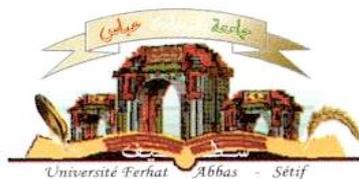


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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



جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE N°...../SNV/2018

Thèse

Présentée par

GUERGOURI Fatima Zohra

Pour obtenir le diplôme de

Doctorat en Sciences

Filière : **Sciences Biologiques**

Option : Biochimie

Thème

**Etude de l'effet des extraits de *Nigella sativa* sur la toxicité
Hépatique induite par le CCl₄ chez le rat wistar**

Soutenue publiquement le 24/06/2018

Devant le Jury

Président : Mr. Arrar Lekhmici Professeur Université Ferhat Abbas Sétif1

Directeur: Mme Sobhi Widad MCA Université Ferhat Abbas Sétif1

Examineurs: Mme Bedjou Fatiha Professeur Université Abderrahmane Mira, Béjaia

Mme Khettal Bachra Professeur Université Abderrahmane Mira, Béjaia

Mme Kadji Hafsa MCA Université Abderrahmane Mira, Béjaia

Laboratoire de Biochimie Appliquée

REMERCIEMENTS

Avant d'entamer ce modeste travail, il m'est agréable d'exprimer mes respectueux sentiments de gratitude et de reconnaissance à madame Sobhi Widad, Je tiens à la remercier infiniment pour son encadrement, son assistance et à l'intérêt qu'elle m'a apporté quant à la réalisation de ce travail qui ne serait pas réalisé sans sa précieuse aide. Je la remercie vivement pour la confiance qu'elle a voulu me témoigner en acceptant de m'encadrer, je lui présente l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je remercie le jury qui nous a honorés par sa présence, ça nous fait plaisir de profiter de la richesse de votre enseignement et de l'étendue de votre savoir. On vous exprime notre profonde gratitude et nos vifs remerciements les plus sincères. Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger cette thèse. Vos connaissances nous ont toujours impressionnés et nous venons par ce modeste travail d'exprimer notre haute considération.

Via ce travail on rend hommage à monsieur Mustapha Benboubeta, que dieu l'accueille en son vaste paradis, pour son encouragement et assistance, il s'est toujours intéressé à l'avancé de mes travaux, et tous les membres de l'équipe de biochimie appliquée, pour l'accueil et l'enthousiasme qui nous a permis de travailler toujours dans la bonne humeur.

Dédicace

Je dédie ce travail

A

Mes chers parents

(Mon adorable maman Saida et mon cher papa Mohamed)

En témoignant de mon affection et de ma reconnaissance pour leur soutien moral et matériel ainsi que pour leurs efforts et sacrifices auxquels je dois essentiellement ma réussite , qu'ils veuillent trouver dans ce master , la preuve de mon amour infini même , nulle dédicace , ne peut exprimer mon ardent affection et mon fort attachement à eux et en espérant notre Dieu de me les garder et préserver en bonne santé .

A

Mon époux et Mes deux filles

Mohamed Seif Eddine Madani / Dina / Darine

Sans ses conseils et encouragements continus, ce master n'aurait pu être accompli .Je lui témoigne le respect et l'amour infini. Que le Bon Dieu protège notre petite famille et nous garde unis dans le bonheur et la joie.

Pour tous ceux que je leur dois, qu'ils trouvent dans ce travail, le témoignage de ma reconnaissance et le fruit de leur soutien. Je leur souhaite bonne santé et longue vie pleine de joie et prospérité.

GUERGOURI FATIMA ZOHRA

الملخص:

هذا العمل البحثي تم إنجازه على مستخلص من حبة البركة والمتمثلين في الزيت الاجمالي والجزء غير قابل للتصبين ، التحليل وفق تقنيات HPLC وCCM أظهر غنى المواد غير قابلة للتصبين ب α - tocophérol ، نتائج أخرى بينت أن هذين المستخلصين يتمتعان بنشاط مضاد للأكسدة في المخبر جد هام .

من اجل تقييم خاصيتهما الوقائية والعلاجية ضد تسمم الكبد الناجم عن رابع كلوريد الكربون (CCl_4) ، عملنا على نموذج حيواني (الفئران) ، أظهر كلا المستخلصين حماية جد فعالة للكبد ومؤكدة بانخفاض كبير جدا فيالترانسامينات,ALAT(ASAT) , و PA ، تحسن على مستوى البلازما والأنسجة في حالة علامات الاجهاد التأكسدي (GSH ,CAT, SOD,MDA) ومورفولوجيا الخلايا الكبدية ، وباختفاء علامات معاناة الكبد الناجمة عن التسمم ب CCl_4 .

بما أن CCl_4 معروف بقدرته على افتعال تسمم كلوي ، اهتمنا بقياس بعض المعايير الكلوية (CREA, UREE, GLY) وبدراسة مقاطع نسيجية كلوية ، تبين أن مستخلصينا قاما بحماية الكلى من مرض الأنابيب الكلوية الحادة الناجم عن CCl_4 ; هذا التأثير الوقائي شوهد من خلال رجوع مستويات CREA و UREE الدموية إلى المعايير الطبيعية ومن خلال تجديد الظهارة الانبوبي.

كلمات البحث: حبة البركة ، الزيت الاجمالي، CCl_4 ، المواد غير قابلة للتصبين، نشاط واقى للكبد.

RESUME

L'étude a été menée sur deux extraits des graines de la plante médicinale *Nigella sativa* : l'huile totale (HT) et la fraction insaponifiable (FI), la caractérisation effectuée par CCM et HPLC dévoile la richesse de la FI en alpha-tocophérol, d'autres résultats ont montré que ces derniers sont dotés d'une importante activité antioxydante *in vitro* et afin d'évaluer leur pouvoir hépatoprotecteur *in vivo*, on a procédé sur un modèle animal de toxicité induite par le tétrachlorure de carbone chez le rat, les deux extraits ont manifesté un effet hépatoprotecteur considérable témoigné par une réduction très significative des transaminases (ALAT, ASAT) et de la PA, une amélioration de l'état des marqueurs du stress oxydatif (GSH, CAT, SOD, MDA) plasmatique et tissulaire et de la morphologie des hépatocytes ainsi qu'une disparition des signes de souffrance hépatique résultant de l'intoxication au CCl₄.

Vu que le CCl₄ est aussi réputé de pouvoir induire une toxicité rénale, on s'est intéressé à doser quelques marqueurs rénaux (CREA, URE, GLY) et à réaliser des coupes histologiques rénales, nos deux extraits se sont avérés néphroprotecteurs face à la tubulopathie aigüe occasionnée par le CCl₄, cet effet protecteur a été exprimé par le rétablissement des taux sanguins de la CREA et de l'URE aux normes et par la régénération de l'épithélium tubulaire.

Mots clés : *Nigella sativa*, Huile totale, Fraction insaponifiable, CCl₄, Activité hépatoprotective.

SUMMARY

The study was carried out on two extracts of the seeds of the medicinal plant *Nigella sativa*: The total oil (HT) and the unsaponifiable fraction (FI), the characterization performed by TLC and HPLC reveals the richness of the IF to alpha-tocopherol; other results have shown that the latter have a high antioxidant activity in vitro and in order to evaluate their hepatoprotective potency in vivo, we proceeded on an animal model of toxicity induced by carbon tetrachloride in the rat, the two extracts showed a considerable hepatoprotective effect as evidenced by a very significant reduction in transaminases (ALAT, ASAT) and PA, an improvement in the state of the markers of plasma and tissue oxidative stress (GSH, CAT, SOD, MDA) and hepatocyte morphology as well as disappearance of signs of hepatic pain resulting from CCl₄ intoxication.

Since CCl₄ is also known to induce kidney toxicity, we were interested in dosing renal markers (CREA, URE, GLY) and performing renal histological sections, our two extracts proved to be renoprotective against acute tubulopathy caused by CCl₄, this protective effect was expressed by the restoration of the blood levels of the CREA and the ERU to the norms and by the regeneration of the tubular epithelium.

Key words: *Nigella sativa*, Total oil, Unsaponifiable fraction, CCl₄, Hepatoprotective activity.

LISTE DES ABREVIATIONS

CoQ₁₀ : Coenzyme Q₁₀

NAPQI : N-acétyl-p-benzo-quinoneimine

GSH : Glutathion réduit

NAC : N-acétylcystéine

CYP 450 : Cytochrome P 450

DMF : N,N-diméthylformamide

ALAT : Alanine aminotransférase

ASAT :Aspartate aminotransférase

PA: Phosphatase alcaline

THO: Transplantation hépatique orthotopique

MEOS: Microsomal Ethanol Oxidizing System

ROS: Reactive Oxygen Species

VLDL: Very Low Density Lipoprotein

LPS: Lipopolysaccharide

LBP: Lipopolysaccharide Binding Protein

NF- κ B: nuclear factor-kappa B

TNF- α : tumor necrosis factor alpha

IL-6 : Interleukine 6

IL-1 : Interleukine 1

PGE2 :Prostaglandine E2

PGD2: Prostaglandine D2

CD14: Cluster of differentiation 14

MyD88: Myeloid Differentiation Primary Response 88

TLR4: Toll-like receptor 4

ADNmt: ADN mitochondrial

INF- α : Interféron α

DEAEH: 4,4'-diéthylamino-éthoxyhexestrol

IV : Voie Intraveineuse

PTPM : Pore de Transition de Perméabilité Mitochondriale

AIF: Apoptosis Inducing Factor

Apaf-1: Apoptotic peptidase activating factor 1

Bax: Bcl-2-associated X protein

Bid: BH3 interacting domain death agonist

FasL: Fas ligand

FADD: Fas-Associated protein with Death Domain
IGF -1: insulin-like growth factor-1
US EPA: US Environmental Protection Agency
IRIS: Integrated risk information system
ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry
OMS: Organisation Mondiale de Santé
IARC: International Agency for Research on Cancer
DEN: Diéthylnitrosamine
ICPS: International Classification for Patient Safety
CREA : Créatinine
URE : Urée
GLY : Glycémie
MDA : malondialdéhyde
CAT : catalase
SOD : superoxyde dismutase
HPLC : High-Performance Liquid Chromatography
CCM : chromatographie sur couche mince
DPPH : diphényl picryl-hydrate
ABTS : L'acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
HT : l'huile totale des graines de Nigella arvensis
INS : la fraction insaponifiable des graines de Nigella arvensis
 α -toco : α -tocophérol
CIRC : Le Centre international de recherche sur le cancer

SOMMAIRE

Introduction.....	1
Chapitre 1 : Revue bibliographique	
1. Le foie	4
1.1. Généralités	4
1.2. Anatomie	4
1.3. Morphologie fonctionnelle.....	5
1.4. Grandes fonctions.....	5
2. Hépatotoxicité et agents hépatotoxiques.....	7
2.1. Définition	7
2.2. Classification.....	8
2.3. Agents hépatotoxiques.....	8
2.3.1. Médicaments	8
2.3.2. Produits chimiques	12
2.3.3. Plantes	25
2.3.4. Champignons.....	25
3. Les agents hépatoprotecteurs.....	27
3.1. Silymarine et Chardon- marie.....	27
3.2. Bétaine.....	28
3.3. Le glutathion.....	28
3.4. Le Chrysantellumamericanum.....	29
3.5. La N-acétyl-L- cystéine.....	29
3.6. La vitamine C	29
3.7. L'asparagine	30
3.8. L'extrait de racine de Kudzu.....	30
3.9. Le calcium D- glucarate.....	30
3.10. Le diméthylglycine.....	31
3.11. La curcumine.....	31
3.12. L'acide ellagique.....	32
3.13. L'extrait de racine de Gingembre.....	32
3.14. Le sodium R-lipoate.....	33
3.15. Cardiotrophine-1	33
3.16. Composition pharmaceutique à base d'hépatoprotecteur et de prébiotique.....	34
3.17. Acide ursodésoxycholique.....	34
3.18. Acide chénodésoxycholique.....	34
4. Nigellasativa.....	35
4.1. Généralités sur la plante	35
4.2. Description botanique de la plante	35
4.3. Propriétés pharmacologiques.....	36
4.4. La fraction insaponifiable.....	41
4.5. Tocophérols.....	42
Chapitre 2 : Matériel et méthodes	44
1. Matériel biologique.....	45
1.1. Animaux	45
1.2. Graines	45
2. Extraction et caractérisation.....	46
2.1. Extraction de l'huile totale de Nigellasativa.....	46
2.2. Extraction des insaponifiables à partir de l'huile de Nigellasativa.....	47

2.3. Détermination de l'alpha-tocophérol par chromatographie sur couche mince.....	47
2.4. Détermination de l'alpha-tocophérol par chromatographie liquide de haute performance.....	48
2.5. Dosage des composés phénoliques.....	48
2.6. Dosage des flavonoides.....	49
3. Activitéantioxydante in vitro.....	49
3.1. Piégeage des radicaux libres	49
3.2. L'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique.....	52
3.3. Test d'hémolyse oxydative	53
4. Etude de l'effet de <i>Nigella sativa</i> sur l'hépatotoxicité induite par le CCl ₄	53
4.1. Induction de l'hépatotoxicité chez le rat par le tétrachlorure de carbone.....	53
4.2. Administration des extraits de <i>Nigella sativa</i>	53
4.3. Répartition des animaux	54
4.4. Prélèvement sanguin	54
4.5. Dosage des paramètres biologiques.....	54
4.6. Prélèvement d'organes	55
4.7. Etude histologique.....	55
4.8. Analyses statistiques	55
5. Dosage des marqueurs du stress.....	55
5.1. Evaluation de la peroxydation lipidique.....	56
5.2. Mesure du glutathion réduit	57
5.3. Evaluation de l'activité de la catalase	57
5.4. Evaluation de l'activité de la superoxyde dismutase SODCu/Zn.....	58
Chapitre 3 : Résultats et discussion	59
1. Extraction et caractérisation.....	60
1.1. Rendement de l'extraction de l'huile totale.....	60
1.2. Rendement de l'extraction des insaponifiables	60
1.3. Composition en en alpha-tocophérol par chromatographie sur couche mince.....	60
1.4. Composition en en alpha-tocophérol par chromatographie liquide de haute performance	61
1.5. Dosage des polyphénols totaux et flavonoides.....	63
2. Activité antioxydante in vitro.....	64
2.1. Piégeage des radicaux libres	64
2.2. L'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique.....	69
2.3. Test d'hémolyse oxydative	70
3. Etude de l'effet de <i>Nigellasativa</i> sur l'hépatotoxicité induite par le CCl ₄	70
3.1. Paramètres biologiques.....	70
3.2. Etudes histologiques.....	73
4. Mécanismes de prévention contre le stress oxydatif induit par le tétrachlorure de carbone.....	79
4.1. Généralité sur la plante.....	79
4.2. Description botanique de la plante.....	82
5. Discussion.....	85
Conclusion.....	89
Références bibliographiques.....	91

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Anatomie segmentaire du foie	5
Figure 2 : Réactions de biotransformation des xénobiotiques.....	7
Figure 3 : Métabolisme du paracétamol	11
Figure 4 : Produits du métabolisme du CCl ₄	15
Figure 5 : Biotransformation du CCl ₄ par le CYP 450 et l'inactivation suicidaire..... CCl ₄ - dépendant du CYP 450	16
Figure 6 : Voies oxydatives du métabolisme de l'éthanol.....	23
Figure 7 : <i>Nigella sativa</i> ; (a) plante entière, (b) fleurs et (c) capsule renfermant les graines..	36
Figure 8 : Structures chimiques des tocophérols et tocotriénols.....	43
Figure 9 : Photographie des graines de <i>Nigella sativa</i> utilisées.....	45
Figure 10 : Schéma d'extraction de l'huile totale à partir des graines de <i>Nigella sativa</i>	46
Figure 11 : Le radical DPPH et sa forme stable.....	49
Figure 12 : Formation et piégeage du radical ABTS ^{•+} par un antioxydant donneur de H [•] ..	51
Figure 13 : Composition en alpha-tocophérol de l'huile totale et de la fraction insaponifiable des graines de <i>Nigella sativa</i>	61
Figure 14 : Chromatogramme HPLC de l'alpha-tocophérol.....	61
Figure 15 : Chromatogramme HPLC de l'alpha-tocophérol de l'huile totale.....	62
Figure 16 : Chromatogramme HPLC de l'alpha-tocophérol de la fraction insaponifiable...	62
Figure 17 : Effet piègeur du DPPH de l'huile totale et la fraction insaponifiable des graines De <i>Nigella sativa</i> et de l' α -tocophérol	64
Figure 18 : Effet piègeur de l'ABTS de l'huile totale et la fraction insaponifiable des graines De <i>Nigella sativa</i> et de l' α -tocophérol.....	66
Figure 19 : Effet piègeur du H ₂ O ₂ par l'huile totale et la fraction insaponifiable des graines de <i>Nigella sativa</i> et l' α -tocophérol.....	67
Figure 20: Effet piègeur du OH [•] par l'huile totale et la fraction insaponifiable des graines de	

<i>Nigellasativa</i> et l' α -tocophérol	68
Figure 21 : Pourcentage d'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique par les extraits des graines de <i>Nigellasativa</i> et de l' α -tocophérol	69
Figure 22 : Pourcentages d'hémolyse en fonction des différentes concentrations de l'huile..70 totale, la fraction insaponifiable des graines de <i>Nigellasativa</i> et de l' α -tocophérol	
Figure 23 : Analyse des marqueurs hépatiques des rats traités par l'huile totale et la fraction des insaponifiables de <i>Nigella sativa</i>	71
Figure 24 : Analyse des marqueurs rénaux des rats traités par l'huile totale et la fraction des insaponifiables de <i>Nigella sativa</i>	73
Figure 25 : Tissu hépatique du lot témoin traité avec l'huile de tournesol et l'huile d'olive..	74
Figure 26 : Tissu hépatique du lot intoxiqué par le CCl ₄	75
Figure 27 : Tissu hépatique du lot traité avec HT puis intoxiqué par le CCl ₄	76
Figure 28 : Tissu hépatique du lot traité avec FI puis intoxiqué avec le CCl ₄	76
Figure 29 : Tissu hépatique du lot intoxiqué par le CCl ₄ ensuite traité avec HT	76
Figure 30 : Tissu hépatique du lot intoxiqué par le CCl ₄ ensuite traité avec FI	76
Figure 31 : Tissu rénal du lot témoin traité avec l'huile de tournesol et l'huile d'olive	77
Figure 32 : Tissu rénal du lot intoxiqué par le CCl ₄	78
Figure 33 : Tissu rénal du lot traité avec HT puis intoxiqué par le CCl ₄	78
Figure 34 : Tissu rénal du lot traité avec FI puis intoxiqué par le CCl ₄	78
Figure 35 : Tissu rénal du lot intoxiqué par le CCl ₄ ensuite traité avec HT	78
Figure 36 : Tissu rénal intoxiqué par le CCl ₄ ensuite traité avec FI	78
Figure 37 : Effet des extraits HT et FI des graines de <i>Nigellasativa</i> sur les marqueurs du stress oxydatif au niveau tissulaire.....	81
Figure 38 : Effet des extraits HT et FI des graines de <i>Nigellasativa</i> sur les marqueurs du stress oxydatif au niveau plasmatique.....	83

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Protocoles d'administration de la N-acétylcystéine.....	10
Tableau 2 : Espèces de champignons contenant des amatoxines.....	26
Tableau 3 : Teneur en insaponifiables de l'huile de <i>Nigella sativa</i> égyptienne.....	42
Tableau 4 : Détermination de la teneur en alpha-tocophérol de l'huile totale..... et de la fraction insaponifiable des graines de <i>Nigellasativa</i>	63
Tableau 5 : Dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes dans les extraits des graines de.. <i>Nigella sativa</i>	63
Tableau 6 : Les valeurs IC ₅₀ des extraits de <i>Nigellasativa</i> et de l' α -tocophérol.....	67
Tableau 7 : Les valeurs IC ₅₀ des extraits de <i>Nigellasativa</i> et de l' α -tocophérol.....	66
Tableau 8 : Les valeurs IC ₅₀ des extraits des graines de <i>Nigella sativa</i> et de l' α -tocophérol..	67
Tableau 9 : Les valeurs IC ₅₀ des extraits de <i>Nigellasativa</i> et de l' α -tocophérol	69
Tableau 10 : Evolution des marqueurs hépatiques des rats traités par l'huile totale et la fraction des insaponifiables de <i>Nigella sativa</i>	71
Tableau 11 : Evolution des marqueurs rénaux des rats traités par l'huile totale et la fraction des insaponifiables de <i>Nigella sativa</i>	72
Tableau 12 : Effet de HT et FI des grains de <i>Nigellasativa</i> sur certains marqueurs du stress oxydatif tissulaire chez des rats hépatotoxiqués.....	80
Tableau 13 : Effet de HT et FI des grains de <i>Nigellasativa</i> sur certains marqueurs du stress oxydatif plasmatique chez des rats hépatotoxiqués.....	84

Introduction

Les maladies du foie sont l'une des principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde. Selon les estimations de l'organisation mondiale de la santé (OMS), Environ 500 millions de personnes vivent avec des infections d'hépatite chronique entraînant la mort de plus d'un million de personnes chaque année. Les coûts engendrés sont extrêmement élevés en termes de souffrance humaine mais aussi en poids financier. En Afrique, les affections hépatiques sont fréquentes et constituent un véritable problème de santé publique. L'alcoolisme, les hépatites bactériennes ou virales, l'aflatoxine et l'automédication en sont souvent les facteurs favorisants. Ces hépatopathies imposent des séjours longs et onéreux en milieu hospitalier. D'où l'intérêt d'une prise en charge précoce et efficace.

Les plantes médicinales sont une source vitale de nouveaux composés potentiellement utiles pour le développement d'une thérapie efficace afin de lutter contre des problèmes de foie. De plus les produits à base de plantes ont l'avantage d'une meilleure accessibilité et acceptabilité, une meilleure compatibilité avec le corps humain, et un minimum d'effets secondaires et sont plus faciles à stocker. Parmi les plantes médicinales les plus exploitées à travers le monde, on rencontre *Nigella sativa* qui a été utilisée depuis des siècles contre une multitude de maux, et notamment comme antidiabétique, antihypertenseur et anti-inflammatoire. Les études récentes soulignent des propriétés spectaculaires et prometteuses (antitumorales, hypoglycémiantes immunostimulantes et antioxydantes).

Les propriétés hépatoprotectives de *Nigella sativa* ont été validées dans quelques études scientifiques. Bien que cet effet soit bien élucidé, on essaiera de s'intéresser dans ce travail à de nouveaux groupes de composés, de prouver in vivo leur implication dans l'effet hépatoprotecteur, d'étudier leur impact sur la fonction rénale, d'évaluer leur activité antioxydante in vitro et de comparer les effets obtenus en fonction du mode d'administration qu'il soit préventif ou curatif. Ces démarches avaient comme objectif d'apporter une preuve biologique mesurable à l'utilisation de cette plante médicinale par les tradithérapeutes contre les affections hépatobiliaires.

Ce document est organisé en trois parties complémentaires ; la revue bibliographique comporte les divers aspects bibliographiques abordés, la seconde partie décrit l'ensemble des matériels et méthodes suivis lors des expérimentations développées puis la partie résultats et discussion dans laquelle on révèle nos résultats et qui sont discutés selon la bibliographie disponible, cette dernière partie est suivie de conclusion et quelques perspectives.

Etude bibliographique

1. Le foie

1.1. Généralités

L'importance biologique du foie humain est témoignée par son volume et par sa densité cellulaire. Il représente 2% du poids corporel et forme la masse viscérale la plus volumineuse de l'organisme, avec près de trois cents milliards de cellules. Il est rouge brun avec une consistance assez ferme. En revanche, il est friable, fragile et se laisse déprimer par les organes voisins (Hiatt et *al.*, 1994).

Le foie manifeste la plus grande capacité à se régénérer après destruction partielle, il est en plus, indispensable à la survie de l'organisme, comme le prouvent les épreuves d'hépatectomie totale.

La durée de vie des cellules hépatiques est d'environ 300 à 500 jours. Les hépatocytes qui disparaissent sont constamment substitués par division des cellules voisines. Si une partie du foie est détruite ou enlevée chirurgicalement, on constate une recrudescence de divisions cellulaires de telle sorte que le foie retrouve sa taille normale. Cette précieuse faculté permet le rétablissement des malades frappés d'une nécrose massive au cours des hépatites virales ou toxiques (Meeks et *al.*, 1991).

Le foie est particulièrement vulnérable aux dommages engendrés par des composés toxiques car il constitue une porte d'entrée dans la circulation systémique et dans les autres tissus (Eliot, 1999).

1.2. Anatomie

1.2.1. Segmentation

Le foie est une glande volumineuse située dans la cavité abdominale, sous le pôle diaphragmatique droit. Il est formé de deux lobes bien individualisés : lobes droit et gauche (on parle aussi de foie droit et gauche). Chaque lobe hépatique est subdivisé en segments hépatiques délimités par des cloisons fibreuses qui vont diviser progressivement le foie en segments plus petits ce qui donne une forme plus simple de cloison fibreuse et qu'on appelle espace porte. Chaque lobe a quatre segments hépatiques (I à IV représentent le foie gauche ; V à VIII représentent le foie droit) (Figure 1).

