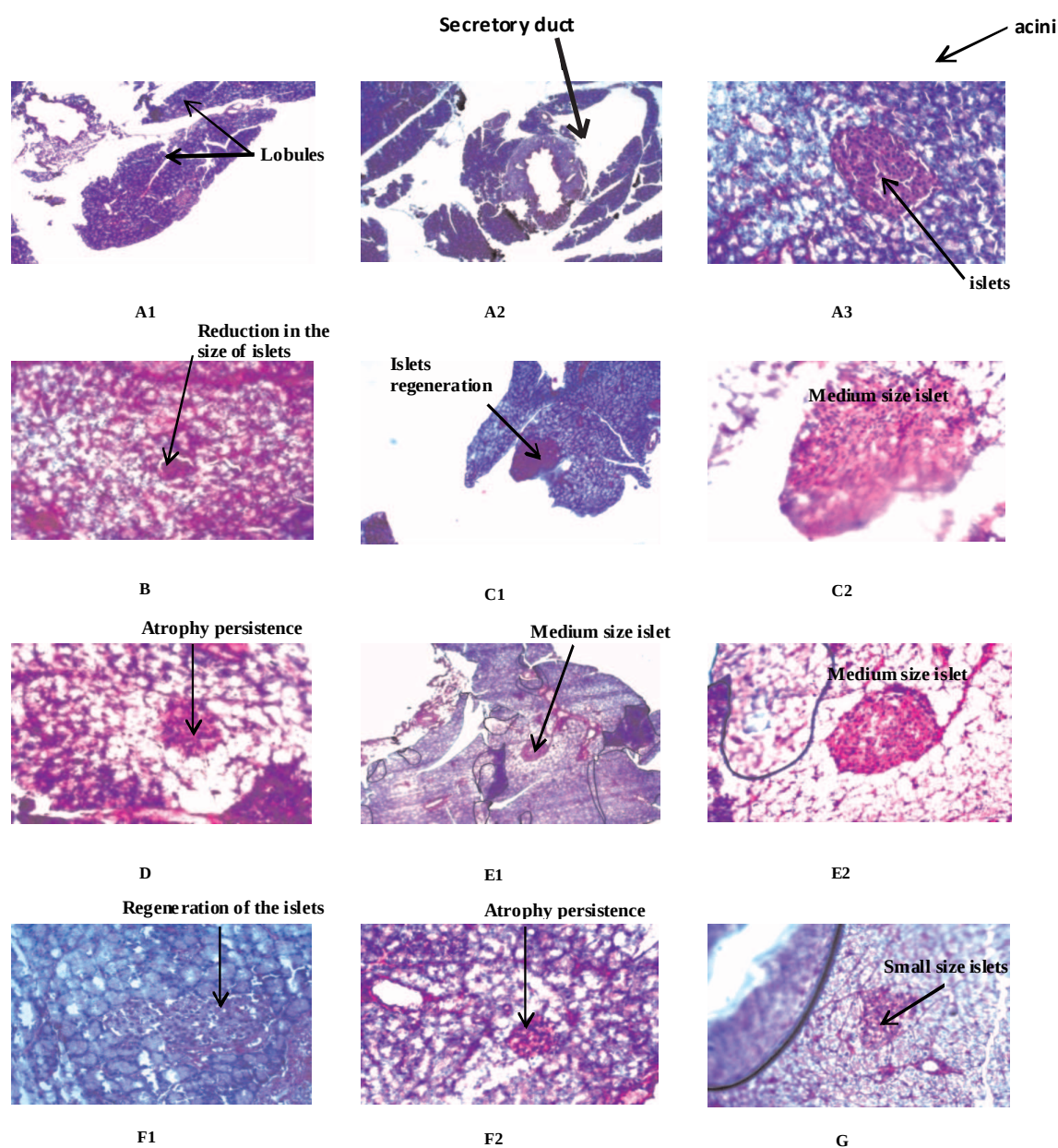


Figure 2. Effect on *Nigella sativa* extract on pancreatic tissue, Histology of pancreatic tissues from normal rats (A1, A2 & A3), untreated diabetic rats (B); diabetic rats treated (for 17 days) with total *Nigella sativa* seeds oil at 100mg/kg bw/day (C1&C2), lipid polar (D) and neutral (E1&E2) fractions from total *Nigella sativa* seeds oil at 100mg/kg bw/day; thymoquinone at 25 mg/kg bw/day (F1&F2) and metformin at 25 mg/kg bw/day (G). Diabetes was induced by N/STZ. Magnification: x125 for A1, C1, E1 and x425 for the others. Slides are stained with haematoxylin and eosin (H&E).

respectively, in diabetic rats (groups III, IV and V with 6 animals in each group). The antidiabetic drug metformin (at 25 mg/kg bw/day for 17 days) lead to 18.48% reduction in FBG (group VI, n=7) while thymoquinone (at 25 mg/kg bw/day for 17 days) did not show any significant effect on FBG which was reduced by less than 8% (group VII, n=6). Control normal rats (group I, n=9) and diabetic non treated rats (group I, n=6) were used as controls.

Table 1 illustrates the effect of total oil, polar and neutral lipid fractions on AST, ALT, γ -GT and AP enzyme activities and on total bilirubin serum titer of diabetic rats at the beginning and at the end of experimental period, 17 days, of treatments (Table 1). It is clear that the three fractions as well thymoquinone and metformin had no significant effect on the levels of transaminases suggesting that they are not toxic for the liver. We found a significant increase in AST ($82.06 \pm$

2.05 IU/L vs. 56.52 ± 10.12 IU/L for controls) and in ALT (39.98 ± 1.18 IU/L vs. 20.30 ± 4.04 IU/L for controls) enzymatic activities in untreated diabetic rats.

Apart from metformin that led to nearly 2.6 fold increase γ -GT activity (3.58 ± 0.50 IU/L vs. 1.35 ± 0.22 IU/L for controls), *Nigella sativa* oil extracts and thymoquinone did not alter the activity of this enzyme demonstrating their non cytolytic hepatic effect. Levels of bilirubin were not affected by treatment with either *Nigella sativa* oil extracts or the two standard molecules (metformin and thymoquinone). However, a significant drop in the level of bilirubin was noticed with untreated diabetic rats (0.021 ± 0.004 mg/dl vs. 0.067 ± 0.007 mg/dl in controls) (Table 1).

Treatment with neutral lipid fraction led to a significant reduction of AP activity, from 332 ± 4.75 IU/L to 186 ± 55.0 IU/L. Treatments with total oil, polar lipid fraction, thymoquinone and metformin did not show any significant changes. However, a significant increase in the activity of this enzyme to 430 ± 74.7 IU/L, was recorded in diabetic non treated rats (Table 1).

In contrast to the biochemical markers where no obvious indication of any hepatotoxicity by different fractions and molecules were observed, the histopathological analysis showed minor and major hepatic lesions (Figure 1). The histology of liver tissue was normal in control rats. Hepatic tissues of this group I present a normal morphological aspect with a lot of lobules, each of which is constituted of hepatocytes separated by small arteries converging towards the centrilobular vein. Lobules are small patches of connective tissue each containing a duct, a large vein, and a small artery which mark the corners where lobules come together, as shown in Figure 1A.

In non-treated diabetic rats, the most consistent findings were the enlargement of the portal area due to the formation of edema (Figure 1B). Treated diabetic rats with total oil of *Nigella sativa* seeds or with the neutral lipid fraction (100 mg/kg bw/day for 17 days) showed, in addition to the enlargement of the portal area observed in non treated rats, inflammatory manifestations due to the infiltration of mononuclear cells (Figure 1C and Figure 1D respectively) pointing out to the occurrence of hepatic lesions or hepatitis. The histology of livers from group IV, treated with polar lipids at 100 mg/kg bw/day for 17 days, showed no inflammatory cell infiltration (Figure 1E). Liver tissue of rats treated with thymoquinone (group VII), 25mg/kg bw/day for 17 days, present an enlargement of the portal area but without inflammatory infiltration (Figure 1F). Metformin treatment had minor effect on the liver histology, which appears to be normal with a much reduced enlargement of the portal area and without inflammatory cell infiltration (Figure 1G).

Histopathological investigation on pancreatic tissue revealed that the pancreatic islet cells were normal in control rats, a full parenchyma with lobular structure where lobules are separated by connective tissue. The islets are of normal size and surrounded by serous acini (Figure 2A1) and a normal extra-lobular excretory duct (Figure 2A2). In diabetic rats with no treatment, pancreatic tissue is abnormal with lobular atrophy and a marked diminution in number and size of islets (Figure 2B) which is a consequence of STZ toxic effect leading to a drop in insulin production and hence development of diabetes.