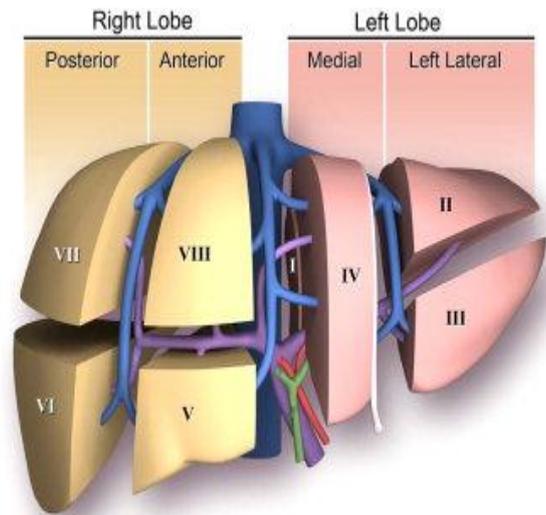


Figure 1 : Anatomie segmentaire du foie (Sibulesky, 2013)

1.3. Morphologie fonctionnelle

1.3.1. Unité fonctionnelle hépatique

L'unité fonctionnelle du foie est représentée par la portion microscopique du parenchyme hépatique qui, si elle est isolée de son environnement, pourra accomplir la fonction hépatique. Elle est représentée par le sinusoïde où circule un mélange de sang provenant de l'intestin (veine porte, artère hépatique). Autour du capillaire il y a un cylindre de parenchyme hépatique qui va permettre les échanges du sang dans le sinusoïde. L'objectif est de contrôler la composition du sang sortant du foie, d'élaborer la bile et de permettre sa sécrétion vers les structures biliaires et le tube digestif. Un lobule hépatique est un segment de parenchyme hépatique centré par une veinule sus-hépatique et est entouré par six espaces portes (Kierszenbaum, 2006).

1.4. Grandes fonctions

Le foie exerce cinq fonctions majeures.

1.4.1. Métabolisme des nutriments

Le foie est une véritable usine biochimique, principal organe chargé du métabolisme des produits chimiques et des aliments (Sicar, 2008). Il régule le stockage des sucres sous forme de glycogène, la genèse ou la dégradation de ce dernier par les hépatocytes dépend du taux circulant de glucose et d'hormones glycorégulatrices telles que l'adrénaline et le glucagon ; en outre les hépatocytes fournissent la néoglucogenèse à partir de molécules issues de la dégradation des triglycérides (Plaa et Charbonneau, 2001). Les hépatocytes synthétisent

diverses lipoprotéines et participent à la production de cholestérol (Leverve, 2001 ; Molinier ,2007), au catabolisme des peptides et des acides aminés qui sont transformés en urée (Ader et *al.*, 2006 ; Ganong et *al.* , 2012). Ils interviennent également dans l'anabolisme de diverses protéines qui sont ensuite déversées dans le sang : facteurs de coagulation, albumine, fibrinogène, protéines de la phase aiguë de l'inflammation (Geown ,2003 ; Singh, 2011).

1.4.2. Sécrétion biliaire

La bile est une sécrétion aqueuse faite de deux constituants majeurs : la bilirubine et les acides biliaires. La bilirubine est issue du catabolisme hépatocytaire de l'hème faisant suite à la dégradation des hématies âgées par les cellules de Kupffer. Quant aux acides biliaires, ils sont synthétisés par les hépatocytes à partir du cholestérol et jouent un rôle primordial dans l'absorption intestinale des lipides et des vitamines liposolubles (Jacquemin ,1998).

1.4.3. Défense immunitaire

Le foie synthétise des protéines de la phase aiguë de l'inflammation, il s'agit entre autres des interleukines 1 et 6, de la C-reactive protein (CRP) et du fibrinogène. En outre, il élimine des particules et bactéries circulantes : cette fonction est assurée par les cellules macrophagiques de Kupffer qui confèrent au foie un rôle de filtre sanguin (Baulard ,1981; Schaiffer et Nicole ,2004).

1.4.4. Fonctions endocrines : le foie est une glande à la fois exocrine et endocrine. Sa fonction exocrine réside dans la sécrétion de la bile dans le tube digestif. Sa fonction endocrine consiste en un contrôle de la composition du sang provenant du tube digestif et se dirigeant vers la circulation générale. Il y a des échanges importants au niveau du foie. Les sécrétions hormonales assurées par le foie sont principalement l'érythropoïétine, la thrombopoïétine et l'insulin-like growth factor-1 (IGF -1) (Kolb ,1975 ; Baulanger et *al.*,1981).

1.4.5. Détoxification sanguine :

Le foie joue un rôle déterminant dans les processus de détoxification en éliminant du sang les substances nuisibles en les dégradant en des composants moins dangereux (Rhoades et Bell, 2009). Il métabolise les médicaments ingérés en des métabolites plus ou moins actifs et synthétise et sécrète la bile pour se débarrasser des toxines liposolubles et du cholestérol.

Si l'excrétion biliaire est bloquée, les toxines stagnent dans le foie et causent des effets néfastes. La chélation des métaux lourds fait partie de la panoplie des tâches de détoxification hépatique, elle consiste à se servir d'une substance organique ou d'un agent chélateur qui se lie à des métaux lourds (plomb, cadmium, mercure) afin de former un complexe stable, inactif et soluble, aisément éliminé par les voies naturelles. Quand les susdits systèmes de

détoxification sont débordés, les toxines s'accumulent dans l'organisme favorisant ainsi l'apparition d'anomalies, de ce fait, il est primordial de booster les fonctions hépatiques de détoxification.

Les réactions de biotransformation assurées par les systèmes enzymatiques hépatiques sont classées en deux catégories, appelées, réactions de phase I et réactions de phase II (Figure 2) (Jones et Springg-Mij, 1984).

***Les réactions de la phase I**, sont des réactions de fonctionnalisation, elles ont pour but de créer ou de libérer des fonctions polaires a fin d'augmenter l'hydrophilie de la molécule c'est à dire augmenter sa solubilité en milieu aqueux pour faciliter son élimination.

On classe dans cette catégorie les réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse.

Ces réactions sont catalysées généralement par les cytochromes P450, d'autres oxydases peuvent intervenir à savoir la monoamine oxydase (MAO), la myéloperoxydase (MPO) et la xanthine oxydase (XO) (Benhamou et *al.*,2000).

***Les réactions de la phase II**, sont des réactions de conjugaison, elles ont pour but d'amplifier la polarité, elles sont catalysées par des transférases, et consistent à transférer une biomolécule sur une fonction polaire de la molécule médicamenteuse, déjà existante ou créée par la phase I. Il existe différents types de conjugaison, les plus répandues chez l'homme sont les réactions de glucuronoconjugaison, de sulfoconjugaison, d'acétylation, de méthylation, de glycine conjugaison et de glutathion conjugaison (Seghrestfa ,1991).

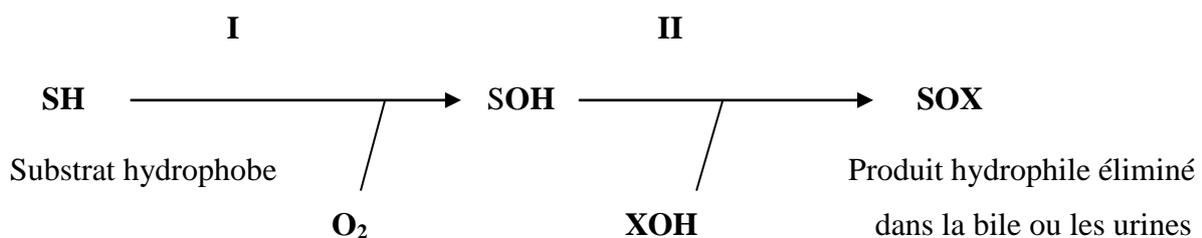


Figure 2 : Réactions de biotransformation des xénobiotiques

2. Hépatotoxicité et agents hépatotoxiques

2.1. Définition

L'hépatotoxicité est le fait que certaines substances dites hépatotoxiques ou hépatotoxines, sont capables d'induire la destruction des hépatocytes ou des hépatopathies (Navarro, Senior.2006). Parmi les principales hépatotoxines, on peut citer : l'éthanol, certains médicaments comme le paracétamol, les trithérapies contenant un inhibiteur de protéase, des produits chimiques, entre autres le tétrachlorure de carbone. L'hépatotoxicité peut résulter dans la stéatose, l'hépatite aiguë ou chronique, la nécrose hépatique (Pessayre et *al.*, 1999).

2.2. Classification

La toxicité hépatique peut revêtir deux aspects selon le caractère prévisible ou non des manifestations (Jacqueson, Piriou, 1999). **La toxicité prévisible** est là quand le mécanisme est en rapport avec une toxicité intrinsèque de la substance étrangère ; elle résulte de l'action directe du xénobiotique (ou de l'un de ses métabolites) sur des constituants cellulaires vitaux, sans implication du système immunitaire. La toxicité prévisible dispose des caractéristiques suivantes : elle est dose-dépendante ; la ré-administration entraîne une récurrence dans un délai comparable à celui de l'atteinte initiale ; les lésions sont reproductibles chez l'animal et sont présentes chez presque tous les membres d'une espèce sensible ; le risque est généralement augmenté par une induction enzymatique ; les signes d'hypersensibilité sont absents. Des facteurs génétiques ou acquis peuvent néanmoins moduler cette toxicité (Kaplowitz, 2002). **La toxicité imprévisible**, idiosyncrasique, se caractérise par une absence de relation dose-effet, une récurrence très rapide après réadministration, une absence de reproductibilité chez l'animal, un risque non modifié par une induction enzymatique, une observation possible de signes d'hypersensibilité ; cette toxicité est de type immunoallergique ou liée à une prédisposition génétique. Ces deux types de toxicité peuvent être la conséquence d'un mécanisme unique par production de métabolites intermédiaires réactifs, certains toxiques peuvent fournir les deux types de toxicité, comme l'halothane ou l'isoniazide par exemple (Jones, Dargan, 2007).

2.3. Agents hépatotoxiques

2.3.1. Médicaments

L'hépatotoxicité est un effet indésirable pouvant survenir avec beaucoup de médicaments. Le type d'hépatotoxicité (fulminante, choléstatique, chronique) diffère fortement d'un médicament à l'autre. (Centre Belge d'Information Pharmacothérapeutique, Communiqué par le Centre de Pharmacovigilance, Juillet 2005)

Selon Davies Textbook of Adverse Drug Reactions (5^{ème} éd.) et le Répertoire Commenté des Médicaments (2004), une liste de « médicaments hépatotoxiques » a été établie :

Acétate de cyprotérone, acide valproïque, allopurinol, amiodarone, amoxicilline + acide clavulanique, amphotéricine B, androgène et stéroïdes anabolisants, antidépresseurs tricycliques et apparentés, antihistaminiques H₂, anti-inflammatoires non stéroïdiens (diclofénac, nimésulide et sulindac), antimycosiques azolés (itraconazole, kétoconazole), certains antirétroviraux

(didanosine, névirapine et stavudine), certains antitumoraux (les antimétabolites), azathioprine, benzbromarone, carbamazépine, dantrolène, felbamate, glitazones, inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine, isoniazide, léflunomide, macrolides, méthyldopa, paracétamol (en cas de surdosage), pénicillines résistantes aux B-lactamases (flucloxacilline), phénothiazines et thioxanthènes, progestatifs, quinolones, rétinoïdes, rifampicine, sulfasalazine, sulfamides (antibactériens et hypoglycémiants), tacrolimus et sirolimus, terbinafine, tétracyclines, thyrostatiques.

Dans diverses lésions hépatiques médicamenteuses on constate une atteinte mitochondriale (Kroemer, Reed, 2000). Les stéatoses microvésiculaires résultent de l'inhibition de la β -oxydation mitochondriale des acides gras (Fromenty, Pessayre, 1995). Les médicaments inhibent la β -oxydation en perturbant le fonctionnement du génome mitochondrial ou des enzymes de la β -oxydation. Les stéatohépatites médicamenteuses (amiodarone, perhexiline) sont dues à l'association d'une inhibition de la β -oxydation mitochondriale, d'une production mitochondriale accrue d'espèces réactives de l'oxygène, et d'une inhibition de la chaîne respiratoire (Pessayre et *al.*, 2001). Certaines hépatites médicamenteuses cytolytiques pourraient être liées à un effet découplant mitochondrial, à une inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale ou à un phénomène de transition de perméabilité mitochondriale. (Berson et *al.*, 1999).

L'hépatotoxicité du paracétamol (l'acétaminophène) a été largement documentée et usée dans des modèles animaux expérimentaux aux laboratoires de recherche ; l'acétaminophène est antalgique et antipyrétique dénué d'activité anti-inflammatoire, il est très bien toléré à posologie respectée. L'intoxication aiguë par le paracétamol survient après l'ingestion unique d'une dose toxique de l'ordre de 100-125 mg/kg et peut conduire à un tableau d'hépatite cytolytique centrolobulaire largement décrit (Mégarbane et *al.*, 2007).

La cytotoxicité du paracétamol réside dans l'action de son métabolite réactif, le N-acétyl-p-benzo-quinoneimine (NAPQI), formé majoritairement dans le foie par des mono-oxygénases à cytochrome P 450 et en plus faible quantité dans le rein par des prostaglandines synthétases. Le NAPQI, électrophile et oxydant puissant, est détoxiqué par le glutathion réduit (GSH) en dérivé mercapturique (figure 3). L'ingestion d'une dose massive de paracétamol conduit à une déplétion mitochondriale et cytosolique du glutathion aboutissant à la mort cellulaire par formation de liaisons covalentes entre le NAPQI et les hépatocytes. La NAC est déacétylée

dans l'organisme en cystéine ; cette dernière est utilisée dans la cellule en association avec la glycine et le glutamate, pour synthétiser le glutathion. La disponibilité de la cystéine est l'étape limitante du processus ; la NAC, qui permet la restauration d'un stock suffisant de cystéine, rend ainsi possible la restauration du stock de glutathion. On a évoqué d'autres mécanismes d'action de la NAC, sans confirmation formelle chez l'homme : apport de sulfates favorisant la sulfoconjugaison du paracétamol, liaison directe au NAPQI comme substitut du glutathion, augmentation de la réduction du NAPQI. La NAC pourrait également moduler la cascade des événements de l'inflammation consécutifs à la liaison du NAPQI avec les hépatocytes.

Le traitement par NAC doit donc être instauré en cas de risque d'hépatotoxicité et aucune contre-indication à son administration ne figure devant ce péril, même la grossesse. Plusieurs protocoles d'administration de la NAC par voies orale ou veineuse ont été proposés

(Tableau 1). Le risque d'hépatotoxicité est déterminé par le dosage de la paracétamolémie dont le résultat est reporté sur les nomogrammes de Prescott et Rumack-Matthew. Si le délai d'ingestion-dosage est inconnu, on détermine le risque d'hépatotoxicité par, au moins, deux prélèvements successifs pour déduire la demi-vie plasmatique d'élimination (Kennon, Heard, 2008).

Tableau 1. Protocoles d'administration de la N-acétylcystéine (Prescott et al., 1977)

Voie d'administration	Posologie	Dose totale	Durée
Intraveineuse	150 mg/kg sur 15 min + 50 mg/kg sur 4 h + 100 mg/kg sur 16 h	300 mg/kg	20 h
Intraveineuse	140 mg/kg sur 15 min + 70 mg/kg sur 4 h x 12	980 mg/kg	48 h
Orale	140 mg/kg + 70 mg/kg toutes les 4 h x 17	1 330 mg/kg	72 h

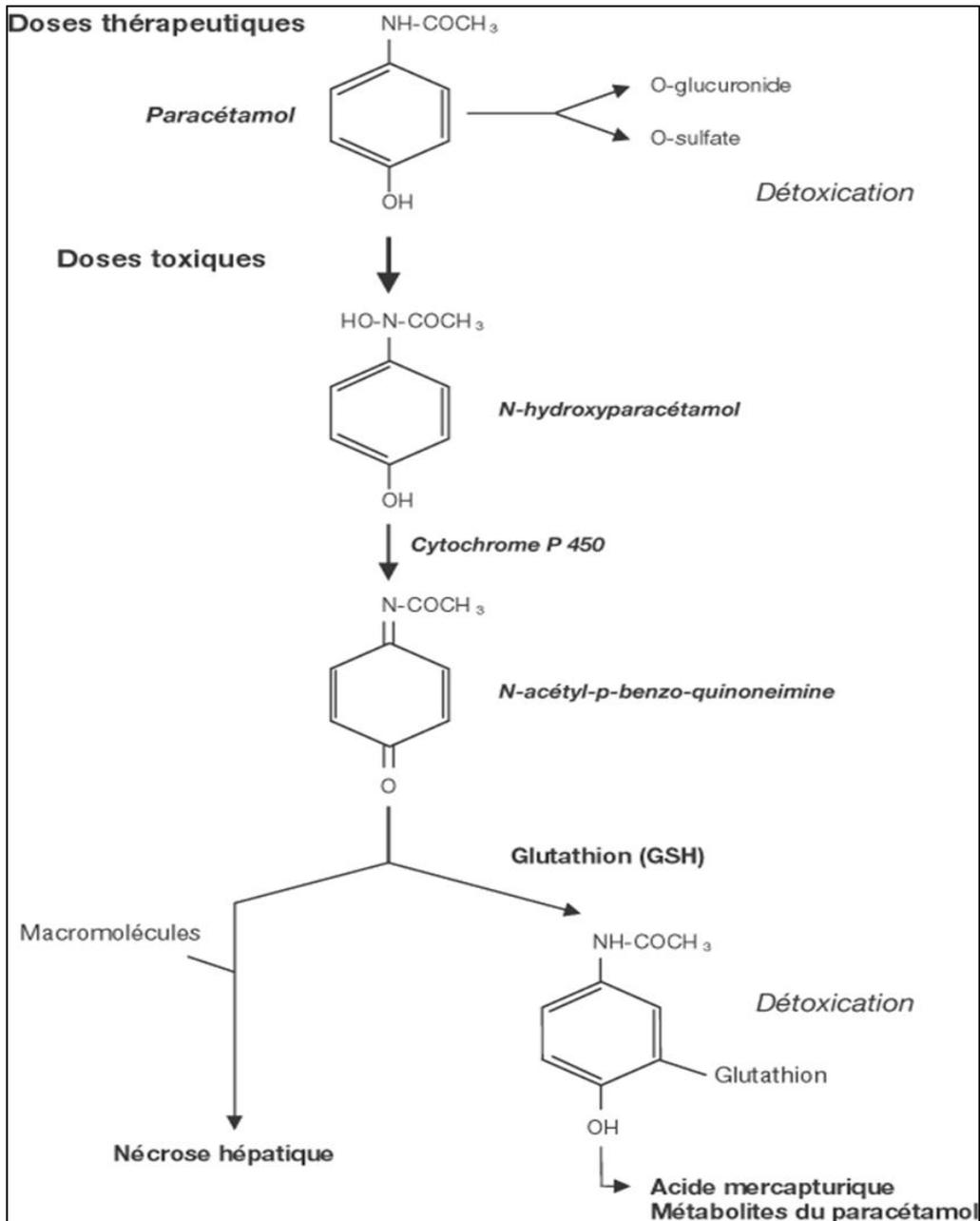


Figure 3 : Métabolisme du paracétamol (Jones, 1998)

2.3.2. Produits chimiques

Les atteintes hépatiques aiguës suite à l'exposition à un produit chimique, Peu fréquentes, constituent des modèles expérimentaux permettant l'étude des mécanismes physiopathogéniques et la suggestion de voies thérapeutiques (Conso, Hermouet, 1993).

2.3.2.1. Tétrachlorure de carbone

Le tétrachlorure de carbone, ou tétrachlorométhane (CCl₄) est un hydrocarbure aliphatique halogéné dérivé du méthane, il s'agit d'un liquide incolore d'odeur étherée et constitue l'un des produits chimiques industriels dont les mécanismes d'action toxique, hépatique en particulier, ont été le plus étudiés. Compte tenu des décisions internationales prises pour protéger la couche d'ozone, la production et l'importation du tétrachlorure de carbone dans l'Union européenne ne sont plus autorisées depuis le 1er janvier 1995 (INRS. Fiche toxicologique n° 8, 1997).

Usage

Le tétrachlorure de carbone est notamment utilisé pour synthétiser des chlorofluorocarbones (CFCs), Il est employé aussi dans la fabrication du nylon, et comme solvant pour l'asphalte, les bitumes, le caoutchouc chloré, les gommes, l'éthylcellulose et comme agent nettoyant pour les machines et les équipements électriques. On s'en sert en tant que réactif dans les laboratoires de recherche ; outre les applications industrielles (agent dégraissant) ou agricoles (insecticide utilisé en fumigation pour le grain), il fut employé en médecine (vermifuge, anesthésique), et comme nettoyant domestique. Il est anciennement utilisé dans les pressings et dans les extincteurs car il est non inflammable. Vu sa toxicité, seuls subsistent désormais les usages industriels eux-mêmes en déclin permanent depuis 1987 du fait du protocole de Montréal et de ses amendements réglementant l'utilisation des substances qui appauvrissent la couche d'ozone (Pichard et *al.*, INE R I S - Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, Version N° 2-1 juin 2005).

Comportement dans l'eau

Le tétrachlorure de carbone est modérément soluble dans l'eau et ne s'adsorbe pas sur les matières en suspension. Il se volatilise rapidement à partir de l'eau de surface avec une demi-vie de 1 heure à 5 jours.

Dans les sols

Sa mobilité dans les sols est forte. Compte tenu de sa constante de Henry, la volatilisation à partir des sols humides est un processus significatif.

Dans l'air

Il est uniquement sous forme vapeur lorsqu'il est présent dans l'atmosphère.

Il s'agit d'une substance volatile qui se retrouvera donc préférentiellement dans l'atmosphère (Pichard et al., INERIS - Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, Version N° 2-1 juin 2005).

Données toxicologiques

L'intégralité des informations et des données toxicologiques provient de diverses monographies publiées par des organismes reconnus pour la qualité scientifique de leurs documents (IARC, 1979, 1999 ; ATSDR, 1994 ; OMS ICPS, 1999).

Sort dans l'organisme

Le tétrachlorure de carbone est absorbé principalement par inhalation et par voie orale. L'absorption cutanée est moins importante et moins rapide.

L'US EPA (US Environmental Protection Agency) retient une absorption moyenne calculée de 40 % pour une exposition par inhalation chez l'homme, les valeurs mesurées étant comprises entre 30 et 65 % (US EPA, 1991). Lehmann et Schmidt-Kehl (1936) ont mesuré une valeur de 60 % lors d'une exposition de 30 minutes à la concentration de 4 200 mg/m³ chez un volontaire.

50 % du tétrachlorure de carbone sont excrétés inchangés, l'autre partie étant métabolisée. Une quantité minime est excrétée dans les urines (4 à 8 %) et les fèces (Reynolds *et al.*, 1984 ; Page et Carlson, 1994 ; McCollister *et al.*, 1951 ; Paustenbach *et al.*, 1988).

Le tétrachlorure de carbone est activé par les cytochromes P450 2E1 (Raucy *et al.*, 1993 ; Gruebele *et al.*, 1996), 2B1 ou 2B2, probablement 3A pour former un radical trichlorométhyl (CCl₃*). Le radical peut se fixer à des molécules cellulaires (ADN, protéines, lipides) altérant des métabolismes essentiels comme celui des lipides (dégénération graisseuse). Des adduits résultant de l'action du CCl₃* sur l'ADN sont observés. En présence d'une forte tension en oxygène dans les tissus, le radical CCl₃* se transforme en un dérivé trichlorométhyl peroxyde (CCl₃OO*) hautement réactif et dont le catabolisme aboutit finalement à la création de phosgène (COCl₂) et d'acide chlorhydrique (HCl).

Ce radical initie la chaîne des réactions de peroxydation lipidique. Il en résulte une destruction d'acides gras poly-insaturés, en particulier ceux associés aux phospholipides. La perméabilité des mitochondries, du réticulum endoplasmique et des membranes plasmiques est altérée, il en résulte un trouble de l'homéostasie calcique. Parmi les produits de dégradation des acides gras on trouve des aldéhydes comme le 4-hydroxynonéal, qui inhibe de nombreuses enzymes et se fixe sur des groupements fonctionnels de protéines (figure 8).

Le radical trichlorométhyl peut aussi subir des réactions anaérobies conduisant à la formation de chloroforme (CHCl_3), d'hexachloroéthane (C_2Cl_6) et de monoxyde de carbone (CO) (figure 4).

En cas de diminution de la pression partielle en oxygène, condition réalisée dans la région centrolobulaire du foie où prédominent les lésions anatomopathologiques lors des intoxications, il se forme un carbène, dérivé encore plus réactif. En raison de la faible tension en oxygène, la compétition d'électronégativité entre l'atome de chlore et celle d'oxygène, se joue en faveur du chlore qui s'élimine du radical trichlorométhyl sous forme d'un atome chargé négativement donnant une fonction carbène caractérisée par une lacune électronique ($\text{Cl}_2:\text{C}$) (USEPA, 1980). Ce dichlocarbène serait l'élément le plus toxique qui se fixerait sur le fer ferreux du cytochrome P-450, inhibant sa possibilité de réoxydation et par conséquent son activité (figure 5).

Sa fixation par des liaisons covalentes sur des protéines proches de son lieu de formation serait à l'origine des réactions de lyse cellulaire observées lors de ces intoxications.

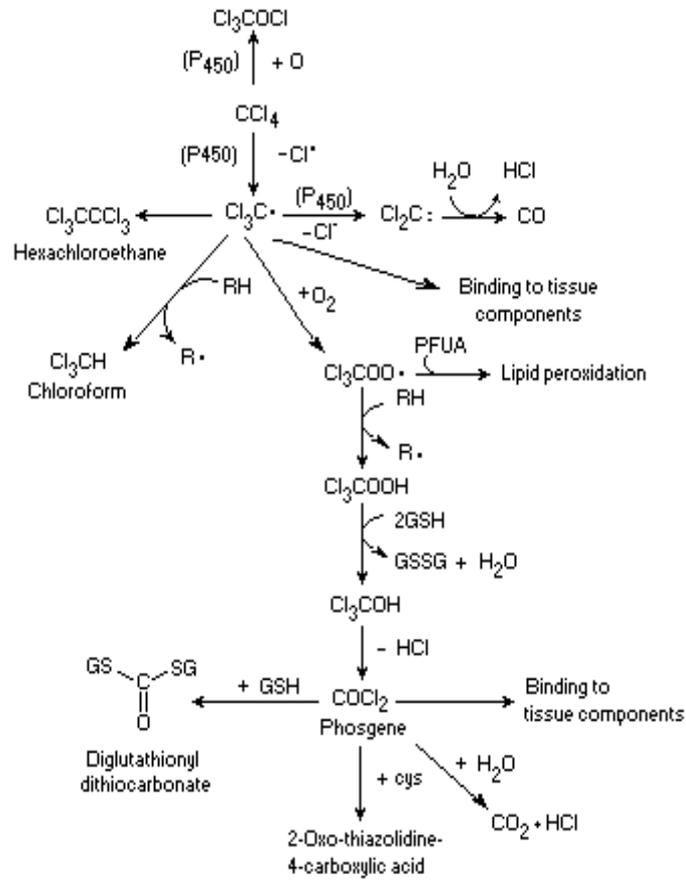


Fig. 1. Biotransformation of carbon tetrachloride
 (From Harris & Anders, 1981; Anders & Jakobson, 1985;
 McGregor & Lang, 1996)

Figure 4 : Produits du métabolisme du CCl₄
 (Environmental Health Criteria 208, 1999)

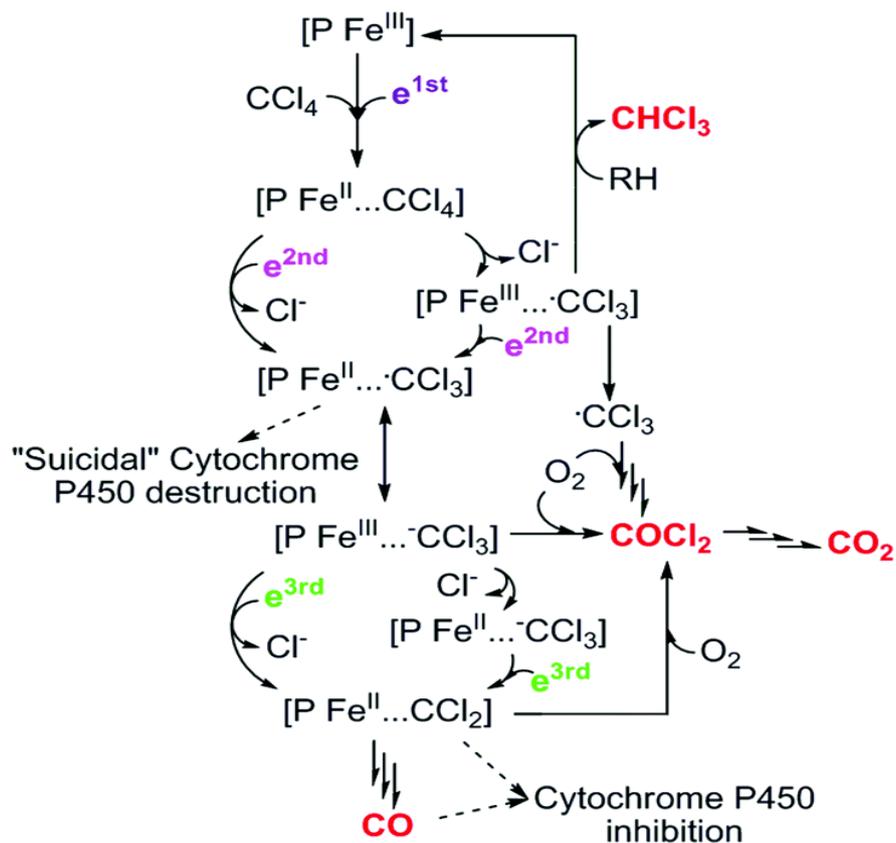


Figure 5 : Biotransformation du CCl₄ par le CYP 450 et l'inactivation suicidaire CCl₄-dépendant du CYP 450 (Xiao-Xi Li et *al.*, 2014)

Toxicologie aigue

L'intoxication au tétrachlorure de carbone résulte d'ingestion accidentelle ou volontaire ou le plus souvent d'exposition par inhalation aux vapeurs vu que les concentrations de saturation de vapeur peuvent atteindre 800 000 mg/m³ à température ambiante. Les principaux effets de l'exposition aigue sont la dépression du système nerveux central, des troubles hépatiques et des lésions rénales (US EPA, ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry)). Le foie et les reins sont des organes cibles du tétrachlorure de carbone. La sévérité des effets sur le foie dépend d'autres facteurs tels que la sensibilité des espèces, la voie et le mode d'exposition, le régime alimentaire ou la co-exposition à d'autres composés, en particulier l'éthanol.

Le prétraitement avec des composés comme le phénobarbital et la vitamine A, accentue l'hépatotoxicité, alors que d'autres tels que la vitamine E, réduisent l'action hépatotoxique du tétrachlorure de carbone (Environmental Health Criteria, 1999).

Les signes d'atteinte hépatique surviennent un à quatre jours après l'exposition. Une augmentation spectaculaire de la concentration en calcium dans les mitochondries du foie se produit, accompagnée de changements dans la distribution des électrolytes avec un gonflement des cellules hépatiques et de l'épuisement du glycogène hépatique (Environmental Medicine : Integrating a Missing Element Into Medical Education. Washington, 1995). Des décès sont rapportés à l'occasion de l'ingestion de doses aussi faibles que 1,5 ml chez l'adulte et 0,18-0,92 ml chez l'enfant (Lamson *et al.*, 1928). L'ancienneté des données rend leur pertinence discutable.

Le tableau clinique se caractérise, indépendamment de la voie d'absorption, par des symptômes gastro-intestinaux et neurologiques survenant dès les premières 24 heures. Il

s'agit de nausées, de maux de tête, de vertiges, de vomissements, de diarrhées et de dyspnées. Puis surviennent les atteintes hépatiques et rénales, 24 à 48 heures après l'absorption. L'atteinte rénale est prédominante sous forme d'une tubulopathie aigue, souvent de type anurique réversible en 3 à 15 jours. Adewole et ses collaborateurs (2007) ont induit, en utilisant le CCl₄, des lésions rénales chez des rats Wistar et ceci afin d'évaluer l'éventuel effet protecteur de la mélatonine contre le stress oxydatif et la néphrotoxicité causés par le CCl₄.

De même, Ozturk et ses co-équipiers (2003) ont induit via l'injection sous cutanée de 1 ml/Kg de CCl₄, des altérations tubulaires et glomérulaires chez 32 rats Sprague-Dawley pour évaluer l'effet de la bétaïne face à ces anomalies.

L'exposition au CCl₄ peut conduire à la néphrose, la néphrite, et l'insuffisance rénale. L'insuffisance rénale est la principale cause de décès chez de nombreux patients atteints d'une exposition aiguë de CCl₄. (US EPA IRIS).

La cytolyse hépatique évolue rarement vers l'insuffisance hépatique. Une atteinte pulmonaire de type œdème lésionnel est de mécanisme mixte inhalation alvéolaire et insuffisance rénale. Cette voie d'exposition est rare et c'est surtout l'inhalation qui est la principale circonstance d'intoxication. Les troubles neurologiques sont souvent discrets. L'atteinte hépatique et rénale découverte après un intervalle libre de 24 à 96 heures.

Un homme de 56 ans exposé accidentellement à du tétrachlorure de carbone à la suite d'une rupture de flexible a perdu connaissance. Il a ensuite souffert d'une amnésie, de propos incohérents, d'une ataxie et de troubles cérébelleux (Johnson *et al.*, 1983).

17 employés sur 25 exposés à du tétrachlorure de carbone (estimé à 300 à 500 ppm (1 917 à 3 195 mg/m³)) utilisé pour nettoyer une pompe d'un système d'air conditionné ont présenté une hépatite révélée 10 jours après l'intoxication (Deny *et al.*, 1987).

Trois personnes ont appliqué une lotion contre la gale contenant 67 g de tétrachlorure de carbone dans 100 g. Toutes ont souffert de nausées, vomissements, coliques dans les 2 à 48 heures. Deux patients ont présenté dans les 24 à 48 heures une hémorragie conjonctivale et une hépatite anictérique. Ces 3 victimes ont développé une insuffisance rénale oligurique entre le 3^{ème} et le 7^{ème} jour. Au 7^{ème} jour les tests hépatiques sont normaux et la fonction rénale est redevenue normale dans un délai de 2 à 4 semaines (Perez *et al.*, 1987). Cette observation souligne que les voies cutanées et respiratoires altèrent plus sévèrement la fonction rénale qu'hépatique.

Une consommation importante d'alcool potentialise les effets du tétrachlorure de carbone (Norwood *et al.*, 1950).

Lors de l'exposition cutanée continue aux vapeurs de tétrachlorure de carbone, un blanchiment cutané spontané transitoire est observé au bout de 5 minutes. Après 10 à 20 minutes, un érythème cutané transitoire survient (Wahlberg, 1984). Un résultat similaire avait été obtenu par Stewart et Dodd (1964).

Toxicologie chronique

Dans une industrie de fabrication de métaux, Une étude de mortalité a mis en évidence une légère augmentation de la mortalité par cirrhose hépatique chez des salariés potentiellement exposés au tétrachlorure de carbone (Teta et Ott, 1988).

Une autre étude épidémiologique a été menée chez des salariés de trois usines. Les niveaux d'exposition étaient estimés inférieurs ou égaux à 1 ppm (6,4 mg/m³), compris entre 1 et 4 ppm (6,4 et 25,6 mg/m³) et supérieurs à 4 ppm (25,6 mg/m³) (Tomenson *et al.*, 1995). L'analyse de différents paramètres biochimiques et hématologiques n'a pas révélé de différences entre le groupe témoin et le groupe exposé à la plus faible dose. En revanche, une augmentation significative de l'alanine aminotransférase (ALAT) et de la

gamma-glutamyl transférase (gammaGT) est rapportée pour l'ensemble des groupes exposés au tétrachlorure de carbone.

Chez des salariés exposés au tétrachlorure de carbone, des atteintes hépatiques fulminantes n'ont été observées que chez deux sujets connus pour avoir une consommation alcoolique importante, ce qui suggère un effet synergique entre l'alcool et le tétrachlorure de carbone (Manno *et al.*, 1996).

Kazantis *et al.*, (1960) ont étudié 17 employés exposés au tétrachlorure de carbone (45 à 100 ppm (288 . 639 mg/m³)). Quinze des sujets se plaignaient de nausées, anorexie, vomissements, douleurs épigastrique, céphalées, étourdissements, troubles anxieux. Une semaine après la réduction des expositions à 0-9 ppm (0-56 mg/m³) les signes ont disparu.

Effets cancérigènes

Le tétrachlorure de carbone est soumis à la classification suivante quant à son éventuel effet cancérigène :

***L'Union Européenne**

Catégorie 3 : substances préoccupantes pour l'homme (JOCE, 2004).

***CIRC – IARC (International Agency for Research on Cancer)**

Groupe 2B : l'agent (ou le mélange) pourrait être cancérigène pour l'homme (1999).

***US EPA (IRIS (Integrated risk information system))**

Classe B2 : substance probablement cancérigène pour l'homme (1991).

Le risque de survenue de cancer suite à l'exposition au tétrachlorure de carbone a été évalué chez des populations professionnelles différentes (Ott *et al.*, 1985 ; Blair *et al.*, 1998 ; Checkoway *et al.*, 1984 ; Wilcosky *et al.*, 1984 ; Bond *et al.*, 1986).

L'étude de Ott *et al.*,(1985) est une étude de mortalité menée sur 1 919 hommes employés pendant au moins 1 an entre 1940 et 1969 dans l'industrie chimique aux Etats-Unis. Au sein de cette population, 226 employés ont travaillé dans une unité de production de méthanes chlorés (chlorométhane, dichlorométhane, chloroforme et tétrachlorure de carbone, tétrachloroéthylène). Les niveaux d'exposition ne sont pas rapportés. 42 décès ont été observés chez les 226 employés de l'unité (SMR de 0,8 ; CI (0,4-1,5). 9 cancers sont rapportés incluant 3 cancers du pancréas.

Une étude de mortalité a porté sur 14 457 employés pendant au moins 1 an entre 1952 et 1956 à la maintenance des avions aux Etats Unis (Blair *et al.*, 1998). Dans cette cohorte 6 737 employés ont été exposés au tétrachlorure de carbone (Steward *et*

al.,1991). Chez les femmes l'exposition au tétrachlorure de carbone est associée à une augmentation du risque de lymphomes non-hodgkinien (RR 3,3, à 95 %, CI 0,9-12,7) et myélomes multiples (RR : 20 à 95 %, CI 0,4-9,1). Chez les hommes le risque est moindre : RR de 1,2 à 95 % (CI 0,4-3,3) pour les lymphomes non hodgkinien et de 1,2 à 95 % (CI 0,4-3,7) pour les myélomes multiples. Aucune association n'est trouvée avec le cancer du sein.

Une étude cas-témoin au sein d'une cohorte d'employés de l'industrie du caoutchouc a été réalisée pour identifier une relation entre l'exposition aux solvants et la survenue de cancer (Checkoway *et al.*, 1984 ; Wilcosky *et al.*, 1984). La cohorte était constituée de 6 678 employés de sexe masculin en activité ou à la retraite entre 1964 et 1973. Une association a pu être établie entre l'exposition pendant au moins 1 an au tétrachlorure de carbone et les leucémies lymphocytaires (OR 15,3, $p < 0,0001$) et les lymphosarcomes (OR 4,2, $p < 0,05$) après ajustement par rapport à l'année de naissance.

Dans l'une des études cas-témoins portant sur l'incidence des cancers pulmonaires chez les salariés de la chimie, aucune association n'a pu être établie avec l'exposition au tétrachlorure de carbone (Bond *et al.*, 1986).

Dans une étude menée chez des résidents d'une vallée polluée par des solvants industriels pendant 10 ans, 4 cas de lymphome sont comptabilisés. Cependant, de nombreux solvants ont été identifiés ce qui ne permet pas de conclure (Capurro, 1973, 1979).

Aucun lien entre l'exposition au tétrachlorure de carbone et la survenue de cancer pancréatique n'a pu être établi (Kernan *et al.*, 1999).

Au cours de 4 études cas-témoin, il n'a pas été établi d'association entre l'exposition au tétrachlorure de carbone et la survenue de leucémies lymphoïdes chroniques (Linet *et al.*, 1987), de cancer du cerveau (Heineman *et al.*, 1994), de cancer du sein chez la femme (Cantor *et al.*, 1995) et de mélanomes intra-oculaires (Holly *et al.*, 1996). Enfin, au cours d'une autre étude cas-témoins, aucune association entre l'exposition au tétrachlorure de carbone et l'incidence de lymphomes non hodgkinien n'a été établie (Siémiatycki *et al.*, 1991).

Effets sur la reproduction et le développement

A notre connaissance, il n'existe pas de données disponibles chez l'homme. Deux études ont cherché à identifier les effets du tétrachlorure de carbone sur la fonction de reproduction.

Une étude réalisée chez le rat mâle a montré qu'une simple administration intrapéritonéale de tétrachlorure de carbone dans l'huile de noix de coco à raison de 2 378 mg/kg de poids corporel induit après 15 jours une augmentation pondérale de la glande pituitaire et une diminution pondérale des testicules et des glandes séminales.

L'examen histologique a montré une atrophie testiculaire et des anomalies de la spermatogenèse (Chatterjee, 1966). Une étude similaire réalisée chez le rat femelle montre la survenue d'atteinte du système de reproduction 10 jours après l'injection. Il s'agit de modification du rythme œstral, d'une diminution pondérale et de vascularisation des ovaires et de l'utérus, d'une augmentation pondérale de la glande surrénale et d'une diminution de la gonadotrophine pituitaire (Chatterjee, 1968).

Les études d'embryotoxicité et de tératogenèse ont montré que les effets observés suite à l'exposition au tétrachlorure de carbone étaient plus liés à une toxicité maternelle qu'à une atteinte de l'embryon ou du fœtus.

L'administration par gavage de rats femelles du 6^{ème} au 15^{ème} jour de la gestation aux doses de 0, 25, 50 ou 75 mg/kg/j de tétrachlorure de carbone en solution dans l'huile de maïs ou dans une solution aqueuse contenant 10 % d'EmulphorR induit une toxicité maternelle à la dose la plus élevée (75 mg/kg/j) (Narotsky *et al.*, 1997). Une résorption complète de la portée est observée pour l'exposition à 50 ou 75 mg/kg/j.

Une étude réalisée chez la souris exposée par voie orale aux concentrations de 82,6 ou 826,3 mg/kg de poids corporel pendant 5 jours consécutifs, à partir du 1^{er}, 6^{ème} ou 11^{ème} jour de la gestation, n'a montré d'effet ni chez la mère ni sur les différents paramètres de l'analyse néonatale (poids corporel, taille) ou de malformations post-partum (Hamlin *et al.*, 1993).

Lors de l'exposition par inhalation de rats femelles à des concentrations de 334 ou 1 004 ppm (214 ou 6 435 mg/m³), 7 heures par jour du 6^{ème} au 15^{ème} jour de la gestation, une diminution dose-dépendante de la consommation de nourriture et du poids corporel est observée chez les mères (Schwetz *et al.*, 1974).

Une hépatotoxicité (augmentation de l'activité ALAT), une diminution significative du poids corporel et de la taille du fœtus est rapportée. Aucune anomalie n'est notée lors d'un examen clinique rapide. Cependant, un œdème sous-cutané est observé chez les fœtus des mères exposées à la plus faible dose (334 ppm) (214 mg/m³) ainsi qu'une

augmentation statistiquement significative des anomalies du sternum (bipartite et retard d'ossification).

2.3.2.2. Diméthylformamide :

Le N,N-diméthylformamide (DMF) est un solvant utilisé dans la confection du cuir synthétique et du plastique ; c'est aussi le solvant de quelques médicaments vétérinaires.

L'absorption du DMF est bonne par toutes les voies, digestive, respiratoire, cutanée, intradermique et intramusculaire. Il est faiblement volatil c'est pourquoi la voie cutanée reste la principale voie de pénétration en milieu professionnel ; il peut engendrer de graves lésions cutanées en cas de contact prolongé, suivies d'une atteinte hépatique le plus souvent modérée. L'inhalation de vapeurs concentrées entraîne des signes d'irritation trachéobronchique ensuite une atteinte hépatique modérée. Les formes les plus graves d'atteinte hépatique aiguë ont été rapportées après ingestion ou injection suicidaire de DMF. Des décès par insuffisance hépatocellulaire aiguë ont été rapportés (INRS. Fiche toxicologique n° 69, 2000).

2.3.2.3. Ethanol

Une association entre les maladies du foie et la consommation d'alcool a été reconnue il y a plus de 200 ans (Smart et Mann, 1992). La toxicité de l'éthanol sur le foie dépend de la durée de l'alcoolisme, la quantité de l'apport quotidien d'alcool et de la nutrition des individus (Waluga et Hartleb, 2003). Le foie est particulièrement vulnérable aux dommages causés par des composés toxiques car il constitue une porte d'entrée dans la circulation systémique et dans les autres tissus (Eliot, 1999).

Métabolisme

L'éthanol est principalement oxydé en acétaldéhyde par l'alcool déshydrogénase cytosolique dont le coenzyme est le NAD, aux concentrations plus élevées par le cytochrome P450 2E1 microsomal dont le coenzyme est le NADP, et aussi par la catalase située dans les peroxyosomes.

Le cytochrome P450 2E1 joue cependant un rôle important dans la maladie alcoolique, d'une part en raison de son inductibilité par l'alcool, et d'autre part en raison de sa capacité à produire des radicaux libres. L'acétaldéhyde, composé très toxique, est détoxifié en acétate par l'acétaldéhyde déshydrogénase mitochondriale. L'acétate est ensuite oxydé en dioxyde de carbone et en eau dans les tissus périphériques (Figure 6) (Bin et Ramon, 2011).

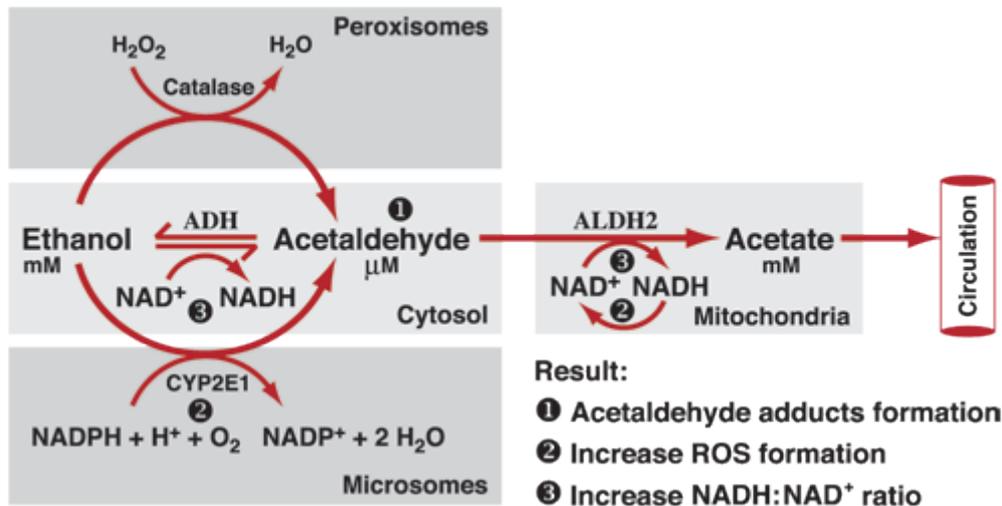


Figure 6 : Voies oxydatives du métabolisme de l'éthanol (Zakhari, 2006)

Effets toxiques

L'éthanol induit un certain nombre de changements métaboliques délétères dans le foie. Sa consommation abusive pour de longues durées conduit au développement de la stéatose, l'hépatite alcoolique et la cirrhose entraînant des changements dans le poids et le volume (Kumar et al., 2003).

L'acétaldéhyde formé à partir de l'éthanol joue un rôle majeur dans la genèse des lésions cellulaires, il peut se fixer à des protéines, des lipides ou à l'acide désoxyribonucléique, les molécules hybrides qui en résultent sont appelées adduits (Sorrell et Tuma, 1987). La formation de ces adduits contribuera à une lésion hépatique alcoolique, soit en altérant la fonction de la protéine affectée ou en stimulant le système immunitaire qui à son tour attaque les cellules saines du foie (Israel et al., 1988).

Le métabolisme de l'éthanol est fortement impliqué dans l'induction du stress oxydatif via le MEOS (microsomal ethanol oxidizing system) et en favorisant la production des enzymes cytosoliques : xanthine oxydase et aldéhyde oxydase (Sergent et al., 2001).

Le CYP2E1 est impliqué dans le stress oxydant en générant des ROS (Reactive oxygen species) tels que le radical anion superoxyde (O_2^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ces espèces attaquent les lipides membranaires, certaines protéines et provoquent une altération des récepteurs, des enzymes et des acides nucléiques, suscitant un risque de mutation et de cancérisation (Tsukamoto et al., 1995).

Des études ont reporté que l'alcoolisme aigu ou chronique engendre une augmentation du fer non héminique au niveau hépatique (Cederbaum, 2001 ; Koop, 1992). Le fer favorise le stress oxydatif en catalysant la conversion d'oxydants moins réactifs tels que l'ion superoxyde ou le peroxyde d'hydrogène en oxydants puissants tels que les radicaux hydroxyles (OH[·]) (Chapman *et al.*, 1983 ; Whitfield *et al.*, 2001).

Dans le foie, la quantité d'acides gras résulte d'un équilibre entre leur entrée par synthèse de novo et libération à partir des adipocytes et aussi leur sortie par oxydation et sécrétion sous forme de very low density lipoprotein (VLDL). L'éthanol va altérer l'ensemble de ces processus métaboliques et entraîne une stéatose hépatique (Silvain et Chagneau Derrode, 2006).

Un effet toxique direct de l'éthanol sur le trafic protéique a été démontré *in vitro* et *in vivo*. Les mécanismes d'endocytose sont altérés, surtout dans la région lobulaire hépatique périveinulaire là où l'alcool est le plus toxique. L'éthanol pourrait être à l'origine d'une accumulation protéique intrahépatique, à une diminution de la protéolyse lysosomiale, et également inhiber la synthèse de certaines protéines (Lakshman *et al.*, 1999).

Les endotoxines sont des constituants moléculaires majeurs de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Chimiquement, les endotoxines sont des lipopolysaccharides (LPS) et elles sont responsables des effets toxiques de l'infection bactérienne (Israel *et al.*, 1993).

Dans les conditions normales, des quantités infimes d'endotoxines peuvent passer à travers la muqueuse intestinale dans la circulation sanguine, cependant, l'ingestion d'alcool provoque la dysbiose entérique qui augmente la perméabilité intestinale aux endotoxines, ce qui induit leur accès à la circulation et au foie (Yan *et al.*, 2011). Après avoir atteint le foie, les endotoxines provoquent l'activation des cellules de Kupffer (Enomoto *et al.*, 2001).

Les lipopolysaccharides sont liés dans la circulation à la protéine de fixation des LPS, lipopolysaccharide binding protein (LBP), synthétisée par l'hépatocyte. Le complexe LPS-LBP a une haute affinité pour le récepteur CD14 situé sur les cellules de Kupffer.

La fixation du complexe LPS-LBP sur le récepteur CD14 entraîne l'activation du NF- κ B (nuclear factor-kappa B) et induit la synthèse et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires : TNF- α , IL-6, IL-1 et des prostaglandines telles que les PGE2 et les PGD2 (Kielian et Blecha, 1995). L'augmentation de la protéine CD 14 est détectée par chimioluminescence dans les cellules de Kupffer isolées de rats traités de l'alcool pendant deux semaines (Jarvelainen *et al.*, 1997).

Dans les cellules de Kupffer, le LPS interagit aussi avec le TLR4 (Toll-like receptor 4) pour activer la voie de signalisation MyD88 (Myeloid Differentiation Primary Response 88) conduisant à la production du stress oxydatif et des cytokines pro-inflammatoires (Zhao et *al.*, 2008 ; Petrasek et *al.*, 2011 ; Yin et *al.*, 1999 ; Hritz et *al.*, 2008).