Pancreatic tissue of diabetic rats treated with total oil (100 mg/kg bw/day for 17 days) presented islets of medium size (Figure 2C). An obvious improvement is observed when compared to slides from untreated rats (Figure 2B) suggesting a regenerative effect. Treatment with polar lipid fractions from total oil of *Nigella sativa* seeds (100mg/kg bw/day, for 17 day) gave no improvement with the persistence of islets anomalies (Figure 2C). But, in the other hand, a significant improvement was observed with the neutral lipid fraction where islets distinctly increased in size (up to 3 fold) and number (Figure 2D). This supports the possibility of a regenerative potential effect of neutral lipids on pancreatic tissue. A more marked increase, particularly in size (up to 5.5 fold), was observed in rats treated with thymoquinone (25mg/kg bw/day, for 17 day) (Figure 2E). In contrast, treatment with metformin (25mg/kg/day, for 17 day) had no effect of the recovery in terms of the number and size of the islets (Figure 2F).

Discussion

The hypoglycaemia activity of extracts from the seeds of *Nigella sativa* in general and oils in particular, with emphasis on thymoquinone, the major constituent of volatile oils of the seeds, is well documented (2-5,9,11,25,27). Our data suggest that such hypoglycaemic effect is a result of (i) a hepatic regulation of carbohydrate metabolism (11), (ii) action on the intestinal absorption (5) or (iii) regeneration of insulin producing pancreatic islets (2,12,13,25,26,28). However, little is known about the toxicity of extracts from these seeds. Recently, It has been reported beside the neuroprotective effect of the oil of *Nigella sativa* seeds and thymoquinone on rats exposed to neurotoxic agents (16-18), and a protective effect of beta-cell damage in STZ-induced diabetic rats (28).

At the end of the experiment (day 17), a significant decrease in blood glucose level was observed in diabetic rats treated with total oil, neutral and polar lipid fractions. In contrast, thymoquinone did not show any

significant effect on glycaemia. In a quite similar study, Kanter and coworkers used 0.2ml/kg bw/day of essential oil from *Nigella sativa* seeds on a one month treatment showed a reduction in blood glucose and an increase in insulin production as a consequence of the regeneration of Langerhans islets (2,12).

High concentrations of total oil or thymoquinone from *Nigella sativa* seeds have been used to show their hypoglycaemic effect on treated animals in STZ or alloxan induced diabetes (3,4,9,11).

Despite the fact that liver markers AST, ALT, γ -GT, AP and bilirubin did not show any hepatotoxic effect which is in agreement with what has been reported previously, histological studies showed clear and apparent hepatic lesions on liver slides.

Histological comparison between liver tissues from different groups of rats showed that diabetic untreated rats present an enlargement of the portal areas which could be a result of sugar metabolic disorders responsible for hepatic edema. The treatment with either total oil or polar fraction worsens the case by an observed inflammatory cell infiltration in contrast to the recovery, with the reduction in edema size, obtained with the neutral fraction. This suggests the presence of a compound (s) in the polar fraction behind the secondary inflammation process (cell infiltration) observed and that the neutral fraction possesses a hepatoprotective effect. Surprisingly, both thymoquinone and metformin did not show any protective effect on the liver of treated diabetic rats. We note that concentrations tested of each treatment: total oil, polar lipid fraction, neutral lipid fraction, thymoquinone and metformin induce a slight histopathological toxic effect, but those lesions could not modify the titer of the hepatic markers.

STZ induces degeneration of the pancreas with a lobular atrophy and a decrease in size and number of Langerhans islets (2,20). A recovery on the pancreatic tissues of rats treated with total oil or the neutral of lipid fraction was observed with a size increase of the islets due to either a regeneration and /or proliferation of the islets in contrast to the treatment with the polar fraction which did not show any positive effect, namely persistence of the abnormalities observed in non treated diabetic rats. Slight regenerative and proliferative effects were noticed on the pancreatic tissues of rats treated with thymoquinone but not with metformin.

Published papers support our findings: Meral and his coworkers noticed that *Nigella sativa* oil improves the antioxidant defense system (reduction in MDA and an increase in GSH and ceruloplasmin), of the liver in alloxan induced diabetes in rabbits with a normal hepatic histology (9). However, pancreatic slides from diabetic rabbits treated or not with total oil from

Nigella sativa seeds showed degeneration, necrosis and infiltration with mononuclear cells beside edema formation (9). A protective effect of the volatile oil on β cells, by acting on the oxidative stress generated by NO following STZ action on the islets of Langerhans (2,12,25) with a light and electron microscopic studies (28) has been reported. Beside the hypoglycaemic effect, extracts from *Nigella sativa* seeds stimulate insulin production in isolated Langerhans islets (13).

Pancreatic protective effect of thymoquinone is well documented where the administration of 50mg/kg bw/day to STZ-induced diabetic hamsters reduces not only significantly blood sugar and glycosylated hemoglobin but acts equally on the reduction of gluconeogenesis (11). It protects the pancreas against NO generated oxidative stress (8) and showed a hepatoprotective effect on cultured hepatocytes (7). In our study, we observed that the regenerative effect on pancreatic islets of neutral lipid fraction was more important than that of thymoquinone.

In this study, we confirmed the hypoglycemic effect of *Nigella sativa* seeds oil and showed that it resides mainly on its polar lipid fraction. Although no changes on hepatic enzyme activities and bilirubin titer were recorded, histological investigation showed liver damages on diabetic rats treated with *Nigella sativa* lipid extracts. Neutral lipid fraction of the oil showed a regenerative and/or a proliferative effect on STZ damaged pancreatic islets. This leads us to suggest that the hypoglycemic effect *Nigella sativa* is partially due to the positive action of the neutral oil fraction on the pancreatic tissue. The action of the polar oil fraction in lowering blood sugar could be explained by other mechanisms such as the action on intestinal sugar metabolism or by the regulation of such metabolism in the liver. The same thing can be stated for the hypoglycemic action of thymoquinone where its involvement on hepatic glycogenesis regulation has been reported (11).

References

- 1 Fararh KM, Atoji Y, Shimizu Y, Shiina T, Nikami H, Takewaki T. Mechanisms of the hypoglycaemic and immunopotentiating effects of *Nigella sativa* L. oil in streptozotocin-induced diabetic hamsters. *Res Vet Sci* 2004;77:123-129.
- 2 Kaleem M, Kirmani D, Asif M, Ahmed Q, Bano B. Biochemical effect of *Nigella sativa* L. seeds in diabetic rats. *Indian J Exp Biol* 2006;44:745-748.
- 3 Kanter M, Meral I, Dede S, Gunduz H, Cemek M, Ozbek H, Uygan I. Effects of *Nigella sativa* L. and *Urtica dioica* L. on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and some liver enzymes in CCl₄-

- treated rats. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med 2003;50:264-268.
- 4 Houcher Z, Boudiaf K, Benboubetra M, Houcher B. Effects of methanolic extract and commercial oil of *Nigella sativa* L. on blood glucose and antioxidant capacity in alloxan-induced diabetic rats. Pteridines 2007;18:8-18.
 - 5 Meddah B, Ducroc R, Faouzi MEA, Eto B, Mahraoui L, Benhaddou-Andaloussi A, Martineau LC, Cherrah Y, Haddad PS. *Nigella sativa* inhibits intestinal glucose absorption and improves glucose tolerance in rats. J Ethnopharmacol 2009;121:419-424.
 - 6 Ali BH. The effect of *Nigella sativa* oil on gentamicin nephrotoxicity in rats. Am J Chin Med 2004;32:49-55.
 - 7 Daba MH, Abdel-Rahman MS. Hepato-protective activity of thymoquinone in isolated rat hepatocytes. Toxicol Lett 1998;95:23-29.
 - 8 El-Mahmoudy A.B, Shimizu Y, Shiina T, Matsuyama H, El-Sayed M, Takewaki T. Successful abrogation by thymoquinone against introduction of diabetes mellitus with streptozotocin via nitric oxide inhibitory mechanism. Int Immunopharmacol 2005;5:195-207.
 - 9 Meral I, Yener Z, Kahraman T, Mert N. Effect of *Nigella sativa* on glucose concentration, lipid peroxidation, anti-oxidant defence system and liver damage in experimentally-induced diabetic rabbits. J Vet Med 2001;48:593-599.
 - 10 Farah KM, Atoji Y, Shimizu Y, Takewaki T. Insulinotropic proprieties of *Nigella sativa* oil in streptozotocin-induced plus nicotinamide diabetic hamster. Res Vet Sci 2002;73:279-282.
 - 11 Farah KM, Shimizu Y, Shiina T, Nikami H, Ghanem MM, Takewaki T. Thymoquinone reduces hepatic glucose production in diabetic hamsters. Res Vet Sci 2005;79:219-223.
 - 12 Kanter M, Coskun O, Korkmaz A, Oter S. Effects of *Nigella sativa* on oxidative stress and β -cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 2004;279:685-691.
 - 13 Rchid H, Chevassus H, Nmila R, Guiral C, Petit P, Chokairi M, Sauvair Y. *Nigella sativa* seed extracts enhance glucose-induced insulin release from rat-isolated Langerhans islets. Fund Clin Pharmacol 2004;18:525-529.
 - 14 Zaoui A, Cherrah Y, Alaoui K, Mahassine N, Amarouch H, Hassar M. Effects of *Nigella sativa* fixed oil on blood homeostasis in rat. J Ethnopharmacol 2000;79:23-26.
 - 15 Zaoui A, Cherrah Y, Mahassini N, Alaoui K, Amarouch H, Hassar M. Acute and chronic toxicity of *Nigella sativa* fixed oil. Phytomedicine 2000;91:69-74.
 - 16 Kanter M. *Nigella sativa* and derived thymoquinone prevents hippocampal neurodegeneration after chronic toluene exposure in rats. Neurochem Res 2007;33:579-588.
 - 17 Kanter M. Effect of *Nigella sativa* and its major constituent, thymoquinone on sciatic nerves in experimental diabetic neuropathy. Neurochem Res 2008;1:87-96.
 - 18 Kanter M. Protective effects of *Nigella sativa* on the neural injury in frontal cortex and brain stem after chronic toluene exposure. Neurochem Res 2008;33:2241-2249.
 - 19 Khader M, Bresgen N, Eckl PM. In vitro toxicological properties of thymoquinone. Food Chem Toxicol 2009;47:129-133.
 - 20 Masiello P, Broca C, Gross, Roye M, Manteghetti M, Hillaire-Buys D, Novelli M, Ribes G. Experimental NIDDM, development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. Diabetes 1998;47:224-229.
 - 21 Bergmeyer, H.U, Scheibe, P, Wahlefeld, A.W.1978. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. Clin. Chem, 24, 58-73
 - 22 Jendrassik L, Gróf P. Simplified photometric methods for the determination of the blood bilirubin. Biochem Z 1938;297:81-89.
 - 24 Hausamen TU, Helger R, Rick W, Gross W. Optimal conditions for the determination of serum alkaline phosphatase by a new kinetic method. Clin Chim Acta 1967;15:241-245.
 - 25 Kanter M, Meral I, Yener Z, Ozbek H, Demir H. Partial regeneration/proliferation of the β -cell in the islets of Langerhans by *Nigella sativa* L. in streptozotocin-induced diabetics rats. Tohoku J Exp Med 2003;201:213-219.
 - 26 Kanter M, Sen S, Donmez S, Aktas C, Ustundag S, Erboga M. Protective effects of irbesartan and alpha lipoic acid in STZ-induced diabetic nephropathy in rats. Ren Fail 2010;32:498-505.
 - 27 Le PM, Benhaddou-Andaloussi A, Elimadi A, Settati A, Cherrah Y, Haddad PS. The petroleum ether extract of *Nigella sativa* exerts lipid-lowering and insulin-sensitizing actions in the rat. J Ethnopharmacol 2004;94:251-259.
 - 28 Kanter M, Akpolat M, Aktas C. Protective effects of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds on β -cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats: a light and electron microscopic study. J Mol Histol 2009;40:379-385.
 - 29 Doumas BT, Perry BN, Sasse EA, Staumfjord JV Jr, Standardization in bilirubin assays: Evaluation of selected methods and stability of bilirubin solutions. Clin Chem 1973;19:984-993.

Evaluation of Antioxidant and Anti-Xanthine Oxidoreductase Activities of *Nigella sativa* Linn seeds' extracts

Kaouthar BOUDIAF¹

Zahira HOUCHE¹

Widad SOBHI²

Mustapha BENBOUBETRA¹

¹Laboratory of Applied Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Setif, ALGERIA

²Department of Physical and Chemical Biology, Faculty of Life and Nature Sciences, University of Bejaia, ALGERIA

*Corresponding Author

e-mail: benboubetra@yahoo.co.uk

Received : January 12, 2010

Accepted : February 17, 2010

Abstract

Nigella sativa, one of the most studied medicinal plants over the world, possesses a number of well established pharmacological properties. In this study, we have prepared different extracts from *Nigella sativa*'s seeds. The results show that hexane (HxE), chloroform (ChE) and ethyl acetate (AcE) extracts present an apparent inhibitory effect on both xanthine oxidase (XO) and xanthine dehydrogenase (XDH) activities of the enzyme xanthine oxidoreductase (XOR), with a markedly better efficiency for XDH activity.

Scavenging power on radical anion superoxide ($O_2^{\cdot-}$) by different *N. sativa* extracts has been evaluated using chemiluminescence assay where two extracts, HxE and ChE, exhibited good scavenger activity, with IC_{50} of 0.18 μ g/ml and 0.3 μ g/ml, respectively. Reducing power (RP) of the different obtained extracts has been assessed by the FRAP assay. ChE and AcE showed the highest RP, which is proportional to the polyphenol content. The obtained data revealed that the antioxidant activity of *Nigella sativa*'s seeds resides in the oil fraction of HxE (inhibition of XO and XDH, and scavenging $O_2^{\cdot-}$) and in ChE and AcE fractions expressing the most important reducing power.

Key Words: Antioxidants; Reactive oxygen species (ROS); *Nigella sativa*; Reducing power (RP); Xanthine oxidoreductase (XOR).

Research funded by : The Algerian Ministry of Higher Education (MESR) (Grant number F01220060052 to MB) and the Algerian Agency for the Development of Research in Health (ANDRS) (Grant number 03/04/03/04/48 to MB)

INTRODUCTION

It is generally accepted that free radicals and reactive oxygen species (ROS) play an important role in the development of tissue damage and pathological changes. At moderate concentrations, ROS play an important role in physiological control of cell function. At high concentrations however, they may cause major damage of cellular constituents of living organisms [1]. Free radicals and their derivatives (also called pro-oxidants) exist in living tissues at low concentrations that are determined by the balance between their production and clearance, by antioxidants, rates. An antioxidant is therefore defined as a compound capable of preventing the pro-oxidation process, or biological oxidative damage [2]. Halliwell and Gutteridge [3] took a much wider view and defined an antioxidant as "any substance that, when present at low concentration, compared to that of an oxidizable substrate, significantly delays, or inhibits, oxidation of that substrate" [4]. The organism must confront and control the presence of both pro-oxidants and antioxidants continuously. Changing the balance toward an increase in the pro-oxidants over the capacity of antioxidants is defined as oxidative stress [5]. Antioxidants can influence the oxidation process by different means. In this regard, antioxidants can be

categorized into two major types capable of preventing oxidative damage by direct and indirect interaction with ROS [5]. The indirect mechanism includes suppression of ROS formation by inhibition of enzymes or chelating transition metals that prevents them for participating in the metal-mediated Haber-Weiss reaction [6]. The direct acting molecules share a similar chemical trial that allows them to donate electrons to the oxygen radical so that they can scavenge the radical and prevent it from attacking the biological target [5].

There is increasing evidence that oxidative stress leads to many biochemical changes and is an important contributing factor in several human chronic diseases, such as atherosclerosis and cardiovascular diseases, cancer, several neurodegenerative disorders, diabetes and likely the aging process [1]. Oxidative stress can result either from the weakening of cellular antioxidant defense and also excess of endogenous ROS production. Xanthine oxidoreductase (XOR) is one of the important biological sources of ROS and is therefore incriminated in several pathological processes [7].

The enzyme XOR catalyses the oxidation of hypoxanthine and xanthine to uric acid, which plays a crucial role in gout [8]. XOR occurs as a homodimer of approximately 300 kDa; each subunit contains four redox centers; a molybdenum cofactor (Mo-co), one FAD

and two Fe_2S_2 sites [9]. Mammalian XOR exists under two interconvertible forms; xanthine dehydrogenase (XDH; EC 1.1.1.204), which predominates *in vivo*, and xanthine oxidase (XO; 1.1.3.22). These forms can be interconverted reversibly by sulphide reagents or irreversibly (XDH to XO) by proteolysis [10]. XDH preferentially reduces NAD^+ , whereas XO cannot reduce NAD^+ , preferring molecular oxygen. Reduction of molecular oxygen by either forms of the enzyme yields superoxide and hydrogen peroxide and it is the capacity of XOR to generate such ROS that is of major interest in clinically related studies [7]. To date, the only commercially available XOR inhibitor is allopurinol, a purine analogue in clinical use for treatment of gout [11]. Despite generally acceptable efficacy and safety profiles, very rare but serious adverse reactions of allopurinol administration can occur [8]. Therefore, the research of new natural molecules is a priority, finding compounds with such pharmacological properties is of great medical importance.