La consommation d'alcool active également les compléments C3 et C5, qui activent ensuite les cellules de Kupffer via la liaison à leurs récepteurs sur ces cellules. L'activation du complément est suivie par la production du TNF- α et de l'induction de lésions des hépatocytes. (Nath et *al.*, 2011 ; Cohen et *al.*, 2010 ; Roychowdhury et *al.*, 2009).

Autres

D'autres produits employés en industrie peuvent entraîner une atteinte hépatique aiguë, à savoir : chloroforme, 1,2-dichloropropane, bromobenzène, phosphore blanc, arsenic... (Liste non exhaustive) (Conso , Hermouet . 1993).

2.3.3. Plantes

L'intoxication aiguë par le chardon à glu (*Atractylis gummifera*) se rencontre essentiellement en Afrique du Nord. La racine de la susdite plante, confondue avec des plantes comestibles comme les artichauts sauvages, est responsable d'hépatites fulminantes, avec une nécrose hépatocellulaire majeure. L'atteinte hépatique est précédée par des signes digestifs, une hypoglycémie évocatrice et une insuffisance rénale. Le traitement est symptomatique, l'évolution fatale n'est pas rare (David, Arditti-Djjane . 1999).

2.3.4. Champignons

L'intoxication phalloïdienne est à l'origine de la majeure partie des décès par champignons. Jusqu'à présent, il n'existe pas d'antidote apte d'inverser le pronostic, et ce sont les progrès de la réanimation symptomatique et de la transplantation qui ont le plus contribué à la réduction de la mortalité.

On a édicté la règle des six heures pour mieux prendre en charge les intoxications par champignons: On suspecte un syndrome phalloïdien quand le délai entre l'ingestion et l'apparition des premiers signes digestifs dépasse les 6 h ; on peut s'en passer de cette règle lors de la prise de champignons à plusieurs repas consécutifs ou durant le même repas d'un mélange d'espèces. La toxicité fongique est due aux amatoxines et phallotoxines, des toxines cellulaires thermostables, leur pénétration dans l'hépatocyte emprunte le système de transport des médicaments.

Chez l'homme, elles sont présentes dans le plasma durant les 24-48 premières heures, sont excrétées par la bile au 3^{ème} -5^{ème} jour et subissent un cycle entérohépatique ; l'élimination

est principalement urinaire sous forme inchangée durant les 72 premières heures. Elles agissent en inhibant l'ARN-polymérase de type II, avec comme conséquence une inhibition de la synthèse protéique, et la lyse cellulaire. Un mécanisme radicalaire a été récemment élucidé, mais sa contribution à la cytolyse reste à évaluer. Les espèces contenant des amanitines sont listées dans le tableau 2. Chez l'homme, la dose létale per os, d'alpha-amanitine est estimée à 0,1 mg/kg soit 30 à 50 g d'Amanite phalloïde, 100 g de Lépiotes ou 100 à 150 g de Galères (Faulstich , Zilker. 1994).

Tableau 2 : Espèces de champignons contenant des amatoxines

Genres	Nom latin	Nom vernaculaire
Amanite*	Amanita phalloïdes	Amanite phalloïde
	Amanitaverna	Amanite printanière
	Amanitavirosa	Amanite vireuse
	Amanitadecipiens	-
	A. ocreata et A. bisporigera (États-Unis)	-
Lépiote	Lepiotabrunneoincarnata	
	Lepiotabrunneolilacina	
	Lepiotahelveola	Lépiotes « brunes »
	Lepiotahelveoloides	
	Lepiotajosserandii	
	Lepiotapseudohelveola	
	Lepiotasubincarnata	
Galère	Galerinaautumnalis	Galère d'automne
	Galerinamarginata	Galère marginée
	Galerinavenenata	Galère vénéneuse
Pholiotina	Pholiotinafilaris	-

* Les amanites « mortelles » ont en commun la présence simultanée de lames blanches, d'un anneau blanc et d'une volve en sac blanche.

3. Les agents hépatoprotecteurs

Le foie assure un rôle clé de détoxification en chassant de l'organisme diverses toxines dont l'accumulation est particulièrement néfaste. Il est donc primordial d'apporter des nutriments antioxydants qui le protègent et stimulent la synthèse interne de glutathion, l'antioxydant hépatique crucial, de stimuler les fonctions hépatiques et booster les différents mécanismes de détoxification (Rhoades et Bell, 2009).

3.1. Chardon-Marie et Silymarine

Les Grecs de l'Antiquité connaissaient déjà les vertus thérapeutiques du chardon-Marie, *Silybum marianum* (L.), de la famille des Asteraceae, pour traiter les troubles hépatiques et biliaires. Pline l'Ancien recommandait de prendre le jus de la plante mélangé à du miel pour éliminer les excès de bile. Au XIX^e siècle, les médecins de l'école éclectique américaine l'ont utilisée pour traiter les troubles menstruels, les varices et les congestions du foie, de la vésicule biliaire et des reins.

En 1968, on isola de la plante un complexe flavonoïde essentiellement fait de silybine, de silychristine et de silydianine et auquel on donna le nom de silymarine, cette dernière est depuis considérée comme la substance active à qui on attribue les effets bénéfiques du chardon-Marie. C'est une parmi les substances hépatoprotectrices les plus puissantes. On s'en sert pour la prévention et le traitement de divers troubles liés au foie : hépatite, cirrhose, calculs biliaires, ictère et dommages hépatotoxiques. Elle est également utilisée pour décongestionner le foie en stimulant le flux biliaire.

La silymarine est un stabilisateur de membrane (inhibe les systèmes de transport membranaires des hépatocytes, rendant plus difficile l'absorption des toxiques), inhibe la peroxydation des lipides et augmente la captation des radicaux libres produits par les substances hépatotoxiques; elle contribue au maintien du pool glutathion responsable de la détoxification hépatique, réduit l'augmentation des transaminases et des phosphatases alcaline (Valenzuela et *al.*, 1989). Elle stimule l'activité de la polymérase A, donc augmente la synthèse des acides nucléiques ribosomiaux et le nombre de ribosomes dans les hépatocytes, ce qui accroît la biosynthèse enzymatique et stimule la capacité de régénération hépatique.

Elle inhibe la lipoxigénase, ce qui se traduit par une diminution de la formation des leucotriènes. Sa consommation régulière fournit une protection importante contre les inévitables radicaux libres et augmente en cultures cellulaires, les niveaux d'une importante enzyme antioxydante, la superoxyde dismutase (Ferenci et *al.*, 1989).

En Europe, cette plante entre dans la composition de plusieurs préparations pharmaceutiques destinées au traitement de divers troubles dyspeptiques d'origine hépatique et biliaire. La Commission Européenne a approuvé, en 1989 l'usage de l'extrait normalisé à 70 % de silymarine pour traiter les intoxications hépatiques et, comme adjuvant, l'hépatite et la cirrhose. En 2002, L'OMS reconnaissait sensiblement les mêmes usages.

En 2010 l'équipe Inserm U955, spécialisée dans l'étude des maladies du foie à Créteil a publié une étude *in vitro* démontrant que les extraits du Chardon-Marie inhibaient la RNA polymérase du virus de l'hépatite C.

En l'occurrence, on trouve le chardon-Marie dans plusieurs spécialités pharmaceutiques destinées au traitement de divers troubles hépatiques et biliaires : Phytopharma® Chardon Marie (43 mg), Arkocaps® Chardon Marie, Legalon®70 (sous forme de gélule à base d'extrait sec de Chardon Marie) en gouttes avec mélange d'autres plantes, Simepar-Mepha® (à base de silymarine provenant du Chardon Marie et des vitamines du groupe B).

Dans la plupart des essais cliniques, on a utilisé un extrait normalisé contenant de 70 % à 80 % de silymarine. Les extraits de chardon-Marie ont fait l'objet de très nombreuses études cliniques, notamment le produit Legalon®, ce dernier est commercialisé en France depuis 1974 et est disponible sous deux dosages 70 et 140 mg. Dans les hôpitaux on peut disposer d'une forme injectable dosée à 350 mg réservée au traitement symptomatique de l'intoxication par l'amanite phalloïde.

3.2. La bétaine :

L'anhydride de bétaine ou la triméthylglycine (TMG) est un composé quaternaire d'ammonium découvert dans le jus des betteraves à sucre. C'est un métabolite de choline et substrat dans une voie de réutilisation convertissant l'homocystéine en L-méthionine.

Elle est impliquée dans la fonction hépatique, la reproduction cellulaire, et la fabrication de la carnitine. La US Food and Drug Administration (FDA) a approuvé l'usage de la bétaine dans le traitement de l'homocystinurie. Elle baisse les niveaux d'homocystéine aussi chez les personnes atteintes de maladies cardiaques. Egalement proposée dans les troubles de la digestion et pour protéger le foie des sujets alcooliques (Junnila et *al.*, 1998).

3.3. Le glutathion :

Le glutathion reste toujours l'antioxydant le plus important pour le bon fonctionnement hépatique, il est primordial au bon déroulement des réactions de métabolisation de phases I et II que subissent les différents xénobiotiques. Il neutralise les radicaux libres résultant des

réactions de phase I de la dégradation des toxines, mais quand celles-ci arrivent en quantité tellement importante, on assiste à une déplétion de glutathion, si ses niveaux ne sont pas rapidement reconstitués, les processus de détoxification de la phase II n'auront pas lieu avec comme conséquences de graves réactions toxiques induites par les réactifs intermédiaires issues de la phase I (Loguercio *et al.*, 1992). Le glutathion est aussi impliqué dans la détoxification parce qu'il se lie à des toxines comme les métaux lourds, les solvants et les pesticides et les transforme en composés hydrosolubles susceptibles d'être facilement éliminés dans la bile ou les urines.(Czeczot *et al.*, 2006).

3.4. Le Chrysantellum americanum

L'extrait de *Chrysantellum americanum* renferme des flavonoïdes et des saponosides. Les premiers possèdent une activité hépatoprotectrice et lui confèrent des propriétés antioxydantes, les seconds renforcent l'effet des flavonoïdes en facilitant leur passage à travers les membranes cellulaires.

Cette plante exerce un effet cholérétique net, doux et prolongé, protège le foie contre l'intoxication au tétrachlorure de carbone et le parenchyme hépatique de la nécrose, stimule le fonctionnement du foie lui permettant ainsi d'éliminer l'alcool deux à cinq fois plus rapidement atténuant donc sa toxicité et enfin améliore les calculs salivaires et rénaux (Ferrara, 2013).

3.5. La N- acétyl-L- cystéine

La N-acétyl-L- cystéine est une forme estérifiée de la L-carnitine, un acide aminé métabolisé naturellement à partir de la lysine et de la méthionine, essentiellement au niveau hépatique.

Il s'agit d'un puissant antioxydant. Elle est utilisée pour traiter les surdosages ou les intoxications du paracétamol vu qu'elle augmente la production du glutathion. Une supplémentation en N-acétyl-L-cystéine apporte aussi du soufre pour les réactions de phase II de sulfo-conjugaison, elle protège aussi le foie des dommages que pourraient causer les produits finis de la glycation avancée et des effets d'une alimentation riche en graisse (Ellenhorn *et al.*, 1997), (Chyka *et al.*, 2000).

3.6. La vitamine C

La vitamine C neutralise les radicaux libres issus des réactions de la phase I de détoxification. Elle participe au catabolisme des substances toxiques, à leur élimination dans les urines et réduit la toxicité de métaux lourds en particulier le plomb dont elle diminue les niveaux sanguins en inhibant son absorption intestinale ou en stimulant son excrétion urinaire. Une déplétion en vitamine C déstabilise l'intégrité du transport des électrons des

cytochromes P450. En outre, la dégradation du cholestérol par hydroxylation qui se produit dans le foie nécessite la présence de vitamine C (Dawson et *al.*, 1999).

3.7. L'asparagine

Il s'agit du premier acide aminé qui a été isolé de l'asperge en 1806 mais on le retrouve aussi naturellement dans l'organisme. L'asparagine stimule l'élimination des toxines, surtout celle de l'alcool (DrugBank). Une étude a évalué les taux sanguins d'alcool en fonction du temps écoulé dans un groupe de sujets volontaires traité seulement avec de l'alcool et un autre ayant pris de l'alcool et supplémenté en asparagine. Les résultats ont indiqué que l'asparagine était capable d'accélérer le métabolisme de l'alcool ce qui a diminué l'éthanolémie. En fait, on a obtenu une diminution des concentrations de l'acétaldéhyde dans le sang de plus de 30 %, prévenant ainsi la toxicité de l'alcool.

Au niveau cellulaire, l'asparagine était à l'origine d'une diminution dose-dépendante de la cytotoxicité de l'alcool.

3.8. L'extrait de racine de Kudzu

Le kudzu renferme de la puérarine et de la diazine ou daïdzéine, des flavonoïdes qui contribuent à alléger les dommages consécutifs à la prise abusive d'alcool. Il agit en induisant l'activité de l'alcool déshydrogénase (ADH). Il a aussi une action sur la dépendance à l'alcool et aiderait à diminuer la consommation.

Une épreuve sur des rats et des hamsters a montré qu'une supplémentation en extrait de racine de kudzu réduisait le besoin de consommer de l'alcool (Scott et *al.*, 2005).

3.9. Le calcium D-Glucarate

C'est le sel de calcium de l'acide D-glucarique qui est naturellement présent en petites quantités dans l'organisme. Une supplémentation orale en calcium D-glucarate inhibe la bêta-glucuronidase, une enzyme produite par la microflore impliquée dans la phase II de détoxification du foie. La glucuronidation est la plus répandue et importante parmi les réactions de conjugaison de la phase II de la détoxification assurées par le foie. Lors de cette phase, les carcinogènes, les hormones stéroïdes et d'autres toxines liposolubles se lient dans le foie à l'acide glucuronique et sont ensuite excrétés (glucuronidation). Une supplémentation en calcium D-glucarate augmente la glucuronidation et, par suite, l'excrétion de substances toxiques. Pris sous forme de supplément nutritionnel, le calcium D-glucarate est décomposé de façon équilibrée en acide D-glucarique, D-glucaro-1,4-lactone et D-glucaro-6,3-lactone. La glucaro lactone est un inhibiteur direct de la bêta-glucuronidase (Walaszek et *al.*, 1997).

3.10. La diméthylglycine :

C'est un dérivé de la glycine, un acide aminé présent naturellement en quantités infimes dans les cellules. Appelé aussi vitamine B15 ou acide pangamique et malgré que sa structure chimique soit similaire à celle des vitamines de la famille B, il n'est pas considéré parmi les vitamines. Les cellules en produisent lors du processus de production de la méthionine.

Dans l'ancienne Union soviétique, le diméthylglycine a été largement utilisé pour traiter de nombreuses anomalies : addiction à l'alcool ou à des drogues, maladies hépatiques, empoisonnements chimiques.

La diméthylglycine atténue les symptômes de la « gueule de bois » et réduit le besoin de boire de l'alcool. Elle intervient dans le métabolisme hépatique en tant que donneur des groupes méthyles utiles à produire de la sulfur-adénosylméthionine (SAMe), indispensable au fonctionnement et à la régénération hépatique, mais aussi parce que la méthylation est une réaction courante de conjugaison. C'est aussi un puissant antioxydant qui protège les cellules de l'attaque des radicaux libres (Liet *et al.*, 2003).

3.11. La curcumine :

C'est le diféruoylméthane, principal pigment du curcuma (*Curcuma longa*) et un puissant antioxydant qui assure une protection efficace contre les lésions engendrées par les radicaux libres. Des travaux scientifiques menés en 1995 ont prouvé qu'une alimentation renfermant de la curcumine diminuait le stress oxydatif.

En plus, la curcumine stimule la synthèse du glutathion et ceci en renforçant la transcription des gènes pour la glutamate cystéine ligase, l'enzyme limitant le taux de synthèse du glutathion. De nombreuses études animales ont montré que la curcumine augmente l'activité des enzymes de phase II, telles la glutathion-S-transférase ou l'UDP glucuronyl transférase ce qui stimule l'élimination de carcinogènes potentiels (*Dickinson et al.*, 2003).

La curcumine protège le foie contre les effets nuisibles de nombreux produits chimiques : aflatoxine et alcool. Ainsi, lorsqu'on traite des souris avec de la curcumine après avoir été exposées au diéthylnitrosamine (inducteur de cancer du foie), le pourcentage d'entre eux développant un cancer chute de 100% à 38% (*Iqbal et al.*, 2003).

3.12. L'acide ellagique :

Puissant antioxydant polyphénolique disponible dans certains fruits surtout la grenade. Différents modèles expérimentaux ont déjà mis en évidence l'activité antioxydante de l'extrait de peau de grenade.

Le prétraitement, avec l'extrait de grenade, des rats exposés au tétrachlorure de carbone a pu protéger les niveaux des enzymes antioxydantes catalase, peroxydase et superoxyde dismutase (Yüce *et al.*, 2007). Il a été démontré que l'acide ellagique augmente les niveaux de glutathion chez des rats traités par de la cisplatine (puissant hépatotoxique), et protège d'autres contre les lésions oxydatives induites par la cyclosporine-A.

Différents essais sur l'animal ont bien montré que l'acide ellagique réduit la tumorigenèse rénale et hépatique chimiquement induite, protège le foie des lésions provoquées par le tétrachlorure de carbone, augmente la production de glutathion et diminue la peroxydation lipidique (Ahn *et al.*, 1996).

L'acide ellagique semble agir efficacement comme agent chélateur du fait qu'il peut interférer avec certains métaux comme le nickel en le chélatant et favorisant son excrétion. Administré à des rats exposés à du nickel, il inhibe de façon dose-dépendante les altérations biochimiques rénales et hépatiques (Ahmed *et al.*, 1999).

L'acide ellagique est un inducteur de la glutathion-S-transférase et peut se lier directement à certains toxiques, les neutralisant et favorisant leur excrétion.

3.13. L'extrait de racine de gingembre :

Des monoterpènes et des sesquiterpènes figurent parmi les constituants de la racine de gingembre. Les gingérols sont de puissants antioxydants, L'extrait de racine de gingembre aide à contrer la toxicité hépatique en accroissant la sécrétion biliaire : Lorsque l'on alimente des rats avec du gingembre, on remarque qu'il augmente significativement la cholestérol-7-hydroxylase, l'enzyme limitant le taux de synthèse des acides biliaires, stimulant ainsi la conversion du cholestérol en acides biliaires, à l'origine d'une élimination du cholestérol de l'organisme, d'autres études indiquent que le gingembre peut abaisser les niveaux du cholestérol en réduisant son absorption dans le foie. Associé à la silymarine, il combat efficacement l'hépatotoxicité induite par le tétrachlorure de carbone. Seul ou associé à la silymarine, il augmente les niveaux hépatiques de glutathion réduit. L'huile de gingembre induit dans le foie l'activité de l'aryl hydrocarbène hydroxylase (Hassan *et al.* 2003).

3.14. Le sodium R-lipoate :

C'est un sel d'acide R-lipoïque mais ayant une biodisponibilité beaucoup plus importante. L'acide alpha-lipoïque soutient le fonctionnement hépatique en neutralisant les radicaux libres et en favorisant la synthèse, la récupération et la concentration du glutathion au sein du foie (Suh et *al.*, 2004).

Des recherches montrent que notre agent pourrait accroître la synthèse du glutathion chez des animaux en augmentant l'expression de la gamma-glutamylcystéine, une enzyme limitant le taux de synthèse du glutathion et en augmentant l'absorption cellulaire de la cystéine, indispensable à sa synthèse. L'acide lipoïque est l'antioxydant qui booste le mieux les niveaux de glutathion intracellulaire, surtout au niveau hépatique, participant ainsi efficacement à la protection du foie contre le stress oxydant, il concourt aussi à ce rôle en augmentant ou maintenant les niveaux d'autres antioxydants, notamment ceux des vitamines C et E et de la CoQ₁₀. Il est inducteur des enzymes de phase II et favorise aussi l'excrétion biliaire de métaux lourds (Carlson et *al.*, 2007).

3.15. La cardiotrophine-1

Des chercheurs de l'université de Navarre ont découvert récemment les effets hépatoprotecteurs de la cardiotrophine-1, cette dernière est déjà réputée de pouvoir protéger les cellules cardiaques et certains neurones en cas d'hypoxie.

C'est une protéine liée structurellement et biologiquement aux cytokines de l'interleukine 6, fabriquée en quantité substantielle par le foie et sa production augmente quand le tissu hépatique est abimé (infection virale, apport d'oxygène réduit, etc.) ou après une résection d'une partie de l'organe. Les chercheurs ont constaté chez les animaux de laboratoire soumis à une résection de 90% du foie intervention suscitant le décès de 100% des animaux, qu'une injection de cardiotrophine-1 permet une régénération du foie restant, favorisant un taux élevé de survie postopératoire. En plus, ils ont noté que lors d'une inflammation grave du foie, l'administration de cardiotrophine protège les cellules hépatiques et évite leur destruction. La substance découverte se montre très prometteuse dans le traitement de nombreuses maladies hépatiques sévères, dans l'amélioration des conditions de transplants et la protection du foie restant après une résection. La cardiotrophine va être soumise à une série de tests cliniques afin d'évaluer son efficacité sur des patients atteints de maladies hépatiques graves (extrait du BE Espagne numéro 21 du 27/08/2003 rédigé par l'ambassade de France en Espagne).

3.16. Composition pharmaceutique à base d'hépatoprotecteur et de prébiotique

Composition pharmaceutique destinée au traitement et à la prévention de la récurrence de maladies hépatiques causées par une perturbation du métabolisme du cholestérol, choisies dans le groupe suivant : les maladies de la vésicule biliaire, surtout avec calculs cholestériques, la stéatohépatite alcoolique et non alcoolique, la cirrhose du foie biliaire primaire, la cholestérose de la vésicule biliaire, les lésions hépatiques causées par des médicaments et toxiques, la composition pharmaceutique étant utilisée de manière interne et comprenant en tant que substances actives un médicament hépatoprotecteur choisi dans le groupe suivant : les acides choliques, les acides chénodésoxycholiques, les acides désoxycholiques, les acides ursodésoxycholiques, les acides lithocholiques, les acides tauroursodésoxycholiques, les acides glycodésoxycholiques, les acides taurocholiques, les acides glycocholiques et le lactulose en tant que prébiotique, qui sont choisis en doses efficaces (Rudoy, Dorozhko, 2015).

3.17. Acide ursodésoxycholique

Acide biliaire naturel présent en quantité infime chez l'homme. Il augmente la sécrétion biliaire des acides biliaires endogènes, inhibe leur réabsorption active par l'intestin et diminue leur concentration sanguine.

Il s'agit d'un traitement dissolvant de la lithiase biliaire cholestérolique qui diminue la saturation de la bile en cholestérol. Cet effet thérapeutique relève de plusieurs mécanismes : diminution de l'absorption intestinale du cholestérol, augmentation de son catabolisme hépatique en acides biliaires via une augmentation de l'activité hépatique de la cholestérol 7 alpha-hydroxylase. En outre, l'acide ursodésoxycholique maintient le cholestérol biliaire sous forme soluble. Il est utilisé dans la prise en charge des lithiases biliaires, des hépatopathies cholestatiques, des cirrhoses biliaires primitives et des cholangites sclérosantes primitives (Vidal 2015).

3.18. Acide chénodésoxycholique

Acide biliaire produit par le foie, utilisé pour dissoudre les calculs biliaires.

La société australienne de biotechnologie Giaconda a testé un traitement pour l'hépatite C qui combine l'acide chénodésoxycholique avec le bézafibrate (Giaconda. "Communiqué de presse" . 5 Avril 2014).

4. *Nigella sativa*

4.1. Généralité sur la plante

Du latin *nigellus* "noirâtre", la nigelle fournit ses graines noires aromatiques communément connues sous le nom de cumin noir, black seed en anglais, *Habbat el baraka* ou encore *El habbah sauda* dans les pays arabes, *Sinouj* en Algérie (Ghedira, 2006). *Nigella sativa* L est une plante herbacée appartenant à la famille des Renonculacées (Guignard, 2001). C'est une herbe originaire du moyen orient, de l'Europe centrale et de l'ouest de l'Asie (Nickavar *et al.*, 2003 ; Tian *et al.*, 2006), elle est maintenant cultivée dans plusieurs régions du monde surtout dans le bassin méditerranéen et en Inde (Ghedira, 2006, Piras *et al.*, 2013). Elle se développe sur les terres semis arides (Antuono et Hamaza., 2002 ; Badary *et al.*, 2003). 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*... (Heiss *et al.*, 2011)

La plante est verte avant maturation, brunâtre après. Elle fleurit en juin/juillet. Ses graines sont largement utilisées comme épices de cuisson dans les préparations des sirops, en pâtisserie et boulangerie (Atta, 2003), ainsi qu'en médecine traditionnelle depuis des siècles, à travers le monde, contre une multitude de troubles (Piras *et al.*, 2013).

4.2. Description botanique de la plante

Nigella sativa est une plante annuelle herbacée de 30 à 60 cm de haut. Les feuilles pennatiséquées, divisées en lobes étroits, elles sont lancéolées à linéaires et présentent des onglets nectarifères (Bonnier, 1990 ; Ghedira, 2006). Les fleurs sont petites à pétales blanchâtres et sépales pétaloïdes et présentent de nombreuses étamines insérées sur le réceptacle (Ghedira, 2006). La plante est hermaphrodite dont le fruit est une capsule formée de 3 à 6 carpelles soudés entre eux jusqu'à la base des styles persistants (Bonnier, 1990). Chaque capsule contient plusieurs graines qui sont ovoïdes avec une face supérieure finement granuleuse et réticulée (Ghedira, 2006) (Figure 7).

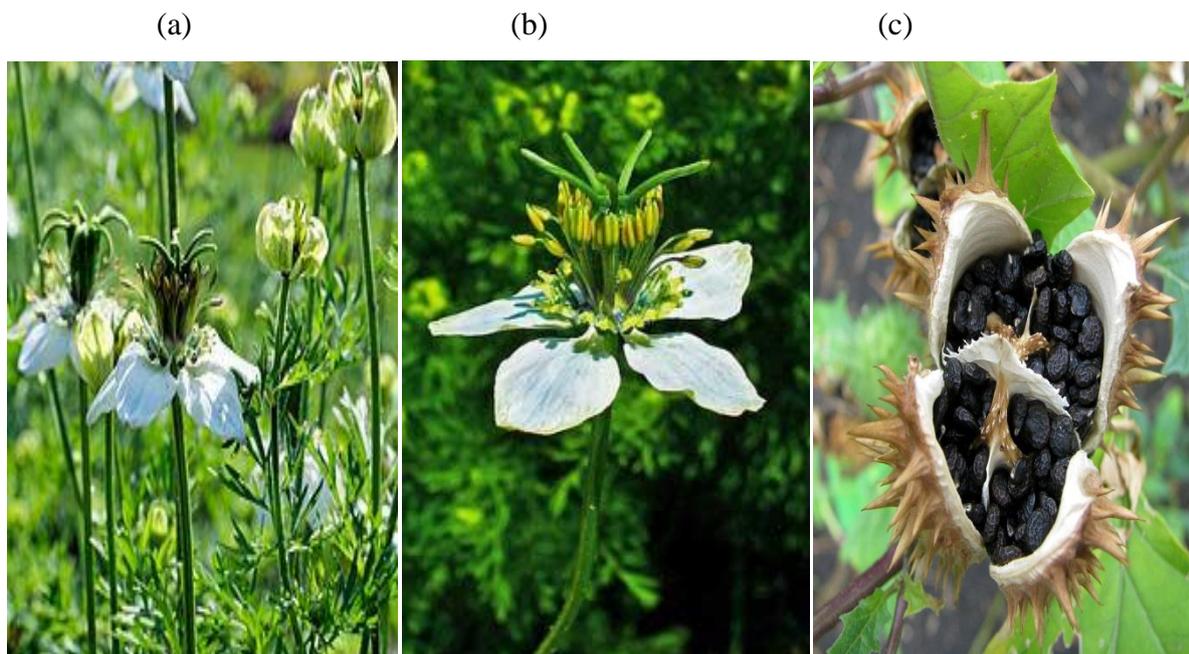


Figure 7 : *Nigella sativa*; (a) plante entière, (b) fleurs et (c) capsule renfermant les graines.

4.3. Propriétés pharmacologiques

4.3.1. Effet anti-inflammatoire

L'effet anti-inflammatoire de *Nigella sativa* a fait l'objet de plusieurs études: 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 agissent aussi sur la stimulation de la production des interleukines et améliore la phagocytose des cellules bactériennes par les macrophages (Haq et al., 1995).

Dans une autre étude, l'huile de *Nigella sativa*, la nigellone (polythymoquinone) et la 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 et réduisent donc les manifestations inflammatoires (El-Dakhakhny et al., 2002).

Ghannadi et al (2005) ont montré que les polyphénols de *Nigella sativa* disposent de propriétés anti-inflammatoires chez le rat et la souris dans le test de l'œdème de la pâte induit par le carraghénane, et montre des propriétés analgésiques dans le test de la formaline et de l'acide acétique. Le mécanisme par lequel l'huile fixe de *Nigella sativa* et la thymoquinone

exercent leurs effets anti-inflammatoires a été étudié, la thymoquinone s'est avérée être un puissant inhibiteur de la synthèse des eicosanoïdes notamment le thromboxane B2 et leucotriène B4 par l'inhibition respective des cyclooxygénase et lipoxygénase. Cependant, l'activité de l'huile fixe sur ces deux enzymes est plus importante que la thymoquinone elle-même ; l'activité anti-inflammatoire n'est pas donc entièrement due à la présence de la thymoquinone ; des acides gras insaturés de type C20 :2 semblent être impliqués (Houghton *et al.*, 1995 ; Gilani *et al.*, 2004).

4.3.2. Effet analgésique

Plusieurs auteurs ont étudié l'activité analgésique d'extraits ou de composés purs issus de *Nigella sativa*. Khanna *et al* (1993) ont démontré que l'huile fixe de *Nigella sativa* possède une importante action antinociceptive qui est due à la présence d'un principe opioïde. Cette action est antagonisée par la naloxone. Des études plus approfondies ont démontré que l'action antinociceptive peut également être engendrée par la thymoquinone via l'activation indirecte des récepteurs supraspinaux μ et κ (Abdel-Fattah *et al.*, 2000 ; Ali et Blunden, 2003).

L'extrait aqueux de *Nigella sativa* a été étudié pour ses activités anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique dans un modèle animal. Il s'est avéré qu'il exerce une action inhibitrice sur l'œdème induit par le carraghénane sur la patte de souris. L'extrait a également produit une augmentation significative du temps de réaction à la plaque chauffante chez la souris, prouvant un effet analgésique (Al-Ghamdi, 2001).

4.3.3. Effet antimicrobien

Les différents extraits des graines de *Nigella sativa* présentent un large spectre d'inhibition vis-à-vis de nombreuses souches bactériennes. L'huile essentielle même diluée à 1%, la dithymoquinone ainsi que l'extrait méthanolique exercent une importante activité antimicrobienne sur des germes Gram positif et Gram négatif, (Agrawal *et al.*, 1979 ; Aljabre *et al.*, 2005). L'huile de la Nigelle possède un pouvoir inhibiteur supérieur à celui de la gentamicine sur une vingtaine de souches de *Listeria monocytogenes* (Nair *et al.*, 2005). Différents extraits bruts issus de la graine ont été testés vis-à-vis de germes antibiorésistants (16 Gram négatif et 6 Gram positif), les alcaloïdes totaux et le décocté se sont révélés être les extraits les plus actifs, notamment à l'égard des bactéries à Gram positif (Morsi, 2000). De même, L'extrait méthanolique et hexanique possèdent aussi un effet inhibiteur très considérable sur *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* (Mashhadian et Rakhshandeh., 2005). L'huile fixe présente également une excellente activité antifongique, notamment sur *Aspergillus niger* (Agrawal *et al.*, 1979). Par ailleurs, l'extrait à

l'éther et la thymoquinone exercent une activité inhibitrice sur huit espèces de dermatophytes (Aljabre *et al.*, 2005). En plus des activités antibactériennes et antifongiques, l'huile de *Nigella sativa* possède aussi un effet antiviral vis-à-vis du virus de l'herpes : cytomégalovirus murin (MCMV) (Salem, 2005), des propriétés anti-cestodales et anti-nématiques comparables à celles de la pipérazine (antiparasitaire) (Agrawal *et al.*, 1979).

4.3.4. Effets sur le système immunitaire

Les graines de *Nigella sativa* présentent *in vitro* des propriétés immunopotentialisatrices des lymphocytes T humains (EL-Kadi *et al.*, 1987). Confirmées par Haq *et al.* (1995), qui ont montré que les graines activent la sécrétion d'IL-3 et augmentent la production d'IL-1 β par les lymphocytes T, ce qui indique un effet stimulateur sur les macrophages, soit direct ou via IL-1 β . Des études ultérieures conduites par les mêmes auteurs (Haq *et al.*, 1995) ont montré que les protéines isolées de la graine entière sont responsables d'effet stimulant sur la production de cytokine (TNF- α) ainsi que sur la prolifération des lymphocytes en culture.

4.3.5. Effets anticancéreux et antimutagène

Les graines de *Nigella sativa* ou leurs constituants présentent une action préventive des cancers et/ou réductrice de la cytotoxicité des médicaments antinéoplasiques usuels. La thymoquinone exerce *in vitro* et *in vivo* un effet inhibiteur de la carcinogenèse de l'estomac et du fibrosarcome induit par 20-méthylcholanthrène chez la souris (Badary *et al.*, 1999 ; Badary et Gamal, 2001). Par ailleurs, Kumara et Huat (2001) ont montré que l' α -hederine exerce d'importantes propriétés antitumorales chez la souris présentant un sarcome du poumon de Lewis ou la leucémie murine P388. De même, l'huile des graines de *Nigella sativa* réduit le potentiel fibrinolytique des cellules tumorales lié à leur phénotype de malignité. Cette action conduit à l'inhibition des invasions tumorales locales et de la métastase (Awad, 2005).

Iddamaldeniya et ses collaborateurs (2003) ont montré que le traitement des souris atteintes d'un cancer hépatique initié par diéthylnitrosamine (DEN), avec le décocté des graines de *Nigella sativa* pendant 10 semaines, réduit significativement le nombre de cellules atteinte/cm², ce qui indique que cet extrait a un effet protecteur contre ces cancers hépatiques induits par le DEN.

4.3.6. Effet hypoglycémiant

Plusieurs études ont indiqué que différents extraits obtenus à partir des graines ainsi que les composés phénoliques de l'huile essentielle de *Nigella sativa* 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). 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).

Dans une étude menée par Sobhi (2011) on a pu distinguer deux mécanismes différents selon lesquels l'huile de *Nigella sativa* agirait pour réduire l'hyperglycémie : il s'agit du processus postprandial et de l'action de l'huile sur le pancréas, notamment sur les îlots de Langerhans.

C'est la fraction polaire de l'huile totale qui est responsable de l'effet hypoglycémiant postprandial et sa fraction neutre qui est responsable de la régénération des îlots de Langerhans après leur destruction par la streptozotocine ce qui pourrait être un facteur important dans la relance de la production de l'insuline, ceci a été aussi prouvé dans quelques études, notamment celles de Kanter et ses collaborateurs (2003, 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).

4.3.7. Effet hépatoprotecteur

El-Beshbishy et ses collaborateurs (2010) ont illustré les améliorations histologiques et la correction des marqueurs hépatiques procurés par un extrait de *Nigella sativa* chez des rats femelles suite à leur intoxication par le tamoxifène. Nagi et son équipe (1999) ont validé l'effet hépatoprotecteur de la thymoquinone, principal composant de l'huile volatile de *Nigella sativa*, contre l'hépatotoxicité induite par le CCl_4 chez des souris albinos Swiss mâles, et ils ont suggéré que cet effet peut être médié par les propriétés antioxydantes combinées de la thymoquinone et de son métabolite dihydrothymoquinone .

Daba et Abdel-Rahman (1998); El-Mahmoudy et ses collaborateurs (2005); Meral et ses collaborateurs (2001) ont démontré que *Nigella sativa* diminuait la peroxydation lipidique induite et augmentait la capacité antioxydante du foie chez les lapins. L'effet de l'huile essentielle de *Nigella sativa* sur l'homéostasie et l'hépatotoxicité a été aussi démontré par Zaoui et ses co-équipiers (2002 a et b). La thymoquinone (1mM) testée sur des hépatocytes isolés réduit le largage des enzymes cytosoliques des hépatocytes : l'alanine transaminase (ALT) et l'aspartate transaminase (AST), après l'exposition des hépatocytes au tertbutyl hydroperoxyde (TBHP) (Daba et Abdel-Rahman, 1998).

4.3.8. Effets sur le système respiratoire

Les propriétés antitussives et antiasthmatiques des graines de *Nigella sativa* sont bien reconnues depuis des siècles faisant d'elle une des plantes les plus recommandées pour le traitement des maladies respiratoire, cette activité a été étudiée par un grand nombre de chercheurs. En 1993, 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.

Gilani et ses collaborateurs (2001) ont déduit que l'extrait brut méthanolique des graines de *Nigella sativa* a un effet spasmolytique et bronchodilatateur. Le traitement des cobayes préalablement exposés à des aérosols de l'acide citrique par différents extraits de *Nigella sativa* (extrait aqueux, extrait macéré et extrait décocté) montre un effet antitussif très important comparable à celui de la codéine (Boskabady *et al.*,2004). Les investigations d'autres chercheurs ont permis de prouver que le Nigellone (polythymoquinone) est un agent protecteur efficace contre l'asthme et la bronchite, en inhibant efficacement la libération de l'histamine (Gilani *et al.*,2004). L'action des graines de *Nigella sativa* sur le système respiratoire est probablement la résultante de plusieurs effets : cholinergiques (Boskabady et Shahabi, 1997), inhibition des récepteurs H1 de l'histamine (Boskabady et Shiravi,2000) et antagonisme du calcium (Gilani *et al.*, 2001, Boskabady et Shirmohammadi, 2002 ; Boskabady *et al.*,2004).

4.3.9. Effets sur le système gastro-intestinal

Les graines de *Nigella sativa* sont largement utilisées dans la médecine traditionnelle pour le traitement des désordres gastro-intestinaux, L'extrait aqueux des graines réduit de 36% l'indice d'ulcère induit par l'acide acétylsalicylique (aspirine) et diminue l'activité peptique et la production d'acide chez le rat (Ghedira, 2006). Il a été démontré que l'administration de L'huile fixe à raison de 0.88g/kg/jours pendant deux semaines augmente la mucine gastrique et le contenu en glutathion et avec diminution du taux de l'histamine, sans affecter l'acidité libre ni le suc gastrique (EI-Dakhkhny *et al.*, 2000).

Cette huile ainsi que la thymoquinone protègent contre les lésions gastriques induites par le processus d'ischémie-reperfusion, et ceci grâce à leur pouvoir antiradicalaire (El-Abhar *et al.*, 2003). L'extrait alcoolique des graines de *Nigella sativa* présente également une activité antiulcéreuse qui a été attribuée aux flavonoïdes qu'il contient (Rajkapoor *et al.*,2002).

De même, l'extrait méthanolique montre un effet spasmolytique ce qui appuie l'utilisation traditionnelle de la Nigelle dans le traitement des diarrhées (Gilani *et al.*, 2004).

4.4. La fraction insaponifiable

La fraction insaponifiable ou « insaponifiables » d'un corps gras donné comprend des composés tels les stérols, les tocophérols, les alcools aliphatiques supérieurs, les pigments et les hydrocarbures naturels, qui, après hydrolyse basique (saponification), sont très peu solubles dans l'eau et solubles dans les « solvants des graisses » tels que l'éther diéthylique, hydrocarbures aliphatiques, solvants chlorés, hydrocarbures aromatiques. Elle représente environ de 0,2 à 2% d'un lipide non raffiné, la moyenne se situant aux environs de 1%, bien que l'on rencontre des proportions pouvant aller exceptionnellement jusqu'à 10% (Lavoisier, Paris. Lipides et corps gras alimentaires, édition technique et alimentaire).

Les constituants chimiques de l'insaponifiable peuvent être extrêmement variés en nature et en proportions. Ce sont des hydrocarbures divers (hydrocarbures aliphatiques saturés et insaturés, triterpéniques, ou tétraterpéniques, ...), des composés terpéniques (alcools triterpéniques, 4 méthyl-stérols et des stérols,...), des alcools gras, des vitamines liposolubles. Ils confèrent souvent aux corps gras certaines propriétés pharmacologiques et cosmétologiques spécifiques et rentrent dans la composition de laits démaquillants, de soins restructurants et de crèmes nutritives contre le vieillissement. Ces composés insaponifiables sont aussi bien recommandés dans l'alimentation qu'en médecine, pour leurs activités anticancéreuses et/ou anti-inflammatoires. (Didier Bereau « Huiles et fractions insaponifiables de huit espèces de palmiers amazoniens », thèse de doctorat, 2001, 61, 68 p.)

Les insaponifiables des huiles végétales sont considérés comme antioxydants naturels. Ils sont capables de minimiser l'oxydation des huiles pendant le stockage. La méthode d'extraction influe sur la teneur en insaponifiables, en effet l'huile de *Nigella sativa* extraite par solvant est plus riche en insaponifiables que celle extraite par pression à froid (tableau 3). Cette variation est en rapport avec la potentialité du solvant pour extraire la plupart des substances associées aux lipides, y compris phospholipides, stérols, vitamines liposolubles, glucides et pigments (Atta, 2003). Les insaponifiables d'une huile végétale la caractérisent très précisément et en font un précieux produit actif. Leur quantité présente dans l'huile est faible (environ 2% dans la plupart des huiles qui en contiennent), mais ils sont très nombreux et variés. On décrit les insaponifiables d'une huile en nommant ses vitamines, ses polyphénols, et ses phytostérols (Julien Kaibeck, Les huiles végétales, c'est malin. 2013, 256 p.)

Tableau 3 : Teneur en insaponifiables de l'huile de *Nigella sativa* égyptienne (Atta, 2003 ; Cheikh-Rouhou et al., 2007).

Huile Egyptienne	Extraction par solvant	Extraction à froid
Insaponifiables (%)	1,81	1,0

4.5. Tocophérols

Les huiles et les corps gras, au contact de l'oxygène, sont susceptibles de dégradations oxydatives. Ce phénomène se déroule spontanément en 2 étapes : les chaînes grasses insaturées fixent l'oxygène de l'air en formant des peroxydes, puis ceux-ci instables, évoluent en formant des produits d'oxydation, de dégradation et de polymérisation. Ils sont alors indésirables aussi bien en raison de leurs effets physiologiques néfastes qu'à cause des modifications de saveur et d'odeur des huiles qu'ils entraînent.

Les antioxydants sont donc des molécules oxydables qui, en agissant comme donneurs d'hydrogène vis-à-vis d'un radical hydroperoxyde, interrompent la réaction en chaîne de formation des peroxydes. Ils sont pour la plupart synthétiques (hydroquinone, pyrogallol, acide gallique et gallate,...) et sont rajoutés aux huiles dans l'industrie alimentaire. Mais ils peuvent être présents à l'état naturel dans les huiles végétales (vitamine E, polyphénols de l'olivier et du chêne, sésamol, flavonoïdes, certaines huiles essentielles,...) (Didier Bereau « Huiles et fractions insaponifiables de huit espèces de palmiers amazoniens », thèse de doctorat, 2001, 81p.)

Les huiles peuvent renfermer une quantité plus ou moins importante de vitamines liposolubles. Plus particulièrement, la vitamine E, présente dans tous les lipides naturels sous différentes formes moléculaires, est constituée des tocophérols et des tocotriénols.

C'est l'antioxydant majeur des milieux lipidiques (huiles, membranes biologiques et lipoprotéines). Les tocophérols et tocotriénols sont des composés aromatiques possédant un noyau chromanol (l'atome de carbone 6 porte un groupement hydroxyle) substitué par une chaîne à 3 unités isopenténique condensées. Cette chaîne peut être saturée dans le cas des tocophérols et triinsaturée dans celui des tocotriénols ; les autres substituants définissant les vitamines α , β , γ ou δ . (Figure 8).

Les tocophérols, plus présents que les tocotriénols, quoiqu'en fraction mineure, sont intéressants en raison de leurs pouvoirs antioxydant et aussi vitaminique principalement attribuables à l' α tocophérol (vitamine E). Cette vitamine, dont les propriétés biologiques sont nombreuses, est utilisée dans plusieurs domaines notamment en cosmétologie, et dans plusieurs domaines relevant de la médecine : cardiologie, cancérologie et gériatrie. Elle protège les acides gras insaturés de la membrane des cellules, et plus généralement contre les maladies cardiovasculaires, le cancer, les atteintes de la cataracte, etc. Elle est souvent utilisée dans sa forme isolée comme conservateur dans les huiles végétales afin de prolonger la durée de vie en rayon de celles-ci, évitant qu'elles ne se dégradent trop vite au contact de l'air, de la lumière ou de la chaleur (Sebei, et *al.*, 2007).

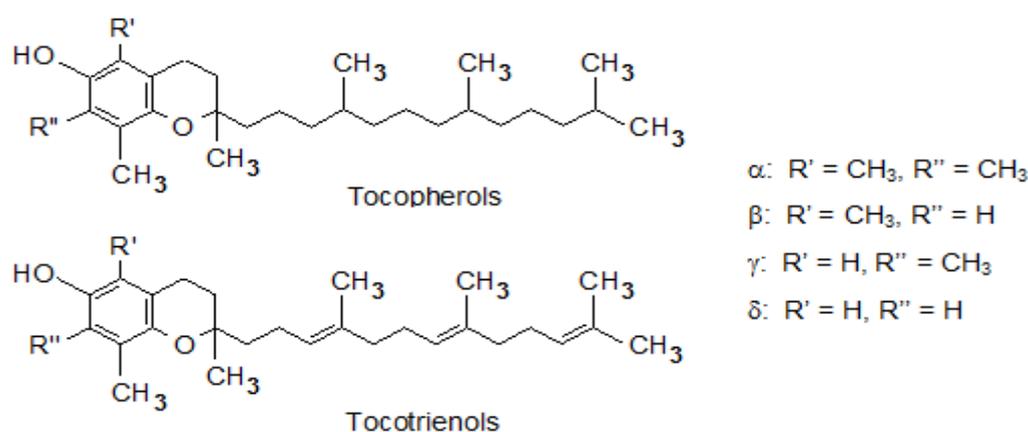


Figure 8 : Structures chimiques des tocophérols et tocotriénols
(Lampi, 2011)

Matériel et méthodes

1. Matériel biologique

1.1. Modèle animal

Dans cet essai, on s'est servi de rats wistar mâles de poids variant de 180 à 220 g. Les animaux ont été gardés en phase d'adaptation pendant deux semaines avant d'entamer l'expérimentation. On les a dispatché en groupes de six dans des cages, l'alimentation consistait en des granulés fournis par l'office national des aliments de bétail (ONAB) à Bejaia. Leur boisson est l'eau *ad Libitum*. L'épreuve a été réalisée dans des conditions de température variant entre 20 et 24 °C, d'humidité de 50 % et d'un cycle d'éclairage de 10h/14h.

1.2. Graines

Les graines de *Nigella sativa* utilisées ont été achetées chez un herboriste à Sétif. Elles ont été cultivées dans la région du Sud – Ouest précisément dans la région de Béchar. Les graines sont de couleur noire foncée, aromatiques, de forme ovoïde 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 validée par Dr. Nacira Boulachheb (Laboratoire de Biologie végétale, Département de Pharmacie, Université de Sétif 1). La figure 9 illustre la morphologie des graines de *Nigella sativa* utilisées.



Figure 9: Photographie des graines *Nigella sativa* utilisées

2. Extraction et caractérisation

2.1. Extraction de l'huile totale de *Nigella sativa*

L'extraction de l'huile totale des graines de *Nigella sativa* est réalisée par soxhlet. La première étape d'extraction est effectuée par le méthanol (1:5; M/V) durant 4 heures, suivie par une évaporation du solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif Buchi, on a ainsi obtenu un extrait de couleur vert foncée. L'extrait méthanolique est mélangé dans une ampoule à décanter avec l'hexane (200 ml). Après agitation, deux phases ont été obtenues : une phase méthanolique qui apparaît en dessous et une phase hexanique contenant les lipides, cette dernière phase a été récupérée et l'hexane a été évaporé à 35°C. L'extrait résultant constitue l'huile totale des graines de *Nigella sativa* caractérisée par une couleur verdâtre. La Figure 10 résume les différentes étapes d'extractions.

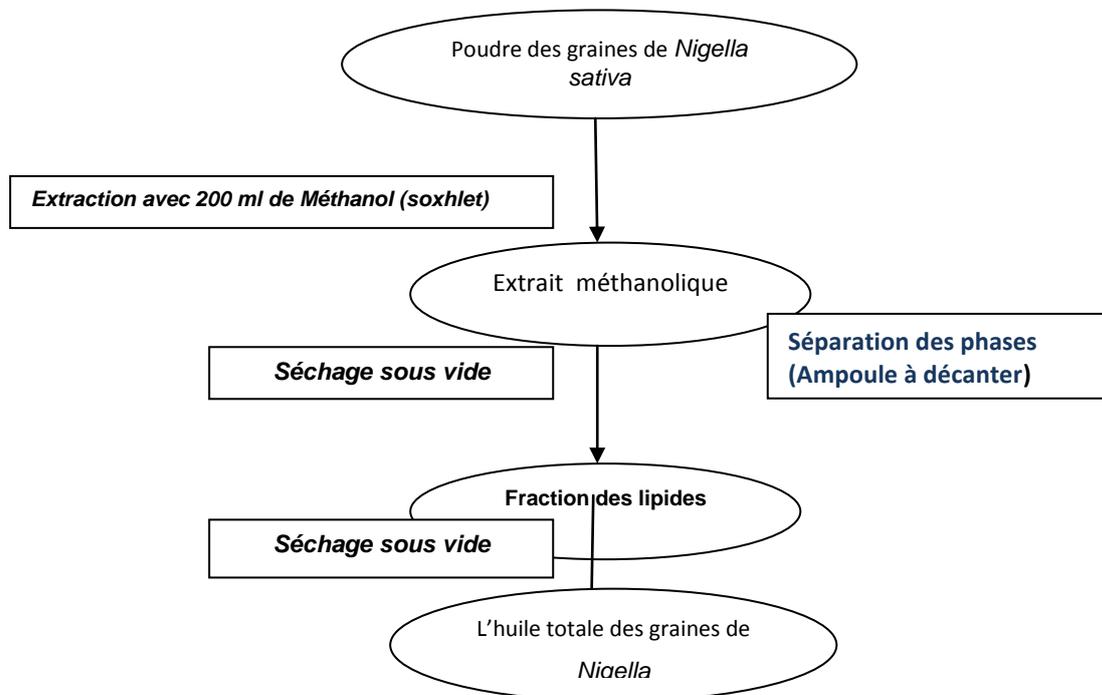


Figure 10: Schéma d'extraction de l'huile totale à partir des graines de *Nigella sativa* (Sobhi. 2014)

2.2. Extraction des insaponifiables à partir de l'huile de *Nigella sativa*

L'extraction des insaponifiables à partir de l'huile totale des graines de la plante médicinale *Nigella sativa* a été réalisée selon les méthodes standardisées de la pharmacopée européenne (édition 5.0). En bref, le procédé expérimental est le suivant :

Dans un ballon de 250 ml muni d'un réfrigérant, nous avons introduit 5 g de l'huile totale des graines de *Nigella sativa*, auxquels nous avons ajouté 50 ml de solution alcoolique d'hydroxyde de potassium 2 M. Le mélange est chauffé au bain marie pendant 1 heure et sous agitation circulaire. Après refroidissement à une température inférieure à 25°C, le contenu est transvasé dans une ampoule à décantation et additionné de 100 ml d'eau. Le mélange est lavé (3 x 100 ml) par éther de pétrole 40-60°C. 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 initialement avec 40 ml d'une solution d'hydroxyde de potassium à 30 g/l ensuite avec 40 ml d'eau. 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 insaponifiables sont déterminés par la formule :

Insaponifiable % = $100 \frac{a}{m}$ où **a** est la masse du résidu et **m** est la masse de l'échantillon.