Medicinal plants constitute an inexhaustible source of interesting bioactive compounds. *Nigella sativa* (*N. sativa*), an herbaceous annual plant (family Ranunculaceae), is one of the important medicinal plants which has long been used as a natural remedy for a number of human illnesses and disorders. *Nigella sativa* L. seeds have many acclaimed medicinal properties such as bronchodilatory, hypotensive, antibacterial, antifungal, analgesic, anti-inflammatory and immunopotentiating and are universally accepted as a panacea [12]. Therefore, this interesting plant has been widely studied with regard to its composition and its biological activities. *N. sativa* seeds have been reported to possess anti-inflammatory [13], anti-diabetic [14-16], immuno-potentiating [17,18], anti-tumoral [19,20], antihepatotoxic [21] and antinephrotoxic [22] properties. *N. sativa* has also been reported to have antioxidant activities *in vitro* [23, 24] and *in vivo* [25,26], principally related to lipidic compounds of the seeds. Besides, Atta and Imaizumi [26] demonstrated that ethanolic and aqueous extracts of delipidated *N. sativa* seeds show important antioxidant activity which was comparable to the activity of TBHQ. The present study aims to investigate, *in vitro*, antioxidant activities of different extracts from *Nigella sativa*'s seeds, as well as their inhibitory effects on both XO and XDH activities of XOR.

EXPERIMENTAL

Chemicals

Xanthine, NAD^+ , allopurinol, SOD (superoxide dismutase), heparin-agarose gel TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine), FeCl_3 , luminol, salts and standard polyphenols (gallic acid, quercetin, rutin) were purchased from Sigma-Aldrich. All other reagents and solvents were of analytical grade and came from Panreac, Cheminova, Prolabo, Organics et Janssen Chemica.

Preparation of *Nigella sativa* crud extract and its fractions

Nigella sativa's seeds were purchased from a local market (Batna city, Algeria) and their identification was confirmed in the laboratory. The seeds (100g) were first grounded to a fine powder, soaked in 1L of a hydroalcoholic mixture (methanol/water 7:3 v/v) and left overnight under slight agitation. The filtrate was evaporated at 50°C to eliminate methanol; an aqueous extract was then obtained and considered as *N. sativa* crude extract or CrE. Fractionation of CrE was carried out by using solvents with increasing polarities as described by Gilani *et al* (2001) with modifications. Solvents used were hexane, chloroform and ethyl acetate. This series of extractions gave rise to four fractions; hexane fraction (HxE), chloroform fraction (ChE), ethyl acetate fraction (AcE) and residual aqueous fraction (AqE). CrE and AqE were lyophilized and conserved with the other extracts at -20°C until use.

Total polyphenols and flavonoid content

Total phenolic content of prepared *N. sativa* extracts was determined according to the Prussian blue method [27] modified by Graham [28]. The reaction mixture consisted of 0,1ml of extract (dissolved in methanol), 3ml of distilled water, 1ml of $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (0.016 M) and 1ml of FeCl_3 (0.02 M). The flasks were mixed and allowed to stand for 15min. 5ml of stabilizing solution (30ml of gum Arabic 1% v/v + 30ml phosphoric acid + 90ml of distilled water) were then added and absorbance at 700nm was measured. The total phenolic content was determined as μg of gallic acid equivalents per milligram of extract (μg GAE/mg). Flavonoid content of *N. sativa* extracts was determined by aluminum chloride method [29]. One ml of each sample, with appropriate dilution, was added to 1ml of AlCl_3 (2% in methanol). After 10min, absorbencies were measured at 430nm. Flavonoid concentration was expressed in microgram of quercetin equivalents per milligram of extract (μg QE/mg).

Inhibition of XO and XDH activities of the enzyme XOR

XOR was purified from fresh bovine milk according to the procedure described by Sanders *et al* [30]. Purified XOR is 100% under XO form in the absence of reducing agents. XDH form was obtained by incubating the enzymatic solution with 10mM DTT for 1h at 37°C in sodium phosphate buffer (50mM, pH 7.4) containing 0,1mM EDTA [31,32]. DTT was eliminated by gel filtration on G-25 sephadex column. The rate of prepared XDH form must be higher than 50%. All activity and inhibition tests of XOR were carried out in ambient temperature in sodium phosphate buffer (50mM, pH 7.4) containing 0.1mM EDTA.

XO activity was determined spectrophotometrically following production of uric acid at 295nm ($\epsilon_{\text{uric acid}} = 9600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) in presence of 100 μM of xanthine in

air-saturated phosphate buffer [32]. XDH activity was measured spectrophotometrically following increasing absorbance at 340nm corresponding to the reduction of NAD^+ to NADH ($\epsilon_{\text{NADH}} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) in presence of 100 μM of xanthine and 500 μM of NAD^+ . Enzymatic reactions were initiated by adding 0.1 to 0.2 UI/ml (final concentration) of XOR to the reaction mixture [31].

The percentage of inhibition of XO and XDH activities of XOR by prepared *N. sativa* extracts was calculated as follows: $[\% \text{ inhibition} = (A-B/A) \times 100]$ (A and B correspond respectively to the enzymatic activity in the absence and presence of the inhibitor). IC_{50} of the different extracts were then determined by 'Logit-Log probit' method. Solutions of different extracts were prepared in dimethyl sulphoxide (DMSO), which never exceeded 0.2% (v/v) in the final reaction volume.

Superoxide anion scavenger activity

Superoxide scavenging activity of *N. sativa* extracts was determined by chemiluminescence method. The method is based on the inhibition of light generated by a radical intermediate of the oxidation of luminol. The xanthine-XO system produces superoxide subsequently detected by luminol-dependent chemiluminescence. The reaction was carried out at 37°C in PBS buffer (50 mM, pH 7.4 + 0.1 mM EDTA) in presence of xanthine (160 μM) and luminol (100 μM) [33]. Superoxide generation was induced by addition of XO solution (0.1UI/ml final concentration) and the reaction was then monitored for 90min in a Microlumat LB 96P Luminometer (EG & G Berthold, Wildbad, Germany). The specificity of the reaction was controlled by SOD (100 UI/ml) as a specific inhibitor of superoxide-induced luminescence.

Scavenging ability of the extracts was defined as the percentage of luminescence inhibition with reference to positive control. IC_{50} of tested extracts were determined by the "Logit-Log probit" method with different concentration ranges of 0-50 $\mu\text{g/ml}$, 0-1 $\mu\text{g/ml}$, 0-1 $\mu\text{g/ml}$, 0-5 $\mu\text{g/ml}$, and 0-200 $\mu\text{g/ml}$ for CrE, HxE, ChE, AcE and AqE, respectively.

Ferric Reducing/Antioxidant Power

FRAP assay (Ferric Reducing/Antioxidant Power)

was performed according to the method initially described by Benzie and Strain [34] and modified by Pulido *et al* [35]. In the FRAP assay, reductants ("antioxidants") in the sample reduce Fe^{3+} /tripyridyltriazine complex, present in stoichiometric excess, to the blue ferrous form (Fe^{2+} -TPTZ), with an increase in absorbance at 593 nm. ΔA is proportional to the combined (total) ferric reducing/antioxidant power (FRAP value) of the antioxidants in the sample. Fresh solution of FRAP reagent was prepared by mixing 2.5ml of TPTZ solution (10mM in 40mM HCl) with 2.5ml $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20mM) and 25ml of acetate buffer (300 mM sodium acetate, pH driven to 3.6 par acetic acid). 900 μL of FRAP reagent, warmed at 37 °C, was mixed with 90 μL of bidistilled water and 30 μL of test sample (with appropriate dilutions). The increasing of absorbance in reaction mixtures was followed at 593nm for 30min at 37°C. Lectures were performed against bidistilled water. Absorbencies of reagent blanks (in which sample volume was replaced by either bidistilled water or methanol) and sample blanks (in which the FRAP reagent is absent) were subtracted from the final absorbance value.

A calibration curve of reducing standard ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) was achieved with a concentration range of 0-2000 $\mu\text{mole/L}$. Reducing power was then expressed in micromoles of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ equivalents per mg of sample ($\mu\text{mole Eq FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O /mg}$). The parameter Equivalent Concentration 1 or EC1 was also determined; it has been defined by Pulido *et al* [36] as the concentration of antioxidant having a ferric-TPTZ reducing ability equivalent to that of 1mmol/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Statistical Analysis

The data were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). Student test was used for simple comparisons, one way ANOVA followed by Dunnett test were performed for multiple comparisons (significance level $p \leq 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Total phenolic and flavonoid content

Results show that *N.sativa* crude extract (CrE) contains considerable amounts of polyphenols ($24.36 \pm 2.89 \mu\text{gGAE/mg}$) and flavonoids ($3.28 \pm 0.16 \mu\text{gQE/}$

Table 1. Total polyphenol and flavonoid content of *N.sativa* extracts

Extract	Total polyphenol content ^(a)	Flavonoid content ^(b)
CrE	24.36 ± 2.89	3.28 ± 0.16
HxE	11.95 ± 1.36	0.49 ± 0.07
ChE	191.06 ± 23.34	6.93 ± 0.28
AcE	79.48 ± 8.8	5.96 ± 0.25
AqE	23.81 ± 2.67	3.17 ± 0.16

(a) μg of gallic acid equivalents per milligram of extract

(b) μg of quercetin equivalents per milligram of extract

Values are means of 3 to 4 measures $\pm$ SD.

mg). After fractionation of CrE by different solvents, these compounds were principally concentrated in ChE and AcE fractions. ChE contains the highest amounts of both polyphenols and flavonoids (Table 1), the lowest amounts were found in HxE. According to the data, and comparing with other studies in which similar extraction and analysis procedures were used [36], *N.sativa* crude extract is relatively poor in polyphenols and flavonoids, however, ChE content in polyphenols is considerably important.

Inhibition of XO and XDH activities of XOR/Superoxide anion scavenger activity

N.sativa extracts exert relatively important inhibition on XO and XDH activities of XOR (Table 2) in a dose-dependent manner ($p < 0.05$). HxE activity is remarkably important especially on XDH form ($IC_{50} = 42.02 \mu\text{g/ml}$). The weakest inhibitions were observed with CrE and AqE. At $500 \mu\text{g/ml}$, CrE can only reduce XO activity by 55%. At the same dose, Jiwajinda *et al* [37] considered methanolic extract of *N.sativa* seeds as inactive toward XO activity (inhibition $< 30\%$). Inhibitions exerted by HxE, ChE and AcE on XO were approximately similar (Table 2), on XDH however, the inhibitions were distinctly remarkable with the following order of efficiency: HxE > ChE > AcE.

Inhibition of XOR by *N. sativa* extracts is related to the presence of compounds acting independently or in synergy. With the exception of AqE, all extracts inhibit XDH form more efficiently than XO (Table 2). This could be explained by the presence, in the extracts, of compounds exerting inhibition on both Mo and FAD active sites of the enzyme. Those extracts might contain inhibitors of XO which react at the Mo site; other compounds could react at the FAD site, more accessible in XDH form of the enzyme. In fact, XDH to XO conversion results in conformational changes affecting mostly FAD site [9]. Combined action of compounds

acting at Mo and at FAD sites contributes to the increase of inhibition in the case of XDH.

Inhibition of XDH presents a great interest not only because it is the most predominant form *in vivo* [7], but also because, as well as XO, XDH can produce ROS by its NADH oxidase activity [38]. With NADH as reducing substrate, XDH is more active than XO, and amounts of ROS produced are more important [30,31]. Numerous studies aimed to evaluate inhibitory effects of different plant extracts on XO activity. The inhibitory activities were attributed to polyphenols [39], flavonoids [40] and anthocyanosids [41]. In the present study, inhibitory activity can be partially attributed to flavonoids. With the exception of HxE, we observed a satisfactory correlation between flavonoid content and XO inhibition by *Nigella sativa* extracts ($r = 0.645$, $p < 0.01$); the correlation was more pronounced with XDH form ($r = 0.833$, $p < 0.01$). Flavonoids are well known as potent XO inhibitors [42,11], their activity is related to their chemical structure [43,44], mostly the similarity between purinic cycle of XO substrates (xanthine and hypoxanthine) and A cycle of flavonoids [42].

Scavenging effect on superoxide anion produced by XO

Superoxide scavenging activity of *N. sativa* extracts was determined by chemiluminescence in a xanthine/XO/luminol system. The extracts inhibit light emission in a dose-dependent manner ($p < 0.05$). They showed impressive scavenging activities, with IC_{50} ranging from 0.179 to $12.23 \mu\text{g/ml}$ (Table 2). The most important activities were obtained with HxE, ChE and AcE. In this method, inhibition of superoxide generation by XO can be caused by either direct removal (scavenging effect) or inhibition of XO by the inhibitors present in the extracts. To distinguish between XO inhibition and superoxide scavenging activities of the extracts we used allopurinol as reference.

Table 2. Inhibitory effect of *N.sativa* extracts on XO and XDH activities, and on superoxide generation by XO.

	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)		
	XO inhibition	XDH inhibition	Inhibition of superoxide generation by XO
Allopurinol	6.66 ± 0.41	6.16 ± 0.82 ^{ns}	0.0365 ± 0.0007 ^{**}
EBr	432.99 ± 11.3	382.874 ± 22.97 [*]	6.86 ± 0.59 ^{**}
EHx	295.7 ± 12.7	42.02 ± 2.68 ^{**}	0.179 ± 0.023 ^{**}
ECh	355.87 ± 6.71	76.16 ± 9.43 ^{**}	0.2 ± 0.05 ^{**}
EAc	313.29 ± 53.43	157.98 ± 12.85 ^{**}	1.41 ± 0.35 ^{**}
EAq	620.11 ± 41.82	698.73 ± 34.18 ^{ns}	12.23 ± 0.34 ^{**}

Values are means of 3 to 4 essays $\pm$ SD. Comparisons were set in regard to XO inhibition (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ns: no significant).

Allopurinol is a strict inhibitor of XO and has no scavenging effect on superoxide produced by this enzyme [8]. IC_{50} obtained for allopurinol in chemiluminescence test reflects its inhibitory effect on XO; it is 182 times smaller than that obtained in XO inhibition using spectrophotometric method. Table 3 shows ratios between IC_{50} for all extracts obtained in spectrophotometric and in chemiluminescence methods. The extracts that inhibit XO without any scavenging properties should have a Spect/Lum ratio close to that of allopurinol, as in the case of AcE which may have slight scavenging activity. However, if this ratio is higher, this means that, beside inhibition of XO, the extract exerts scavenging effect on superoxide produced by this enzyme (cases of HxE and ChE).

HxE scavenging activity is probably due to essential oils, which are considered to be good antioxidants *in vivo* [15, 25] and *in vitro* [23]. It has been demonstrated that thymoquinone, a major compound of *N. sativa* essential oil, inhibits superoxide generation by XO with no effect on enzymatic activity [23]. Oil fraction of *N. sativa* contains also tocopherols, phenols and lipids having antiradical properties [15]. Those compounds could contribute to the high scavenging activity observed with HxE. In the case of ChE and AcE, scavenging activity of superoxide is mostly related to their high content of flavonoids. In fact, we observed a linear and highly significant correlation ($r=0.995$, $p<0.01$) between flavonoid content and superoxide scavenging activity for all extracts studied. Moreover, Flavonoids are known for their superoxide radical scavenging properties [43]; their minor redox potential makes them thermodynamically able to reduce oxidative free radicals such as superoxide [44].

Ferric Reducing/Antioxidant Power

Reducing power of *N. sativa* extracts as well as known antioxidants (gallic acid, quercetin, rutin and ascorbic acid) was determined by FRAP assay. In the original method of Benzie and Strain [45], measurements were monitored for 4min since the absorbance of the reduced ferrous-TPTZ complex was stable at this time. In their study, Pulido and coworkers observed that the reaction with certain antioxidants had not finished after 4 min and reduction of the ferric-TPTZ complex continued [35]. They prolonged the reaction for 30 min because, at this interval, the order of antioxidant efficiency of the studied samples was maintained. Lectures at 4 min were yet kept for comparison with the original method.

Figure 1 shows the kinetics of TPTZ- Fe^{3+} to TPTZ- Fe^{2+} reduction by standard antioxidants and *N. sativa* extracts. Some antioxidants continue to react after 4 initial min; their corresponding absorbance even doubled after 30min (case of quercetin). For others, 4min were

sufficient to get stabilized lectures (case of ascorbic acid). The behavior of tested extracts was not different, the reaction with some of them (HxE and ChE) was fast in initial times and stabilized right after. For the others, absorbance continued to increase with time.