2.3. Détermination de l'alpha-tocophérol par chromatographie sur couche mince (CCM)

L'analyse de l'alpha-tocophérol par chromatographie sur couche mince a été réalisée selon le protocole standard de la pharmacopée européenne, 8^{ème} édition (04/2013 : 1257, page 3680) et appliquée au laboratoire du service de Chimie Thérapeutique et de Pharmacognosie (Faculté de Médecine et de Pharmacie, Mons, Belgique).

- Conditions de chromatographie sur couche mince

Une plaque de CCM Gel de silice 60 F254 a été utilisée comme phase stationnaire. La phase mobile est constituée d'un mélange d'éther et de cyclohexane (20:80 V/V), le dépôt de 50 µl de chacun des deux extraits (huile totale et insaponifiables) et du standard (alpha-tocophérol SIGMA) a été effectué en utilisant un automate, le ATS4 (Automatic TLC Sampler 4). Après migration et séchage de la plaque, la détection a été faite à l'aide d'une lampe UV à 254 nm. Ensuite; on a procédé à la révélation par la vanilline. Le réactif est préparé en faisant dissoudre 1 g de la vanilline dans 100 ml d'acide sulfurique.

- Préparation des solutions

Le standard (alpha-tocophérol SIGMA) et les solutions des échantillons à analyser (huile totale et insaponifiables) sont préparés avec une concentration de 10 mg/ml de cyclohexane.

2.4. Détermination de l'alpha-tocophérol par chromatographie liquide de haute performance (HPLC)

- Conditions de la chromatographie liquide de haute performance

L'appareil utilisé est un instrument WATERS, doté d'une pompe modèle 515, d'un Photodiode Array Detector et d'un injecteur manuel. L'analyse est réalisée par une colonne (Atlantis®, Dc18 5 µm, 4,6 X 250 mm). La phase stationnaire est formée d'octadecylsilyl silica gel alors que la phase mobile est constituée d'acétonitrile (100%) au débit de 1,5 ml/min et le volume d'injection est de 20 µl. L'étude a été établie en mode isocratique.

- Préparation des solutions

La solution témoin utilisée est l'alpha-tocophérol SIGMA, Pcode: 1001 404892 T3251 -5G, CAS : 10191-41-0 ; à une concentration de 1 mg/ml d'isopropanol.

Les solutions des échantillons à analyser ont été préparées avec une concentration de 1 mg/ml d'isopropanol. L'analyse par HPLC est réalisée directement sans aucun traitement supplémentaire des échantillons.

2.5. Dosage des composés phénoliques de l'huile totale et des insaponifiables

La teneur en composés phénoliques des différents extraits des graines de *Nigella sativa* a été estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu selon (Li *et al.*, 2007). Elle est basée sur la réduction en milieu alcalin du phosphotungstique (WO_4^{2-}) et du phosphomolybdique (MoO_4^{2-}) du réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques. La réduction de ces composés conduit à la formation de produits de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (Georgé *et al.*, 2005).

Brièvement, 1 ml de réactif de Folin (10 fois dilué) est ajouté à 200 µl d'échantillon ou standard (préparés dans le méthanol) avec des dilutions convenables, Après 4 min, 800 µl d'une solution de carbonate de sodium (75 mg/ml) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 h d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesurée à 765nm. La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec de l'acide gallique (0-160 µg/ml) et est exprimée en µg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (µg EAG/g d'extrait).

2.6. Dosage des flavonoïdes de l'huile totale et des insaponifiables

La méthode du trichlorure d'aluminium (Baharun *et al.*, 1996) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits de *Nigella sativa*. À 1 ml d'échantillon ou standard (préparés dans le méthanol) est ajouté 1 ml de la solution d'AlCl₃ (2% dans le méthanol). Après 10 minutes de réaction, l'absorbance est lue à 430 nm. La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec de la quercétine (0-20 µg/ml) et est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (µg EQ/g d'extrait).

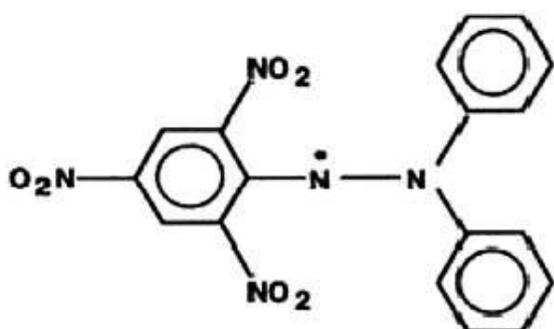
3. Etude de l'activité antioxydante *in vitro*

3.1. Piégeage des radicaux libres

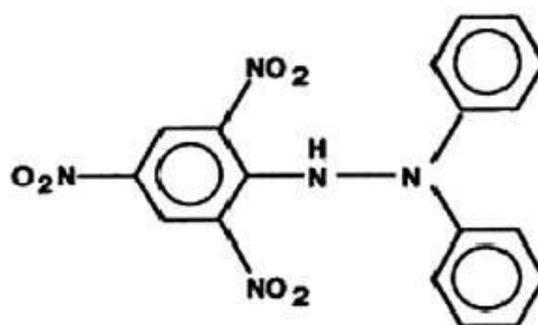
3.1.1. Détermination de l'activité scavenger du radical DPPH

Dans ce test les antioxydants réduisent le DPPH (**1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl**) ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphényl picryl-hydrazine (Mansouri *et al.*, 2005) dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Sanchez-Moreno, 2002)(figure 11). La solution de DPPH (5 mM) a été préparée dans du méthanol ; 2,45 ml des solutions d'extraits ou standards (α -tocophérol) sont ajoutés à 50 µl de DPPH, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517 nm. L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

$$\% \text{ d'activité antiradicalaire} = [(\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}) / \text{Abs contrôle}] \times 100$$



1: Diphenylpicrylhydrazyl (free radical)



2: Diphenylpicrylhydrazine (nonradical)

Figure 11 : Le radical DPPH et sa forme stable (Sagar et Singh., 2011)

3.1.2. Détermination de l'activité scavenger du radical ABTS

L'activité scavenger du radical ABTS a été mesurée en utilisant le protocole de Re et ses collaborateurs (1999).

Le radical libre ABTS présente une coloration bleu vert sombre, lorsqu'il est piégé par les substances antioxydantes, la forme réduite confère à la solution une coloration jaune pale, le virage vers cette coloration et l'intensité de la décoloration dépendent de la nature, la concentration et la puissance de la substance antiradicalaire (figure 12).

On a créé le radical ABTS en faisant réagir la solution ABTS (7 mM) avec du persulfate de potassium (2,45 mM), on l'a laissée à l'obscurité pendant 16h et à température ambiante. Avant son utilisation, 2 ml de cette solution d'ABTS ont été dilués avec 80 ml de méthanol pour obtenir une absorbance de 0,7 à 734 nm. 1 ml de cette solution diluée (ABTS, méthanol) est ajouté à un volume de 50 µl de chacune des solutions d'extraits de *Nigella sativa* (HT et FI). Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 734 nm. Tous les tests ont été réalisés en trois répliques.

Le pourcentage de l'activité scavenger du radical ABTS est calculé comme suit :

$$\text{PI (radical ABTS)} = (A_s - A_1) / A_0 \times 100$$

PI: Pourcentage d'inhibition du radical ABTS

A_s: Absorbance du blanc (contenant seulement l'ABTS)

A₁: Absorbance de la solution d'ABTS contenant l'extrait de plante

A₀: Absorbance du solvant de resuspension dans la solution d'ABTS

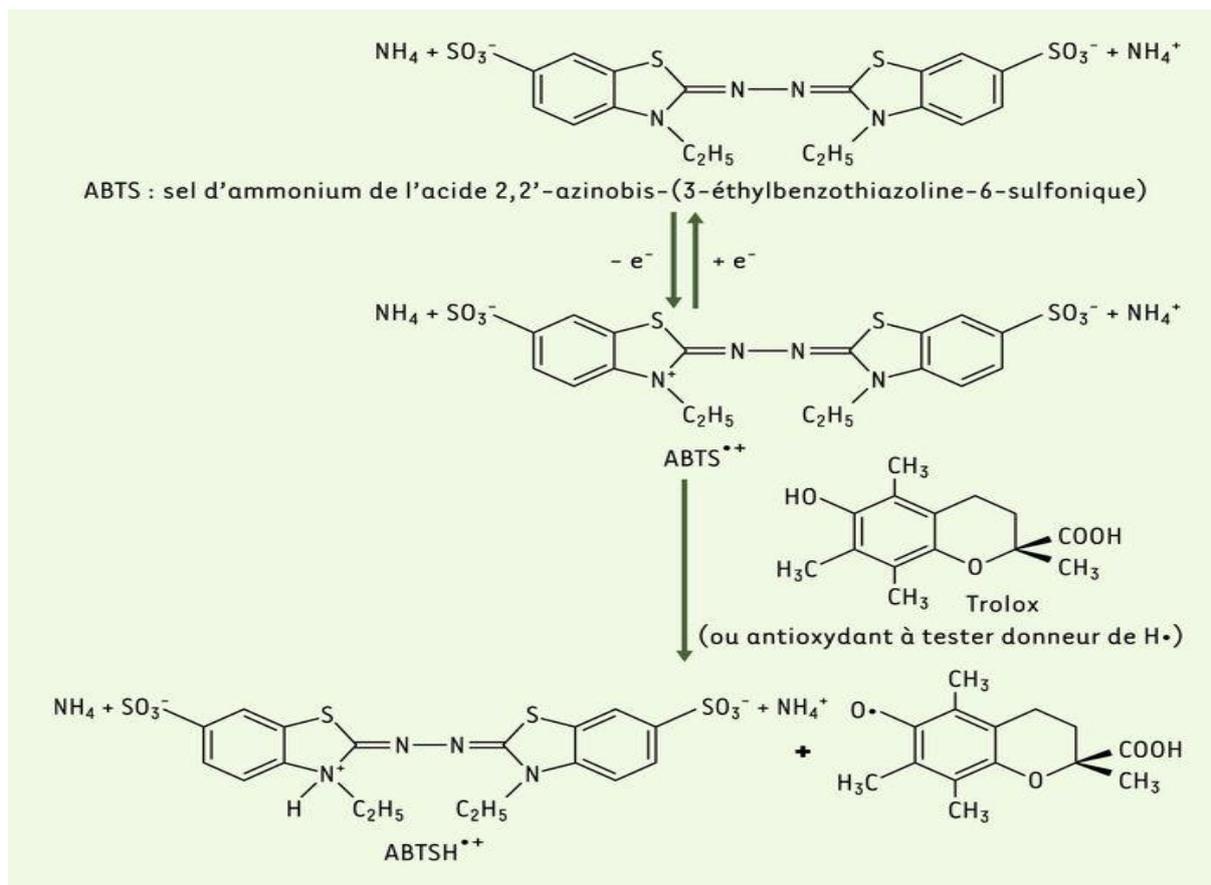
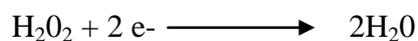


Figure 12 : Formation et piégeage du radical ABTS^{•+} par un antioxydant donneur de H• .
 (Marc *et al.*, 2004)

3.1.3. Détermination de l'activité scavenger du radical H₂O₂

La capacité de nos échantillons à piéger le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) a été déterminée selon la méthode décrite par Ruch et ses collaborateurs (1989) et qui est basée sur l'absorption du H₂O₂ en UV, son principe est de neutraliser le peroxyde d'hydrogène par un antioxydant facilitant sa décomposition en molécules d'eau selon la réaction suivante :



On a préparé une solution H₂O₂ (40 mM) dans un tampon phosphate (0,02 M) (pH=7,4), à 1,2 ml de cette solution, sont ajoutés 2 ml de standard ou d'extrait déjà préparés dans du méthanol. Après une incubation de 10 min à température ambiante, on lit l'absorbance à 230 nm. Pour le blanc, il a été préparé de la même façon sauf pour le tampon qui ne contient pas de H₂O₂ et avec les mêmes concentrations que les standards. Tous les tests ont été réalisés en trois répliques.

Le pourcentage de l'activité scavenger du radical H₂O₂ est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'activité scavenger du H}_2\text{O}_2 = (A_{\text{con}} - A_{\text{test}}) / A_{\text{con}} \times 100$$

A_{con} : l'absorbance du contrôle qui consiste en la solution du H₂O₂

A_{test} : l'absorbance du H₂O₂ en présence du standard ou de l'extrait.

3.1.4. Détermination de l'effet scavenger du radical hydroxyle OH[•]

Cet essai est effectué selon la méthode de Smirnov et Cumbes (1989), le principe est basé sur la génération du radical hydroxyle OH[•] dans le milieu réactionnel à travers la réaction de fenton. Le radical hydroxyle ainsi produit réagit avec le sodium salicylate pour fournir le complexe hydroxyle salicylate.



Le volume final du milieu réactionnel est 3ml, ce dernier comporte 1 ml de 1,5 mM de sulfate ferreux FeSO₄, 0,7 ml de 6 mM de peroxyde d'hydrogène H₂O₂, 0,3 ml de 20 mM de sodium salicylate et 1 ml des différentes concentrations de L'huile totale et de la fraction insaponifiable. Après incubation à 37°C durant une heure, l'absorbance du complexe hydroxyle salicylate est mesurée à 562 nm. Le pourcentage d'inhibition de OH[•] est calculé selon la formule suivante :

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

A₀: l'absorbance du contrôle (sans extrait)

A₁: l'absorbance en présence de l'extrait

A₂: l'absorbance sans sodium salicylate

3.2. Détermination de L'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique

L'activité antioxydante totale des extraits de *Nigella sativa* est déterminée in vitro selon la méthode de Mitsuda *et al.*, (1996). L'oxydation des lipides polyinsaturés en présence d'oxygène est un processus radicalaire de réactions en chaîne connu sous le nom de peroxydation lipidique. Au cours de l'oxydation de l'acide linoléique, des peroxydes sont formés, ils oxydent le Fe²⁺ en Fe³⁺. Ces derniers ions forment un complexe avec le thiocyanate, le thiocyanate ferrique a une absorbance maximale à 500 nm.

Dans un tube, 1 ml d'éthanol pur est ajouté à 10 mg de l'extrait. Ensuite, 25,1 mg de l'acide linoléique puis 2 ml de tampon phosphate (0,05 M, pH=7) et 1 ml d'eau distillée y sont ajoutés. La solution ainsi préparée est incubée à 40°C à l'obscurité.

Après 24h, Un volume de 25µl de cette solution est introduit dans un autre tube à essai et 2,4 ml d'éthanol 75% sont ajoutés. 25µl de thiocyanate d'ammonium sont additionnés par la suite. Les tubes sont mis à l'obscurité pendant 3 minutes.

Après cette courte incubation, On ajoute au mélange 25µl de FeCl₂ 0,02 M dans HCl à 3,5% et l'absorbance est lue immédiatement à 500 nm. Le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique est calculé selon l'équation suivante:

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

Abs_c : absorbance du contrôle.

Abs_e : Absorbance de l'échantillon à tester.

3.3. Test d'hémolyse oxydative

Le test d'hémolyse a été effectué suivant le protocole de Tramer et ses collaborateurs (2012). Ce test est utilisé afin d'évaluer la cytotoxicité des extraits in vitro. Brièvement, les extraits sont préparés dans du DMSO préparé à 10% dans de l'eau physiologique. 250 µl de la solution d'extrait sont ajoutés à 250 µl de la solution érythrocytaire. Le contrôle positif utilisé est le Triton X-100 (1%) donnant un pourcentage d'hémolyse de 100%. Les tubes sont incubés pendant une heure de temps à 37°C puis centrifugés à 9000g pendant 5 min, on récupère le surnageant pour lire l'absorbance à 415 nm.

Le pourcentage d'hémolyse est calculé à partir de la relation suivante :

$$\% \text{ d'hémolyse} = (A_E / A_T) \times 100$$

A_E : Absorbance de l'échantillon

A_T : Absorbance du Triton X-100

4. Etude de l'effet de *Nigella sativa* sur l'hépatotoxicité induite par le CCl₄

4.1. Induction de l'hépatotoxicité chez le rat par le tétrachlorure de carbone

L'hépatopathie expérimentale est obtenue par injection sous cutanée d'une dose massive de CCl₄. La dose retenue est égale à 3 ml CCl₄/Kg p.c. de rat. Pour des commodités expérimentales, le CCl₄ est dissous dans de l'huile d'olive (Brai et al., 2014).

4.2. Administration des extraits de *Nigella sativa*

L'huile totale (HT) est administrée à raison de 400 mg/Kg p.c. de rat quant à la fraction insaponifiable (FI) est dissoute dans de l'huile de tournesol (Sánchez et al. 2013) et administrée à raison de 20 mg/Kg p.c. de rat, soit 5% de la dose de HT. Les traitements sont réalisés sur une période de 10 jours, par gavage, journallement à la même heure, ils se font 30 mn avant (à titre préventif) ou après l'intoxication (à titre curatif).

4.3. Répartition des animaux

Les animaux sont répartis sur six groupes chacun de 6 rats.

Groupe T : Groupe témoin recevant 1ml de l'huile de tournesol par gavage pendant 10 jours et une injection sous cutanée d'huile d'olive (3 ml/Kg p.c. de rat) se fait le 10^{ème} jour. Sacrifice le 11^{ème} jour.

Groupe C: lot intoxiqué avec le CCl₄ (3 ml/Kg p.c. de rat), sacrifice après 24 heures.

Administrations préventives des extraits :

Groupe HC : lot traité avec HT, chaque rat reçoit 400 mg/Kg p.c. de rat pendant 10 jours, et une injection sous cutanée de CCl₄ (3 ml/Kg p.c. de rat) se fait le 10^{ème} jour, sacrifice le 11^{ème} jour.

Groupe IC: lot traité avec FI, chaque rat reçoit 20 mg/Kg p.c. de rat dissous dans 1ml d'huile de tournesol pendant 10 jours, et une injection sous cutanée de CCl₄ (3 ml/Kg p.c. de rat) se fait le 10^{ème} jour, sacrifice le 11^{ème} jour.

Administrations curatives des extraits:

Groupe CH : chaque ratsubit uneinjection sous cutanée de CCl₄ (3 ml/Kg p.c. de rat) le 1^{er} jour et reçoit par gavage 400 mg/Kg p.c. de rat de HT pendant 10 jours, sacrifice le 11^{ème} jour.

Groupe CI : chaque ratsubit uneinjection sous cutanée de CCl₄ (3 ml/Kg p.c. de rat) le 1^{er} jour et reçoit par gavage 20 mg/Kg p.c. de rat de FI dissous dans 1ml d'huile de tournesol pendant 10 jours, sacrifice le 11^{ème} jour.

4.4. Prélèvement sanguin

Les rats sont mis à jeun la veille du prélèvement. Après anesthésie avec de l'éther diéthylique, le sang est prélevé par ponction à partir du sinus rétro-orbital à l'aide d'une pipette, 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 Eppendorf et conservés à -20°C en vue du dosage des différents paramètres hépatiques.

4.5. Dosage des marqueurs biologiques

Les paramètres biochimiques mesurés sont : Alanine Amino Transférase (ALAT), Aspartate Amino Transférase (ASAT), Phosphatase Alcaline (PA), la créatinine (CREA), le glucose (GLU) et l'urée (URE), ces dosages ont été effectués au le laboratoire central du CHU de Sétif.

4.6. Prélèvement d'organes

Le prélèvement d'organes s'est effectué selon le protocole du laboratoire de Biochimie Appliquée de l'université de Sétif.

Les organes ont été immédiatement prélevés et lavés avec une solution de KCl à 1,15%, pesés ensuite découpés en morceaux et conservés à -80°C. Avant leur utilisation, Les homogénats de foie ont été préparés par broyage des morceaux du foie dans le tampon KCl (0,15 M) à 4°C. Ils sont centrifugés à 3000 tpm pendant 10 min et les surnageants sont récupérés pour les dosages biochimiques.

4.7. Etude histologique

L'étude histo-pathologique a été établie au service de l'anatomie pathologique du CHU de Sétif selon le protocole expérimental du laboratoire qui consiste en :

- a) Déshydratation des organes prélevés (foies et reins) qui sont baignés dans trois bains successifs concentrés d'éthanol, ensuite dans trois bains successifs concentrés de xylène afin d'éliminer toute trace d'alcool.
- b) Enrobage à la paraffine pour obtenir un bloc qui sera facilement coupé.
- c) Confection des coupes d'une épaisseur de 3-4µm à l'aide du microtome ; Ces dernières sont montées sur des lames de verre préalablement recouvertes de gélatine puis sont séchées.
- d) Déparaffinage des coupes dans du xylène et leur réhydratation dans des bains successifs d'éthanol.
- e) Coloration à l'hématoxyline et l'éosine (HE).
- f) Montage permanent entre lame et lamelle permettant de conserver les coupes colorées.
- g) Observation au microscope optique doté d'un appareil photographique.

4.8. Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de Moyenne \pm Ecart-type. L'analyse de la variance est réalisée par le logiciel SPSS (version 9,0). Les multiples comparaisons sont réalisées par le test de Fisher, les différences sont considérées significatives avec $p \leq 0.05$ et hautement significatives lorsque $p \leq 0.01$.

5. Dosage des marqueurs du stress oxydant

Les marqueurs du stress oxydatif ont été estimés dans le plasma et l'homogénat du foie. Il s'agit du malondialdéhyde (MDA), la superoxyde dismutase (SOD), le glutathion réduit (GSH) et la catalase (CAT).

5.1. Evaluation de la peroxydation lipidique

Bien que les espèces oxygénées réactives provoquent des modifications de l'ADN et des protéines, les produits issus de la peroxydation des lipides semblent *a priori* les meilleurs marqueurs du stress oxydant (Lefèvre *et al.* 1998).

La peroxydation lipidique est une conséquence du stress oxydant (Guichardant *et al.*, 2006), tous les lipides contenant des acides gras insaturés quelle que soit leur origine (huiles végétales, huiles de poissons, graisses animales, membranes cellulaires, lipoprotéines) sont concernés (Cillard *et al.*, 2006). Parmi les aldéhydes formés lors de la peroxydation lipidique, le plus connu est le malondialdéhyde (MDA), on a aussi le 4-hydroxynonéal (4 HNE) (Cillard *et al.*, 2006). Leur toxicité est liée à leur forte réactivité vis-à-vis des protéines (Stocker *et al.* 2004) et des acides nucléiques (Cillard *et al.*, 2006). La mesure du MDA se révèle donc un excellent marqueur pour déterminer un stress oxydant (Walter *et al.*, 2008).

La peroxydation lipidique dans le plasma et le cytosol a été examinée par spectrophotométrie à 530 nm. La méthode consiste en l'estimation de la concentration de MDA en utilisant le 1, 1, 3, 3- tétraméthoxypropane comme étalant externe. En milieu acide et à chaud (pH : 2 à 3, 100°C), une molécule de MDA est condensée avec deux molécules de l'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un complexe coloré en rose (Michel *et al.* 2008). Les valeurs ont été exprimées en nanomole de MDA formé par millilitre de plasma ou par gramme de foie, le coefficient d'extinction molaire de MDA est de $1,5 \times 10^5$.

- Au niveau tissulaire

Pour le dosage du MDA, 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA) 0,67% sont additionnés à 0,5 ml d'homogénat, 0,5 ml d'acide trichloroacétique 20%. Le mélange est chauffé à 100°C pendant 15 min, refroidi puis additionné de 4 ml de n-butanol.

Une centrifugation est par la suite réalisée durant 15 min à 3000 tpm. L'absorbance du surnageant est mesurée à 530 nm (Okhawa *et al.*, 1979).

- Au niveau plasmatique

L'analyse des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) est réalisée selon la méthode de Quantanilha *et al.*, (1982). 100 µl de plasma sont dilués dans 0,9 ml de NaCl (0,9%), à cette solution, 20 µl de butylhydroxytoluène (BHT) (BHT à 2% dans de l'éthanol) et 1 ml de TBA (15% de TCA et 0,375% de TBA dans du HCl 0,5 N) sont ajoutés. Après incubation à 85°C pendant 30 min et refroidissement dans un bain glacé, les échantillons sont centrifugés à 2000 g pendant 10 min à 4°C. La lecture de l'absorbance du surnageant est faite à 535 nm.

5.2. Mesure du glutathion réduit

L'évaluation du taux du glutathion réduit (GSH) dans le plasma et l'homogénat a été établie par la méthode colorimétrique d'Ellman (1959). Le principe est basé sur la réaction d'oxydation du GSH par l'acide 5, 5'-Dithiobis 2-nitrobenzoïque (DTNB), libérant ainsi l'acide thionitrobenzoïque (TNB) absorbant à 412 nm. Le taux de GSH est déterminé avec une solution étalon de GSH pour dessiner la courbe standard.

-Au niveau tissulaire

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

-Au niveau plasmatique

La teneur plasmatique en GSH réduit a été mesurée comme suit : à 2,3 ml de tampon phosphate (0,2 M, pH : 7,6), on additionne 0,2 ml de plasma ensuite 0,5 ml de DTNB 1 mM sont ajoutés. L'absorbance du produit de la réaction est mesurée après 4 min à 412 nm. Le taux du GSH est déterminé à partir de la courbe d'étalonnage.