EC1 and RP values for chosen antioxidants and *N. sativa* extracts were calculated (Table 4). Results show that gallic acid is the strongest among the four standard antioxidants used. Their order of antioxidant efficiency was as follows: gallic acid>quercetin>ascorbic acid>rutin (EC1 expressed in $\mu g/ml$). When EC1 is expressed in $\mu mole/L$, the order of antioxidant efficiency changed to Quercetin>gallic acid>rutin>ascorbic acid. The same order was obtained by Pulido *et al* (2000). Among *N. sativa* extracts, ChE and AcE expressed the most important reducing power. Their RP values were quite similar in the initial times of the reaction (4 min). After 30min, AcE showed significantly higher RP ($p<0.05$).

Reducing power of HxE estimated with FRAP assay was very weak. This extract which showed impressive superoxide scavenging capacity didn't react in this system. In fact, antioxidant activity is not necessarily equal to reducing capacity. For example, glutathione has a very weak reducing power in FRAP assay [45] because its redox potential is lower than Fe^{3+}/Fe^{2+} couple [48].

Comparisons between RP obtained with ChE and AcE and those of standard antioxidants (Figure 2) show that the two extracts are 20-28 times less efficient than gallic acid, 12-23 times than quercetin, 8-13 times than rutin and only 4 to 6 times weaker than ascorbic acid. These extracts are good source of antioxidants as, in spite of their complexity, they exhibited reducing capacity not much different from ascorbic acid which is considered as one of the most powerful antioxidants [5].

High RP of ChE and AcE could be related to their high flavonoid and polyphenolic content; a linear and highly significant correlation was observed between reducing power and flavonoid content in the four extracts CrE, ChE, AcE and AqE ($r=0.976$, $p<0.001$). Phenolic compounds, particularly flavonoids, are strong antioxidants. In FRAP assay, they express the most important activities compared to other antioxidants [35]. FRAP assay was used in many studies to evaluate total antioxidant capacity of dietary plants [47-50]. It has been found that reducing power depends mostly on fruit's content in polyphenols, anthocyanins and ascorbic acid [50].

It is worth mentioning that various methods are used in different laboratories for the evaluation of total antioxidant capacity. The results of various assays of the same material can differ significantly [51], mainly because of the differences in the reactivity of various antioxidants with respective indicators.

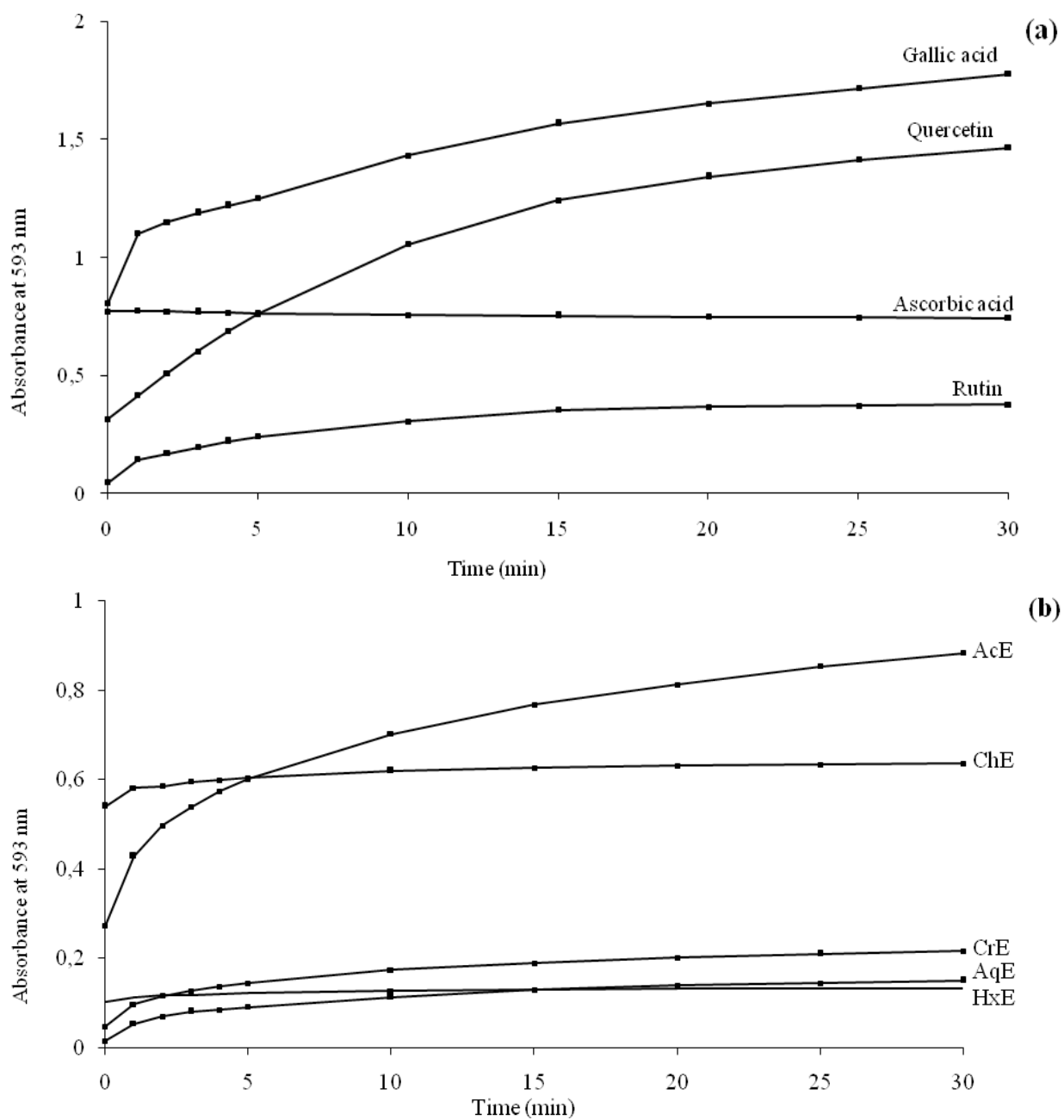


Figure 1. TPTZ-Fe³⁺ to TPTZ-Fe²⁺ Reduction kinetics by (a) standard antioxydants (100 µg/ml), and (b) *Nigella sativa* extracts (1 mg/ml) (n=4).

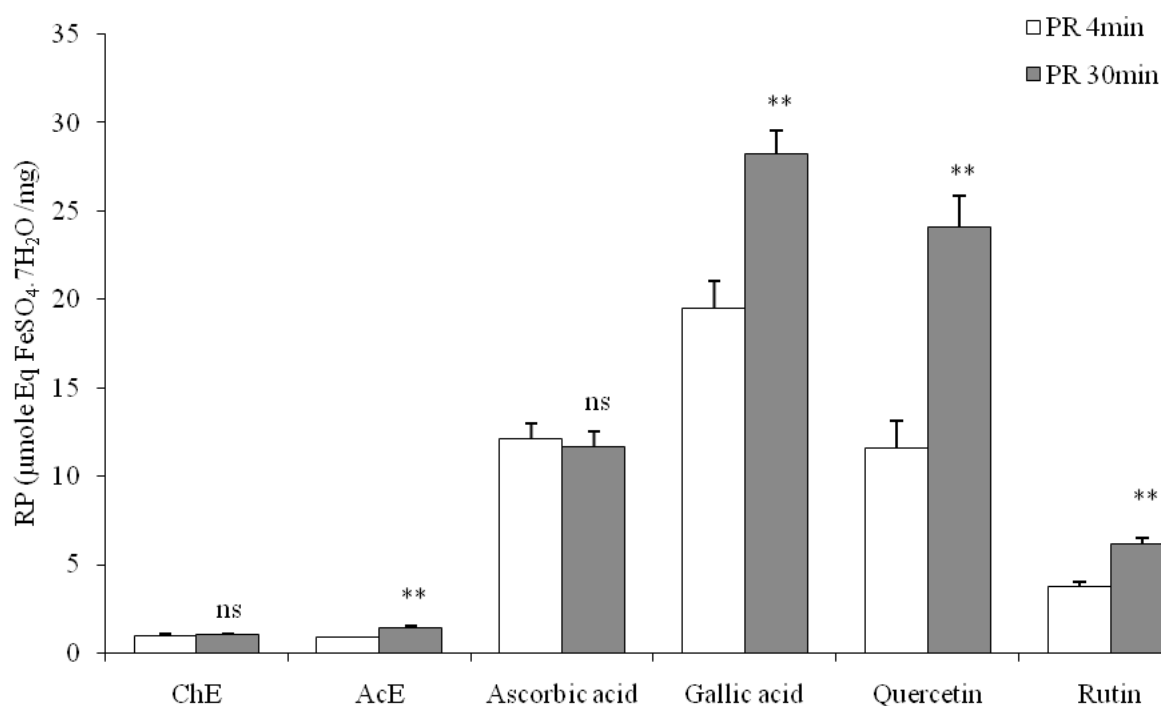


Figure 2. Reducing power of ChE and AcE, compared to standard antioxidants. Comparisons set between PR at 4 and at 30 minutes. ** $p \leq 0.01$; ns: no significant. (n=8).