5.3. Evaluation de l'activité de la catalase

Cette enzyme est abondante dans le foie et les globules rouges. Elle se retrouve préférentiellement dans les peroxyosomes et en plus faible quantité dans le cytosol. Elle est responsable de la dégradation d'H₂O₂ en H₂O et O₂ (Blandine Garait «Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la Glisodin R », thèse de doctorat, 2006), l'affinité de la catalase pour l'H₂O₂ est élevée seulement lorsque les teneurs en peroxyde d'hydrogène sont accrues (Mates *et al.*, 1999 ; Powers & Lennon, 1999). On détermine l'activité enzymatique de la catalase en mesurant la disparition du peroxyde d'hydrogène en présence de source d'enzyme (homogénat ou plasma). Cette décomposition peut être suivie par la diminution de l'absorbance à 240 nm, l'activité enzymatique a été déduite en mesurant la différence d'absorbance par unité de temps.

-Au niveau tissulaire

L'activité enzymatique de CAT est déterminée selon la méthode de Clairborne (1985). A 1 ml de tampon phosphate (KH₂PO₄: 0,1 M, pH : 7,2), 0,975 ml de H₂O₂ fraîchement préparé (0,019 M) et 0,025 ml d'homogénat sont additionnés. L'absorbance est mesurée à 240 nm

chaque minute pendant deux minutes, et l'activité enzymatique est calculée en termes d'unité internationale par minute et par gramme de protéine (UI/min/g de protéines), selon la formule : **Activité enzymatique (UI/g) = (2,3033/T) x (log A₁/A₂) / g de protéine**

A₁ : Absorbance à la première minute

A₂ : Absorbance à la deuxième minute

T : Intervalle de temps en minute

-Au niveau plasmatique

Selon la méthode d'Aebi et ses collaborateurs (1984), 0,1 ml de plasma est ajouté à 1,9 ml du tampon phosphate (50 mM, pH : 7,0) et à 1 ml de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (30 mM). Le changement de l'absorbance est détecté pendant 30 sec à 240 nm avec un intervalle de 15 sec. L'activité de la catalase est calculée en utilisant le coefficient d'extinction de H₂O₂ (0,071 mmol cm⁻¹) et les résultats sont exprimés par µmol de H₂O₂ oxydé par mg de protéines suivant la formule :

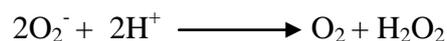
Activité enzymatique (UI/g) = (Δ Abs) / E x Volume d'échantillon (ml) x mg de protéine

Δ Abs : Changement de l'absorbance par minute

E : Coefficient d'extinction (0,071 mmol cm⁻¹)

5.4. Mesure de l'activité de la superoxyde dismutase SODCu/Zn

Les SODs sont capables d'éliminer l'anion superoxyde, première espèce toxique formée à partir de l'oxygène, par une réaction de dismutation. Elles assurent ainsi la première ligne de défense enzymatique contre le stress oxydant comme le montre la réaction (VouldoukisI *et al.*, 2004).



L'activité de la superoxyde dismutase a été mesurée dans le plasma et l'homogénat du foie en suivant la méthode de Sun et ses collaborateurs (1988). Cet essai implique l'inhibition de la réduction du nitrobleu de tétrazolium (NBT) avec la xanthine-xanthine oxydase utilisée en tant que générateur de superoxyde, pour cela, on a préparé un milieu réactionnel contenant 40 ml de xanthine (0,3 mM), 20 ml d'EDTA (0,6 mM), 20 ml de NBT (150 µM) et 6 ml de sérum-albumine bovine (BSA) (1 g/l). Ensuite, à un volume du milieu réactionnel on ajoute la source enzymatique (plasma ou homogénat). Après une incubation de 20 min à 25°C, l'absorbance est mesurée à 560 nm. Les résultats sont exprimés en U/g de protéines ou ml de plasma.

Résultats et discussion

1. Extraction et caractérisation

1.1. Rendement de l'extraction de l'huile totale

Les graines de *Nigella sativa* renferment généralement une quantité importante des huiles fixes. La procédure d'extraction que nous avons appliquée a permis d'avoir un rendement estimé à 30.25 ± 0.25 % en huile totale. Cette valeur s'approche de celles trouvées dans les autres études qui donnent des taux d'extraction compris entre 39.7 et 52% (Ashraf et al., 2006; Ramadan et Mörsel, 2002ab). La variation dans la teneur en huile est due à plusieurs facteurs tels que le biotope (Cheikh-Rouhou et al., 2007), la méthode d'extraction (Atta, 2003, Ramadan et Mörsel, 2002b) et l'espèce utilisée (Kökdil et Hilmaz, 2005).

1.2. Rendement de l'extraction des insaponifiables

Les insaponifiables des huiles végétales sont considérés comme antioxydants naturels. Ils sont aptes d'atténuer l'oxydation des huiles pendant le stockage. La teneur de notre huile en insaponifiables a été estimée à 2,5%, un taux bien inférieur à celui de l'huile de *Nigella sativa* de Denizli en Turquie (5,38%) (Üstun et al., 1990), de l'Inde (4 %), de Kutahya (Turquie) (3,47 %) et de Konya (Turquie) (4,0 %) mais élevé par rapport à celui des graines de *Nigella sativa* de l'Egypte (0,66 %), (Üstun et al., 1990). Cette fluctuation dans les teneurs en insaponifiables est en relation avec la méthode d'extraction et l'origine de la graine (Cheikh-Rouhou et al., 2007).

1.3. Composition en alpha-tocophérol par chromatographie sur couche mince(CCM)

L'analyse des tocophérols n'est pas une étude courante vue les difficultés de sa réalisation. Une analyse des tocophérols de l'huile de *Nigella sativa* a été réalisée par Hassanein , El-Shami et El-Mallah (2011) en utilisant la chromatographie liquide de haute performance , Ces chercheurs ont déduit que l'huile de *Nigella sativa* contenait plus que 90% de gamma-tocophérol.

Par ses faibles contraintes techniques, son emploi simple et son coût modeste, la CCM est un outil de choix pour l'analyse phytochimique de routine d'extraits bruts, de fractions, ainsi que de produits purs isolés. De ce fait nous avons opté pour cette technique dans le but de caractériser l'alpha-tocophérol de l'huile totale et des insaponifiables, ce qui a permis d'obtenir le chromatogramme présenté sur la figure 13.

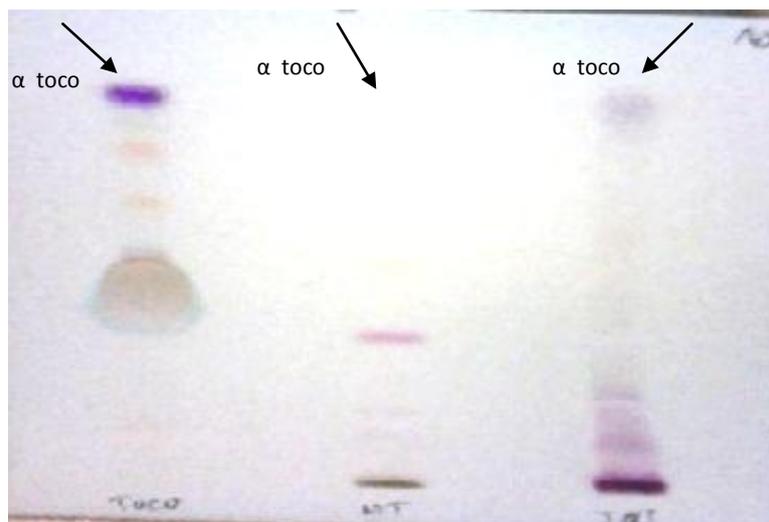


Figure 13: Composition en alpha-tocophérol de l'huile totale et de la fraction insaponifiable des graines de *Nigella sativa*

D'après l'allure du chromatogramme, nos deux extraits contiennent de l'alpha-tocophérol et on constate que la fraction des insaponifiables en est plus riche vu que la tâche du chromatogramme obtenu avec cette fraction est nettement plus prononcée que celle obtenue avec l'huile totale.

1.4. Composition en alpha-tocophérol par chromatographie liquide de haute performance (HPLC)

Dans la présente étude, l'alpha-tocophérol de l'huile totale de *Nigella sativa* et des insaponifiables a été déterminé par HPLC doté d'un Photodiode Array Detector. Les chromatogrammes sont présentés (Figures 14, 15, 16).

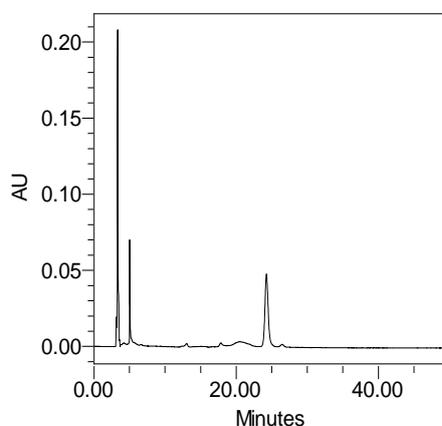


Figure 14: Chromatogramme HPLC de l'alpha-tocophérol (Standard)

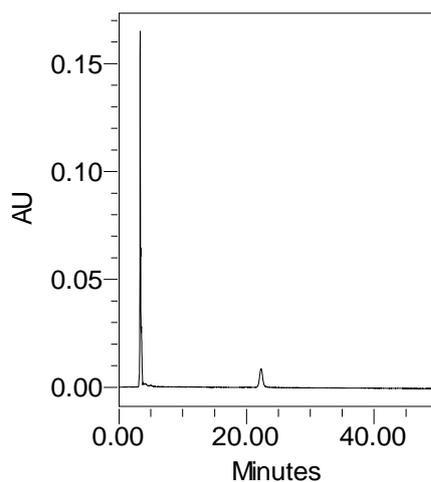


Figure 15: Chromatogramme HPLC de l'alpha-tocophérol de l'huile totale

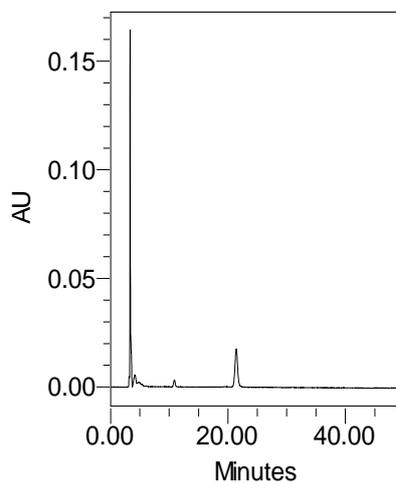


Figure 16: Chromatogramme HPLC de l'alpha-tocophérol de la fraction insaponifiable

Le temps de rétention de l'alpha-tocophérol est de 24,253 min, déterminé grâce à l'utilisation de l'alpha-tocophérol de référence (standard). L'étude des profils chromatographiques de l'huile totale et des insaponifiables a permis de déterminer leur composition en alpha-tocophérol (Tableau 4).

Tableau 4. Détermination de la teneur en alpha-tocophérol de l'huile totale et de la fraction insaponifiable des graines de *Nigella sativa*.

	Aire du pic	Quantité estimée (% estimé)
Huile totale	844956	14,28%
Insaponifiables	1329202	28,01%

Les résultats indiquent que la fraction des insaponifiables est nettement plus riche en alpha-tocophérol, elle contient presque le double en alpha-tocophérol comparativement à l'huile totale, ce qui confirme les résultats obtenus par chromatographie sur couche mince.

1.5. Dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes

Afin de caractériser les extraits préparés à partir des gaines de *Nigella sativa*, un dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes a été effectué. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydantes des plantes leur sont attribuées. La méthode de dosage des polyphénols totaux est celle de Folin-Ciocalteu (Li *et al.*, 2007). L'acide gallique a été utilisé comme standard. Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode du trichlorure d'aluminium (Bahorun *et al.*, 1996) en utilisant comme standard la quercétine. Les résultats sont représentés dans le tableau 5 et les gammes d'étalonnages dans le volet annexe.

Tableau 5. Dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes dans les extraits de *Nigella sativa*

Extrait	Polyphénols (a)	Flavonoïdes (b)
Huile totale	16,67±0,35	3,83±0,02
Insaponifiables	24,73±0,51	8,31±0,40

(a) µg d'équivalent d'acide gallique par g d'extrait.

(b) µg d'équivalent de quercétine g d'extrait.

Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures ± SD.

Les résultats du dosage des polyphénols montrent que l'huile totale de *Nigella sativa* contient 16,67±0,35 µg EAG/g d'extrait et que la fraction des insaponifiables comporte 24,73±0,51 µg EAG/g d'extrait.

La détermination quantitative des flavonoïdes totaux par la méthode du trichlorure d'aluminium révèle que la fraction des insaponifiables est plus riche en flavonoïdes que l'huile totale avec des teneurs de 8,31±0,40 µg EQ/mg d'extrait et 3,83 ± 0,02 µg EQ/mg d'extrait respectivement. L'examen de ces résultats permet de mettre en évidence une

corrélation linéaire significative ($r^2 = 0,76$, $p \leq 0,05$) entre la teneur des extraits en flavonoïdes et en composés phénoliques. Ceci est rationnel étant donné que les flavonoïdes représentent les composés majoritaires des polyphénols.

2. Activité antioxydante *in vitro*

2.1. Piégeage des radicaux libres

2.1.1. Piégeage du DPPH

Les résultats obtenus montrent que l'huile totale et la fraction insaponifiable des graines de *Nigella sativa*, à la concentration de 200 $\mu\text{g/ml}$, réduisent le radical DPPH à 55% et 70% et avec des IC_{50} de l'ordre de 173,66 $\mu\text{g/ml}$ et 113,24 $\mu\text{g/ml}$ respectivement ; ainsi l'activité antiradicalaire des deux extraits est bien et bel infime par rapport au standard utilisé, α -tocophérol ayant une IC_{50} de 8,61 $\mu\text{g/ml}$ (figure 17, tableau 6).

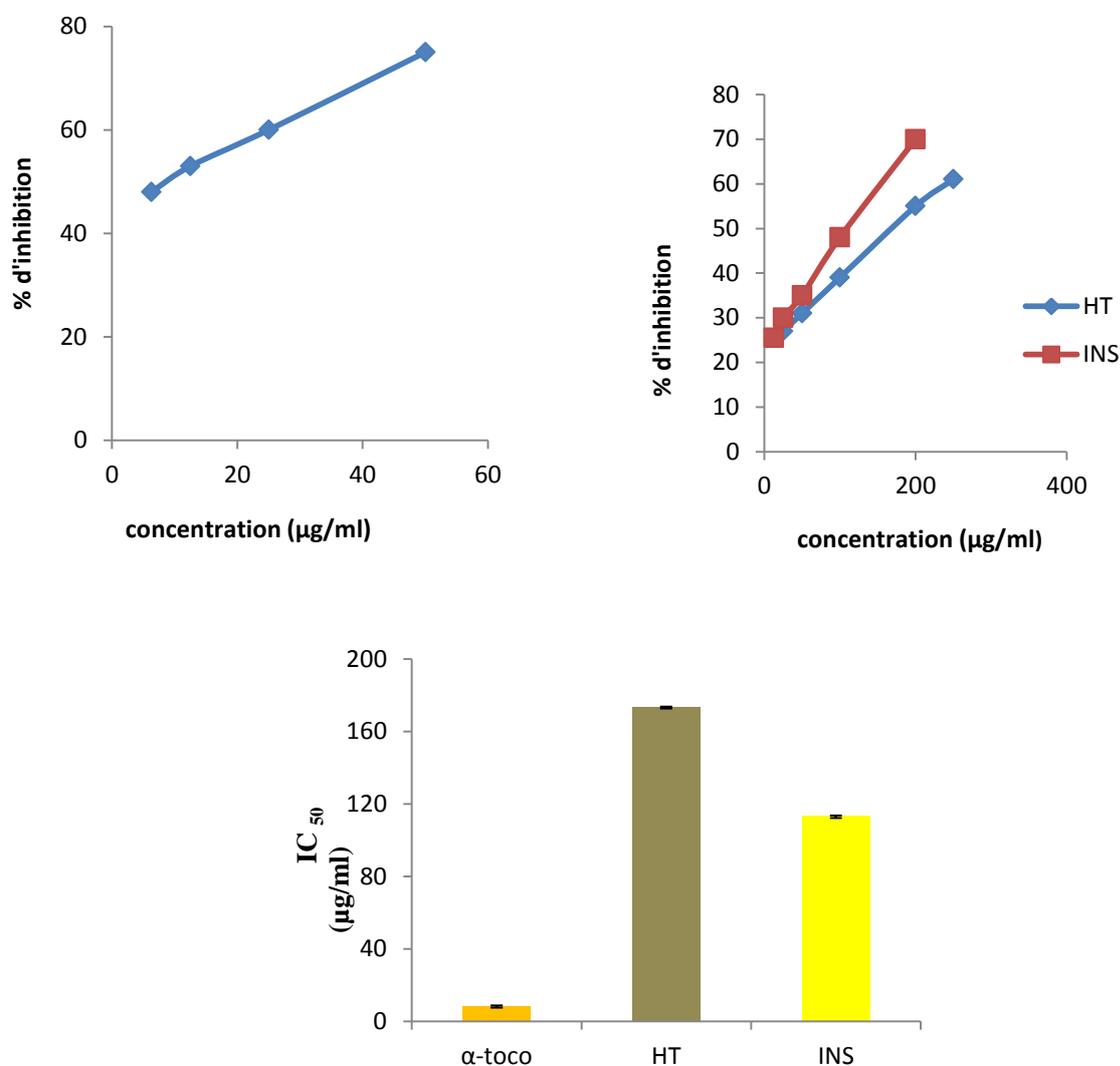


Figure 17. Effet piégeur du DPPH de l'huile totale et la fraction insaponifiable des graines de *Nigella sativa* et de l' α -tocophérol.

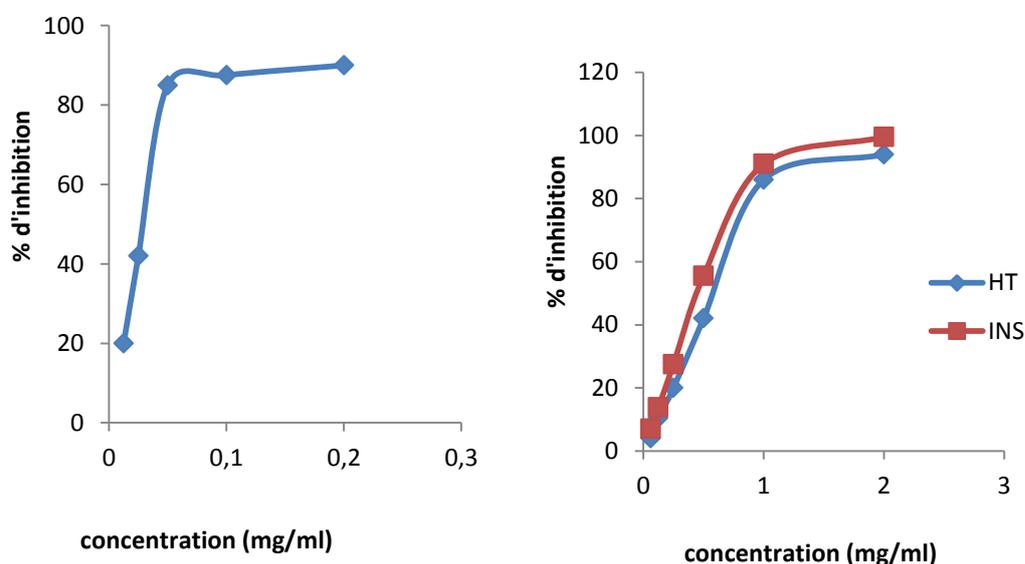
Les résultats sont représentés en pourcentage d'inhibition du radical par rapport au contrôle positif. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD

Tableau 6. Les valeurs IC_{50} des extraits de *Nigella sativa* et de l' α -tocophérol

Fractions	IC_{50} (μ g/ml)
Huile totale	173,66 \pm 0,174
Fraction insaponifiable	113,24 \pm 0,425
α -tocophérol	8,61 \pm 0,1

2.1.2. Piégeage de l'ABTS

D'après les résultats, l'activité scavenger de l'ABTS que possède la fraction insaponifiable avec une IC_{50} de 0,455 mg/ml est meilleure à celle de l'huile totale des graines de *Nigella sativa* avec une IC_{50} de 0,602 mg/ml, cependant, les deux activités restent trop faibles par rapport à celle de l' α -tocophérol avec une IC_{50} de 0,029 mg/ml. La figure 18 illustre le pourcentage d'inhibition du radical susdit pour chaque extrait et les valeurs des IC_{50} sont présentées dans le tableau 7.



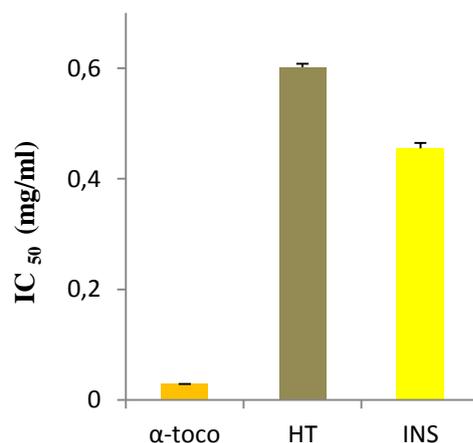


Figure 18. Effet piègeur de l'ABTS de l'huile totale et la fraction insaponifiable des graines de *Nigella sativa* et de l' α -tocophérol. Les résultats sont représentés en pourcentage d'inhibition du radical par rapport au contrôle positif. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD.

Tableau 7. Les valeurs IC₅₀ des extraits de *Nigella sativa* et de l' α -tocophérol

Fractions	IC ₅₀ (mg/ml)
Huile totale	0,602 \pm 0,006
Fraction insaponifiable	0,455 \pm 0,01
α -tocophérol	0,029 \pm 0

2.1.3. Piégeage de H₂O₂

Dans ce test le pourcentage d'inhibition est proportionnel à l'absorbance de la molécule H₂O₂ qui absorbe dans l'UV à 230 nm. Les résultats montrent que les deux fractions huile totale et celle des insaponifiables à la concentration de 1 mg/ml réduisent H₂O₂ à 72 % et 76 % et avec des IC₅₀ de l'ordre de 0,39 mg/ml et 0,324 mg/ml respectivement. Ainsi, l'activité antiradicalaire des deux extraits est faible par rapport à l' α -tocophérol avec une IC₅₀ de 0,09 mg/ml (figure 19, tableau 8).

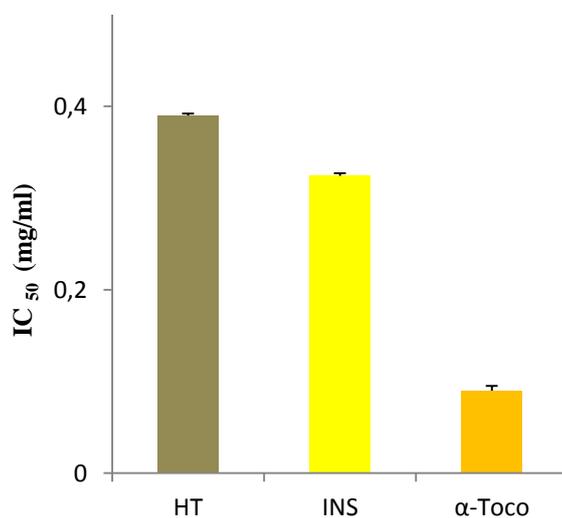
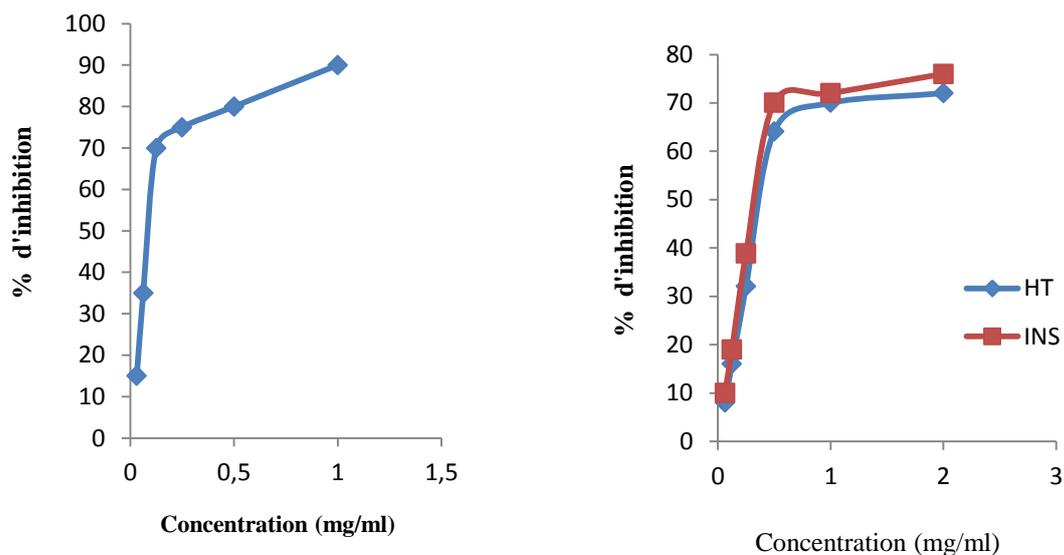


Figure 19. Effet piègeur du H₂O₂ par l'huile totale et la fraction insaponifiable des graines de *Nigella sativa* et l'α-tocophérol. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± SD

Tableau 8. Les valeurs IC₅₀ des extraits des graines de *Nigella sativa* et de l'α-tocophérol

Fractions	IC ₅₀ (mg/ml)
Huile totale	0,39±0,002
Fraction insaponifiable	0,324±0,003
α- tocophérol	0,09±0,005

2.1.4. Piégeage du OH^\bullet

Le piégeage du OH^\bullet a été évalué en fonction des concentrations de nos extraits. La figure 20 illustre le pourcentage d'inhibition du radical susdit pour chaque extrait et les valeurs des IC_{50} sont présentées dans le tableau 9. L'huile totale et la fraction insaponifiable des graines de *Nigella sativa* montrent une capacité antiradicalaire dose-dépendante, cette dernière possède la meilleure activité avec une IC_{50} de 0,302 mg/ml, quoiqu'elle reste faible comparativement à celle de l' α -tocophérol avec une IC_{50} de 0,167 mg/ml.