Table 3. Ratios between IC₅₀ obtained in XO inhibition test (Spectrophotometry) and those obtained in chemiluminescence test (Lum).

	IC ₅₀ Spect #	IC ₅₀ Lum #	Spect/Lum ratio
Allopurinol	6.66	0.0365	182.45
CrE	432.99	6.86	63.12
HxE	295.7	0.179	1651.2
ChE	355.87	0.2	1779.35
AcE	313.29	1.41	222.19
AqE	620.11	12.23	50.7

IC₅₀ in μg/ml

Table 4. EC1 and RP obtained for standard antioxidants and *N.sativa* extracts in FRAP assay

	EC1 ^(a)		PR ^(c)	
	4 min	30 min	4 min	30 min
Ascorbic acid	83.83 ± 1.07 ^(a)	86.7 ± 1.63 ^{ns}	12.12 ± 0.88	11.68 ± 0.81 ^{ns}
Gallic acid	50.77 ± 2.12 ^(a)	36.47 ± 0.15 [*]	19.46 ± 1.57	28.19 ± 1.34 ^{**}
Quercetin	80.62 ± 1.79 ^(a)	42.55 ± 0.94 ^{**}	11.62 ± 1.54	24.07 ± 1.82 ^{**}
Rutin	253.82 ± 5.94 ^(a)	162.64 ± 1.32 ^{**}	3.73 ± 0.3	6.14 ± 0.37 ^{**}
CrE	5.01 ± 0.076 ^(b)	3.33 ± 0.08 ^{**}	0.19 ± 0.03	0.3 ± 0.03 ^{**}
HxE	3.76 ± 0.19 ^(b)	3.36 ± 0.05 ^{ns}	0.25 ± 0.02	0.29 ± 0.02 [*]
ChE	1.032 ± 0.1 ^(b)	0.98 ± 0.09 ^{ns}	0.98 ± 0.06	1.017 ± 0.075 ^{ns}
AcE	1.12 ± 0.03 ^(b)	0.75 ± 0.03 [*]	0.92 ± 0.042	1.41 ± 0.09 ^{**}
AqE	5.89 ± 0.18 ^(b)	3.69 ± 0.13 ^{**}	0.16 ± 0.029	0.26 ± 0.04 ^{**}

(a) EC1 expressed in µg/ml

(b) EC1 expressed in mg/ml

(c) RP expressed in µmole Eq FeSO₄·7H₂O /mg.

Values are means of 6 to 12 assays ± SD. Comparisons were performed between values calculated at 4 and 30min (**p*<0.05, ***p*<0.01, ns: no significant).

CONCLUSION

In the present study, we evaluated the *in vitro* antioxidant capacity of *N. sativa* extracts by different methods. In all tests used, we observed a significant correlation between flavonoid content and antioxidant efficiency, suggesting that the observed antioxidant activity could be due, at least partly, to flavonoids; although, the contribution of other compounds such as the oil fraction cannot be ruled out. Further studies would be necessary to identify the molecules responsible for antioxidant activity especially in HxE, ChE and AcE fractions.

REFERENCES

- [1] W. Dröge, Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiol. Rev.* 82, 47 (2002).
- [2] R.L. Prior, G. Cao, In vivo total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods, *Free Radic. Biol. Med.* 27, 1173 (1999).
- [3] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed. (Oxford University Press, London, 1998).
- [4] J.M.C. Gutteridge, B. Halliwell, Antioxidant Protection and Oxygen Radical Signaling, in: D.L. Gilbert, C.A. Colton (Eds), *Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach*. (Kluwer Academic Publishers, New York, 2002).
- [5] R. Kohen, A. Nyska, Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification, *Toxicol. Pathol.* 30, 620 (2002).
- [6] P.G. Pietta, Flavonoids as antioxidants, *J. Nat. Prod.* 63, 1035 (2000).
- [7] R. Harrison, Structure and function of xanthine oxidoreductase: Where are we now?, *Free Radic. Biol. Med.* 33, 774 (2002).
- [8] M.R. Tarkka, S. Kaukinen, P. Holm, U. Kaukinen, T. Sisto, J. Kataja, W.Q. Huang, Allopurinol does not increase free radical scavenging capacity during reperfusion in coronary artery bypass graft patients, *Scand. Cardiovasc.* 34, 409 (2000).
- [9] C. Enroth, B.T. Eger, K. Okamoto, T. Nishino, T. Nishino, E.P. Pai, Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: Structure-based mechanism of conversion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 10723 (2000).
- [10] E. Della Corte, F. Stirpe, The regulation of rat liver xanthine oxidase. Involvement of thiol groups in the conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) into oxidase (type O) and purification of the enzyme, *Biochem. J.* 126, 739 (1972).
- [11] F. Borges, E. Fernandes, F. Rolivera, Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors, *Curr. Med. Chem.* 9, 195 (2002).
- [12] B.H. Ali, G. Blunden, Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*, *Phytother. Res.* 17, 299 (2003).
- [13] M. El-Dakhakhny, N.J. Madi, N. Lember, H.P.T. Ammon, *Nigella sativa* oil, nigellone and derived thymoquinone inhibit synthesis of 5-lipoxygenase products in polymorphonuclear leucocytes from

- rats, *J. Ethnopharmacol.* 81, 161 (2002).
- [14] K.M. Fararh, Y. Atoji, Y. Shimuzu, T. Takewaki, Insulinotropic properties of *Nigella sativa* oil in streptozotocin plus nicotinamide diabetic hamster, *Res. Vet. Sci.* 73, 279 (2002).
- [15] M. Kanter, I. Meral, Z. Yener, H. Ozbek, H. Demir, Partial regeneration / proliferation of the β -cells in the islets of Langerhans by *Nigella sativa* L. in streptozotocin induced diabetic rats, *Tohoku J. Exp. Med.* 201, 213 (2003).
- [16] Z. Houcher, K. Boudiaf, M. Benboubetra, B. Houcher, Effects of methanolic extract and commercial oil of *Nigella sativa* L. on blood glucose and antioxidant capacity in alloxan-induced diabetic rats, *Pteridins* 18, 8 (2007).
- [17] A. Haq, P.I. Lobo, M. Al-Tufail, N. Rama, S.T. Al-Sedairy, Immunomodulatory effect of *Nigella sativa* proteins fractionated by ion exchange chromatography, *Int. J. Immunopharmacol.* 21, 283 (1999).
- [18] K.M. Fararh, Y. Atoji, Y. Shimuzu, T. Shiina, H. Nikami, T. Takewaki, Mechanisms of hypoglycaemic and immunopotentiating effects of *Nigella sativa* L. oil in streptozotocin-induced diabetic hamsters, *Res. Vet. Sci.* 77, 123 (2004).
- [19] H. Gali-Muhtasib, M. Diab-Assaf, C. Boltz, J. Al-Hmaira, R. Hartig, A. Roessner, R. Schneider-Stock, Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cell via p53-dependant mechanism, *Int. J. Oncology*, 25, 857 (2004).
- [20] E.M. Awad, In vitro decrease of the fibrinolytic potential of cultured human fibrosarcoma cell line, HT1080, by *Nigella sativa* oil, *Phytomedicine*. 12, 100 (2005).
- [21] M.S. Al-Ghamdi, Protective effect of *Nigella sativa* seeds against carbon tetrachloride-induced liver damage, *Am. J. Chin. Med.* 31, 721 (2003).
- [22] B.H. Ali, The effect of *Nigella sativa* oil on gentamicin nephrotoxicity in rats, *Am. J. Chin. Med.* 32, 49 (2004).
- [23] O.A. Badary, R.A. Taha, A.M. Gamal El-Din, M.H. Abdel-Wahab, Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger, *Drug Chem. Toxicol.* 26, 87 (2003).
- [24] M.F. Ramadan, L.W. Kroh, J-T Mörsel, Radical scavenging activity of black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.), and niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) crude seeds oils and oil fractions, *J. Agric. Food Chem.* 51, 6961 (2003).
- [25] S.C. El-Saleh, O.A. Al-Sagair, M.I. Al-Khalaf, Thymoquinone and *Nigella sativa* oil protection against methionine-induced hyperhomocysteinemia in rats, *Int. J. Cardiol.* 93, 19 (2004).
- [26] M.B. Atta, K. Imaizumi, Antioxidant activity of nigella (*Nigella sativa* L.) seeds extracts, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.* 47, 49 (1998).
- [27] M.L. Price, L.G. Butler, Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of the tannin content of sorghum grain, *J. Agric. Food Chem.* 25, 1269 (1977).
- [28] H.D. Graham, Modified Prussian blue assay for total polyphenols, *J. Agric. Food Chem.* 40, 801 (1992).
- [29] T. Bahorun, B. Gressier, F. Trotin, C. Brunet, T. Dine, M. Luckv, J. Vasseur, M. Cazin, J.C. Cazin, M. Pinkas, Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations, *Arzneimittelforschung* 46, 1086 (1996).
- [30] S.A. Sanders, R. Eiselthal, R. Harrison, Oxidation of NADH by human xanthine oxidoreductase: generation of superoxide anion, *Eur. J. Biochem.* 245, 541 (1997).
- [31] A. Baghiani, R. Harrison, M. Benboubetra, Purification and partial characterisation of camel milk xanthine oxidoreductase, *Arch. Physiol. Biochem.* 111, 407 (2003).
- [32] D. Atmani, A. Baghiani, M. Benboubetra, R. Harrison, NADH oxidation and superoxide production of goat milk xanthine oxidoreductase. *Int. Dairy J.* 15, 1113 (2005).
- [33] H. Bouriche, Modulation of inflammation by *Cleome arabica* leaf extract, rutin and quercetin, studied in vitro and in vivo. Ph. D. Thesis, University of Setif, Algeria, 2005.
- [34] I.F. Benzie, J.J. Strain, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay, *Anal. Biochem.* 239, 70 (1996).
- [35] R. Pulido, L. Bravo, F. Saura-Calixto, Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power, *J. Agric. Food Chem.* 48, 3369 (2000).
- [36] I. Parejeo, F. Viladomat, J. Bastida, A. Rosas-Romero, G. Saavedra, M.A. Murcia, C. Codina, Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity, *Life Sci.* 73, 1667 (2003).
- [37] S. Jiwajinda, V. Santisopasri, A. Murakami, O.K. Kim, H.W. Kim, H. Ohigashi, Suppressive Effects of Edible Thai Plants on Superoxide and Nitric Oxide Generation, *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 3, 251 (2002).
- [38] Z. Zhang, D.R. Blake, C.R. Stevens, J.M. Kanczler, P.G. Winyard, M.C.R. Symons, M. Benboubetra, R. Harrison, A reappraisal of xanthine dehydrogenase and oxidase in hypoxic reperfusion injury: The role of NADH as an electron acceptor, *Free Rad. Res.* 28, 151 (1998).
- [39] L. Costantino, A. Albasini, G. Rastelli, S. Benvenuti, Activity of polyphenolic crude extracts

- as scavengers of superoxide radicals and inhibitors of xanthine oxidase, *Planta Med.* 58, 342 (1992).
- [40] R.J. Safitri, P. Tarigan, H.J. Freisleben, R.J. Rumampuk, A. Murakami, Antioxidant activity in vitro of two aromatic compounds from *Caesalpinia sappan* L, *Bio. Factors*, 19, 71 (2003).
- [41] S. Martín-Aragón, B. Basabe, J.M. Benedit, A.M. Villar, In vitro and in vivo antioxidant properties of *Vaccinium myrtillus*, *Pharm. Biol.* 37, 109 (1999).
- [42] N. Cotelle, Role of flavonoids in oxidative stress, *Curr. Top. Med. Chem.* 1 (2001) 569-590.
- [43] P. Cos, L. Ying, M. Calomme, J.P. Hu, K. Cimanga, B. Van Poel, L. Pieters, A.V. Vlietinck, D.K. Berghe, Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers, *J. Nat. Prod.* 61, 71 (1998).
- [44] D.E.C. Van Hoorn, R.J. Nijveldt, P.A.M. Van Leeuwen, Z. Hofman, L. M'Rabet, D.B.A. De Bont, K. Van Norren, K. Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids, *Eur. J. Pharmacol.* 451, 111 (2002).
- [45] S.V. Javanovic, S. Steenken, M. Tosic, B. Marjanovic, M.J. Simic, Flavonoids as antioxidants, *J. Am. Chem. Soc.* 116, 4846 (1994).
- [46] G. Cao, R.K. Prior, Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum, *Clin. Chem.* 44, 1309 (1998).
- [47] B. Ou, D. Huang, M. Hampsch-Woodill, J.A. Flanagan, E.K. Deemer, Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study, *J. Agric. Food Chem.* 50, 3122 (2002).
- [48] B.L. Halvorsen, K. Holte, M.C.W. Myhrstad, I. Barikmo, E. Hvattum, S.F. Rernberg, A.B. Wold, K. Haffner, H. Baugerød, L.F. Andersen, J. Ø. Moskaug, D.R. Jacobs, R. Blomhoff, A systematic screening of total antioxidants in dietary plants, *J. Nutr.* 132, 461 (2002).
- [49] N. Pellegrini, M. Serafini, B. Colombi, D. Del Rio, S. Salvatore, M. Bianchi, F. Brighenti, Total antioxidant capacity of plant foods, brverages, and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro methods, *J. Nutr.* 133, 2812 (2003).
- [50] I. Tosun, S. Ustun, S. An investigation about antioxidant capacity of fruit nectars, *Pak. J. Nutr.* 2, 167 (2003).
- [51] A. Janaszewska, G. Bartosz, Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 62, 231 (2002).

ملخص

من خلال هذه الدراسة توصلنا إلى أن الزيت الإجمالي للحبة السوداء هو الجزء المسؤول عن خاصية تخفيض نسبة السكر في الدم. الخصائص الفيزيائية والكيميائية لهذا الزيت تبين أنه يتميز بجودة بيولوجية عالية. عملية تجزيء زيت الحبة السوداء بواسطة تقنية الكروماتوغرافيا سمحت بالحصول على جزئين هما الزيت المحايد و التي بدورها جزأت إلى أربعة أجزاء و أيضا الجزء القطبي حيث أنه أنتج بدوره ثلاثة أجزاء قطبية.

سمح لنا بتحديد الأحماض الدهنية، الدهون الثلاثية والجامدة HPLC و GC التحليل الدقيق للزيت الإجمالي وأجزائه بواسطة تقنيات والكحول العالي المكونة له. حيث أظهرت النتائج مرة أخرى أن هذه النبتة غنية بالمكونات الدهنية الحيوية وهذا ما سمح لنا بتفسير الخاصية الدوائية بشكل عام و خاصية تخفيض نسبة السكر في الدم بشكل خاص .

وقد بينت النتائج أيضا أن الجزء القطبي للزيت مسؤول عن تخفيض نسبة السكر في الدم عند جرذان التجارب المصابة بداء السكر وفقا لآلية بعد الأكل، الجزء القطبي للزيت سمح من جهته بتجديد جزر لانجرهانز بعد تدميرها من قبل الستربتوزوتوسين.

وقد أظهرت هذه (PCLS) من جهة أخرى تم تقييم سمية الزيت الإجمالي للحبة السوداء أيضا على شرائح رقيقة من الكبد بتقنية كما قمنا أيضا . التجربة بوضوح أن الزيت الإجمالي للحبة السوداء لا تتميز بخاصية حماية الكبد ضد أسيتامينوفين (باراسيتامول) بتقييم سمية الزيت الإجمالي وكذلك الجزأين الهامين المكونين له الجزء القطبي و الجزء المحايد من خلال دراسة في الجسم الحي و قد أظهرت النتائج عدم وجود آثار كبيرة لسمية الكبد وفقا للشروط المستخدمة، ونعني بهذا كمية الزيت المستخدمة ومدة الاختبار.

Résumé

Dans cette étude, nous avons déterminé que l'huile totale de *Nigella sativa* est la fraction responsable de l'effet hypoglycémiant. Ses caractéristiques physico-chimiques indiquent qu'elle a une grande qualité biologique. Son fractionnement par chromatographie sur colonne a permis d'obtenir deux grandes fractions : l'huile neutre, fractionnée elle-même en quatre sous fractions, et l'huile polaire. Son fractionnement par chromatographie a permis d'obtenir trois sous fractions polaires.

L'analyse fine par GC et HPLC de l'huile totale et de ses fractions neutres a permis de dévoiler leur composition en acides gras, en triglycérides et en stérols et alcools supérieurs. Ces résultats indiquent, encore une fois la richesse de cette huile en composés lipidiques bioactifs, ce qui permettrait d'expliquer les propriétés pharmacologiques en générale et hypoglycémiantes en particulier de *Nigella sativa*.

Les résultats indiquent aussi que la fraction polaire est responsable de la réduction de la glycémie chez les rats diabétiques, selon un mécanisme postprandial. La fraction neutre de l'huile permet, de son côté, la régénération des îlots de Langerhans, après leur destruction par la streptozotocine.

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'avait 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.