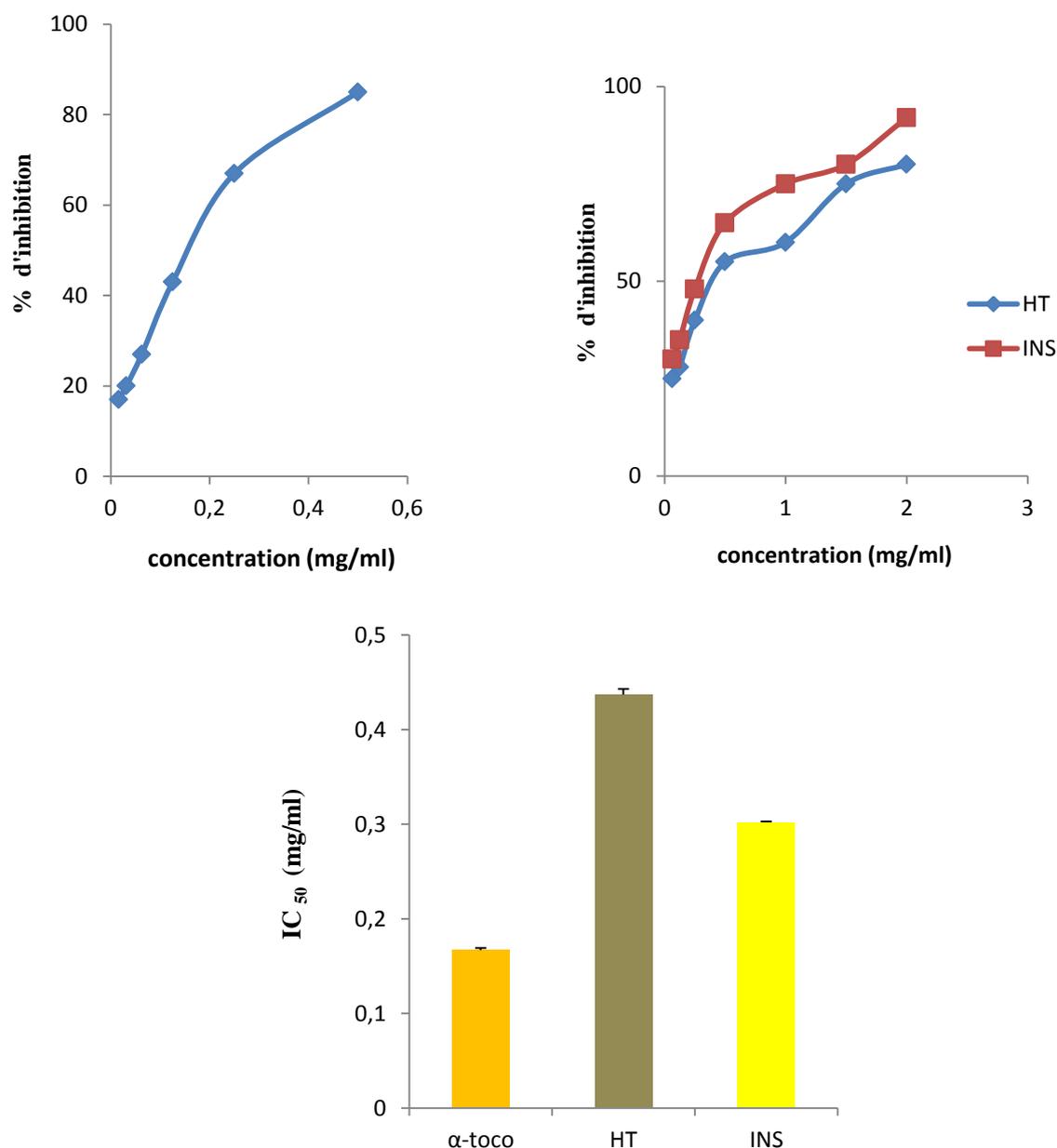


Figure 20. Effet piégeur du OH^\bullet par l'huile totale et la fraction insaponifiable des graines de *Nigella sativa* et l' α -tocophérol.

Les résultats sont représentés en pourcentage d'inhibition du radical hydroxyle par rapport au contrôle positif. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD.

Tableau9. Les valeurs IC_{50} des extraits de *Nigella sativa* et de l' α -tocophérol

Fractions	IC_{50} (mg/ml)
Huile totale	0,437 \pm 0,006
Fraction insaponifiable	0,302 \pm 0,001
α -tocophérol	0,167 \pm 0,002

2.2. L'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique

On a procédé selon la méthode de thiocyanate ferrique pour évaluer l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique par les extraits des graines de *Nigella sativa* et les résultats sont représentés dans la figure 21.

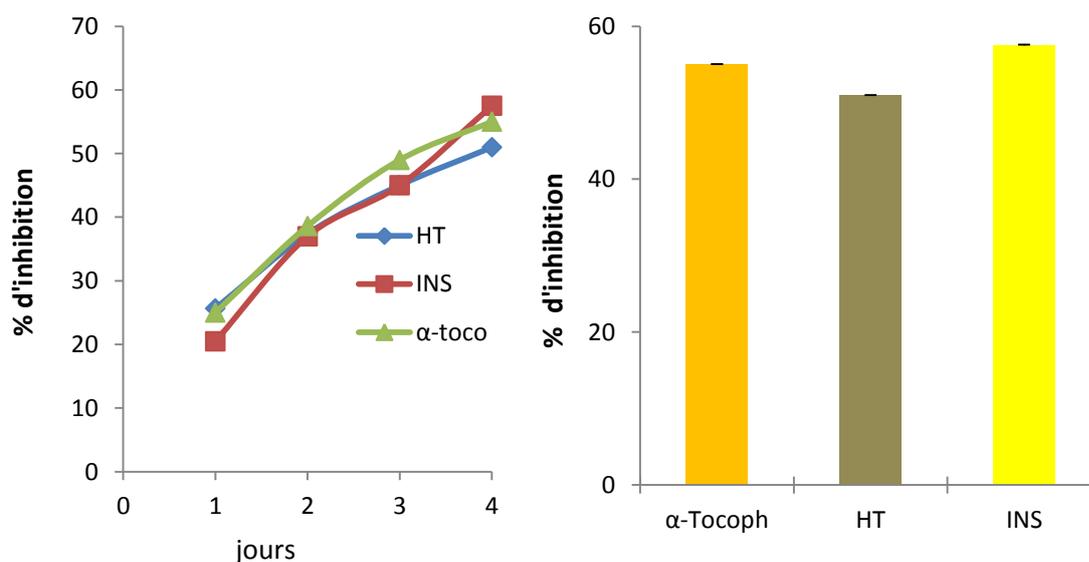


Figure 21. Pourcentage d'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique par les extraits des graines de *Nigella sativa* et de l' α -tocophérol. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD.

L'ensemble des trois extraits testés présentent une inhibition importante et significative de la peroxydation lipidique. Les insaponifiables ont l'effet inhibiteur le plus important avec un pourcentage d'inhibition de 57,5 % suivi par l' α -tocophérol (55%) et l'huile totale (50,98%).

2.3. Test d'hémolyse oxydative

Le test d'hémolyse effectué suivant le protocole de Tramer et *al.* (2012) montre des taux d'hémolyse très bas que ce soit pour l'huile totale ou la fraction insaponifiable extraites des graines de *Nigella sativa*, les pourcentages d'hémolyse les plus élevés étaient de 0,68% et 0,55% respectivement à la concentration de 4 mg/ml; cependant, ces chiffres sont élevés par rapport à ceux de l' α -tocophérol. La figure 22 illustre les pourcentages d'hémolyse en fonction des différentes concentrations de l'huile totale, la fraction insaponifiable des graines de *Nigella sativa* et de l' α -tocophérol.

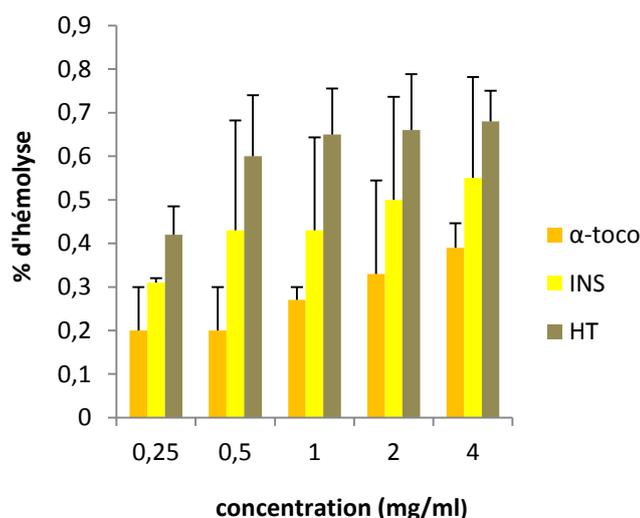


Figure 22. Pourcentages d'hémolyse en fonction des différentes concentrations de l'huile totale, la fraction insaponifiable des graines de *Nigella sativa* et de l' α -tocophérol.

3. Etude de l'effet de *Nigella sativa* sur l'hépatotoxicité induite par le CCl_4

3.1. Paramètres biologiques

*Les marqueurs hépatiques mesurés sont : Alanine Amino Transférase (ALAT), Aspartate Amino Transférase (ASAT), Phosphatase Alcaline (PA), les résultats sont regroupés dans le tableau 10 et la figure 23.

Tableau 10: Evolution des marqueurs hépatiques des rats traités par l'huile totale et la fraction des insaponifiables de *Nigella sativa*

	T	C	IC	CI	HC	CH
ALAT	55,28±23,10	163,3±36,97	69,13±5,93	38±6,90	86,4 ±31,34	49,83±8,37
ASAT	147,98±41,45	233,76±23,71	184,8±25,38	112,5±12,34	197,4±63,41	142,75±14,74
PA	238,65±24,40	337,33±30,42	248,13±36,26	219,16±58,03	255,6±22,59	236,99±22,77

Groupe T : rats normaux, **Groupe C** : rats intoxiqués avec le CCl₄, **Groupe IC** : rats traités avec 20 mg/Kg/j de FI puis intoxiqués au CCl₄, **Groupe CI** : rats intoxiqués au CCl₄ puis traités avec 20 mg/Kg/j de FI, **Groupe HC** : rats traités avec 400 mg/Kg/j de HT ensuite intoxiqués au CCl₄, **Groupe CH** : rats intoxiqués au CCl₄ puis traités avec 400 mg/Kg/j de HT, (n=6 dans chaque groupe).

ALAT : Alanine Amino Transférase, **ASAT** : Aspartate Amino Transférase, **PA** : Phosphatase Alcaline

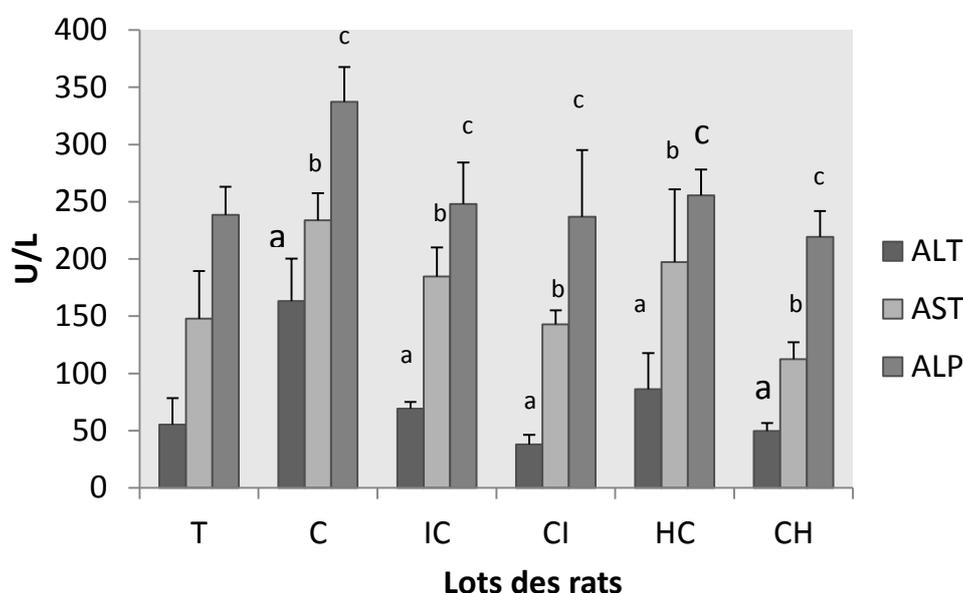


Figure 23 : Analyse des marqueurs hépatiques des rats traités par l'huile totale et la fraction des insaponifiables de *Nigella sativa*
Comparisons are made with lot C. ^{a,b,c}: p≤0,0001

Le dosage des marqueurs hépatiques révèle leur augmentation importante chez les rats intoxiqués au CCl₄ (163,3±36,97 U/L pour l'ALAT, 233,76±23,71 U/L pour l'ASAT, 337,33±30,42 U/L pour la PA) par rapport aux rats du lot témoin.

La concentration de l'ALAT diminue chez les rats traités de manière préventive par les deux extraits (69,13±5,93 U/L pour les insaponifiables, 86,4 ±31,34 U/L pour l'huile totale) sans jamais atteindre la même valeur que celle des rats normaux (55,28±23,10 U/L). Cependant, on note une réduction très hautement significative des taux de l'ALAT chez les rats traités de

manière curative par les deux extraits (38±6,90 U/L pour les insaponifiables, 49,83±8,37 U/L pour l'huile totale) par rapport au group T (rats normaux) (55,28±23,10 U/L).

Le taux de l'ASAT baisse chez les rats traités en préventif par les deux extraits (184,8±25,38 U/L pour les insaponifiables, 197,4±63,41 U/L pour l'huile totale) sans atteindre le même taux que celui des rats normaux (147,98±41,45 U/L). Néanmoins, on note une réduction très hautement significative des taux de l'ASAT chez les rats traités en curatif par les deux extraits (112,5±12,34 U/L pour les insaponifiables, 142,75±14,74 U/L pour l'huile totale) par rapport au group T (rats normaux) (147,98±41,45 U/L).

D'après les résultats des dosages de la PA, une diminution globale a été enregistrée pour l'ensemble des groupes traités. Cette diminution est significative pour les groupes traités en préventif avec les deux extraits (248,13±36,26 U/L pour les insaponifiables, 255,6±22,59 U/L pour l'huile totale). Il est important de signaler que la diminution du taux de la PA est très significative pour les animaux traités avec les deux extraits en curatif (219,16±58,03 U/L pour les insaponifiables, 236,99±22,77 U/L pour l'huile totale) par rapport au group T (rats normaux) (238,65±24,40 U/L).

Les diminutions des taux des marqueurs hépatiques sont meilleures avec la fraction desinsaponifiables que l'huile totale et en traitement curatif qu'en traitement préventif.

*Les marqueurs rénaux mesurés sont :la créatinine (CREA), l'urée (URE) et la glycémie (GLY). Les résultats sont regroupés dans le tableau 11 et la figure 24.

Tableau 11: Evolution des marqueurs rénaux des rats traités par l'huile totale et la fraction des insaponifiables de *Nigella sativa*

	T	C	IC	CI	HC	CH
CREA	0,39±0,03	0,47±0,09	0,39±0,00	0,35±0,01	0,39±0,03	0,39±0,01
URE	0,50±0,01	0,60±0,08	0,58±0,06	0,44±0,04	0,60±0,05	0,52±0,07
GLY	1,00±0,23	1,09±0,15	0,75±0,10	1,05±0,09	1,01±0,17	0,73±0,20

Groupe T : rats normaux, **Groupe C** : rats intoxiqués avec le CCl₄, **Groupe IC** : rats traités avec 20 mg/Kg/j de FI puis intoxiqués au CCl₄, **Groupe CI** : rats intoxiqués au CCl₄ puis traités avec 20 mg/Kg/j de FI, **Groupe HC** : rats traités avec 400 mg/Kg/j de HT ensuite intoxiqués au CCl₄, **Groupe CH** : rats intoxiqués au CCl₄ puis traités avec 400 mg/Kg/j de HT, (n=6 dans chaque groupe).

CREA : Créatinine, **URE** : Urée, **GLY** : Glycémie

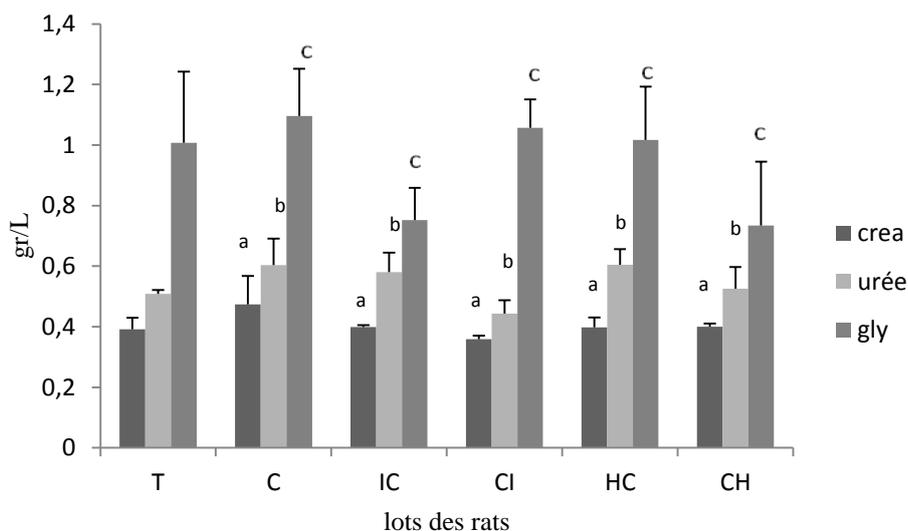


Figure 24 : Analyse des marqueurs rénaux des rats traités par l'huile totale et la fraction des insaponifiables de *Nigella sativa*
Comparisons are made with lot T. ^{a,b,c}: p≤0,0001

Ces résultats montrent l'augmentation des taux sanguins de la créatinine ($0,47\pm 0,09$ mg/dl contre $0,39\pm 0,03$ mg/dl chez le lot témoin) et l'urée ($0,60\pm 0,08$ g/l contre $0,50\pm 0,01$ g/l chez le lot témoin) chez les rats intoxiqués au CCl_4 reflétant une atteinte rénale qui est une tubulopathie aigue de type anurique, une anomalie rénale décrite en littérature concernant les effets toxiques du CCl_4 (Académie nationale de médecine de paris, ATSDR, US EPA, Stephen O. Adewole et al., 2007 ; B. Mégarbane, N. Deye, F. Baud, 2007); durant notre expérience, on a effectivement noté une diminution très importante de la sécrétion urinaire chez ce lot de rats (anurie).

En revanche, chez les rats ayant subi un traitement curatif ou préventif avec l'huile totale ou la fraction des insaponifiables, tous les paramètres étaient dans la norme comparativement au lot témoin, à part le taux de l'urée qui est resté élevé chez les deux lots IC et HC ne reflétant pas forcément un dysfonctionnement rénal vu que le taux de la créatinine chez les rats de ces lots est normal ($0,39\pm 0,00$ mg/dl, $0,39\pm 0,03$ mg/dl respectivement).

Le rétablissement des taux sanguins de la créatinine et l'urée aux normes, après leur augmentation suite à une intoxication au CCl_4 , était meilleur avec le traitement curatif par les deux extraits qu'avec le traitement préventif.

3.2. Etudes histologiques

Le foie des rats du lot T (témoin) présente une architecture lobulaire normale marquée par la présence de travées hépatocytaires disposées radialement autour d'une veine centrolobulaire.

Ces travées sont séparées par des sinusoides (figure 25). On constate cependant une faible congestion.

Chez les animaux intoxiqués au CCl_4 (lot C), on note un aspect mosaïque du foie traduisant une souffrance hépatique, une congestion sinusoidale, un infiltrat portal inflammatoire, des hépatocytes clarifiés et ballonnés avec une prédominance autour de la veine centrolobulaire, ainsi qu'une stéatose microvacuolaire et une congestion vasculaire très importante (figure 26).

Après l'administration d'un traitement préventif à l'huile totale pendant 10 jours, suivi d'une intoxication au CCl_4 (lot HC), les lésions hépatiques sont moins importantes : l'architecture hépatique reste reconnaissable mais la congestion persiste. Autour des veines centrolobulaires les hépatocytes sont quasi normaux (figure 27).

Chez les rats du lot IC ayant reçu un traitement préventif avec la fraction des insaponifiables pendant 10 jours suivi d'une intoxication au CCl_4 (figure 28), les signes de souffrance sont moins prononcés: l'architecture hépatique reste reconnaissable et la congestion persiste.

Après un traitement curatif à l'huile totale des animaux intoxiqués par le CCl_4 (lot CH), on souligne la disparition des signes de souffrance (figure 29).

Sous un traitement curatif à la fraction des insaponifiables (lot CI) tous les signes d'intoxication ont disparu (figure 30).

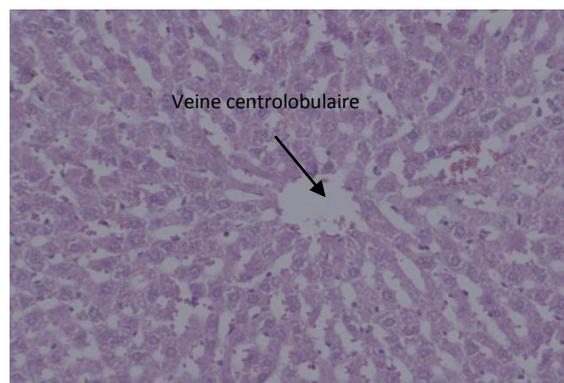
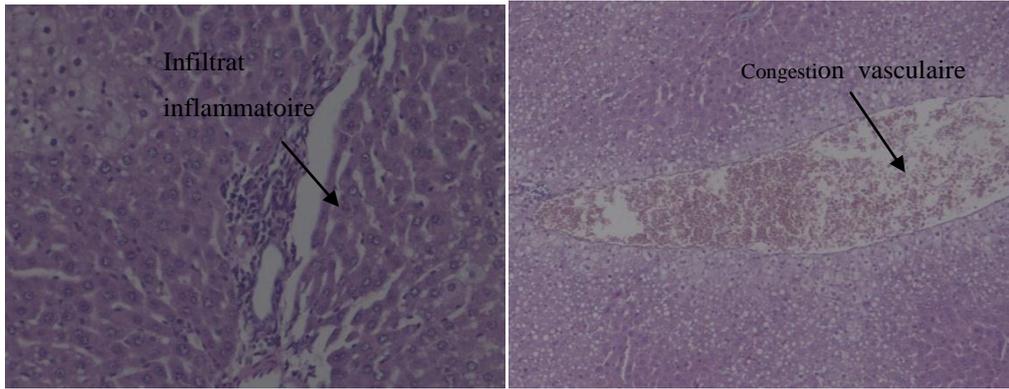
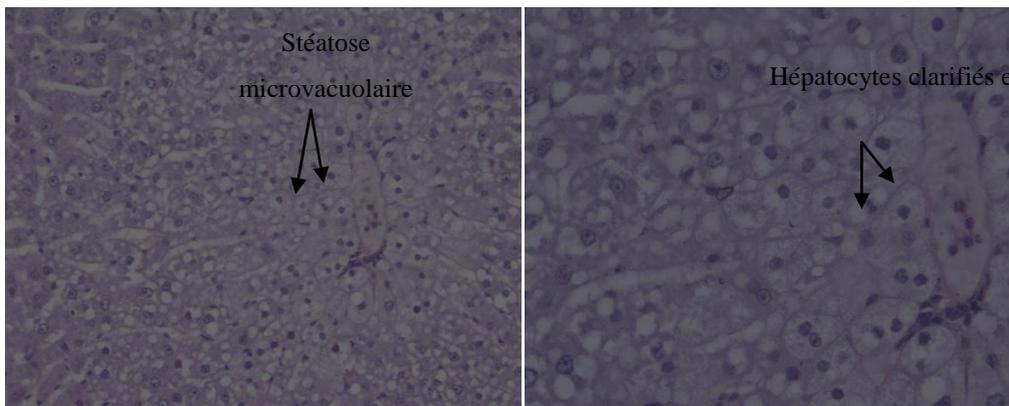


Figure 25: Tissu hépatique du lot témoin traité avec l'huile de tournesol et l'huile d'olive (GX20).



A

B



C

D

Figure 26 : Tissu hépatique du lot intoxiqué par le CCl_4 . A : Infiltrat inflammatoire portal (GX20), B : Congestion vasculaire importante (GX20), C : Stéatose microvacuolaire (GX20), D : Hépatocytes clarifiés et ballonnés (GX40).

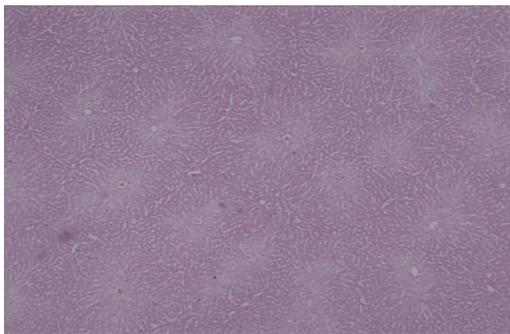


Figure 27 : Tissu hépatique du lot traité avec HT puis intoxiqué par le CCl_4 (GX10)

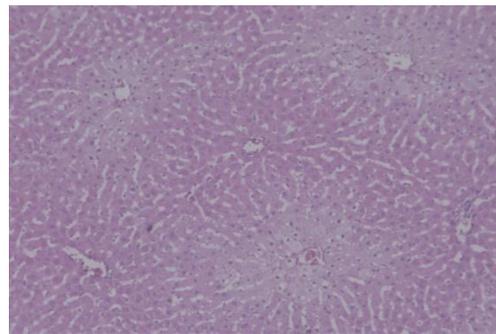


Figure 28 : Tissu hépatique du lot traité avec FI puis intoxiqué avec le CCl_4 (GX20)

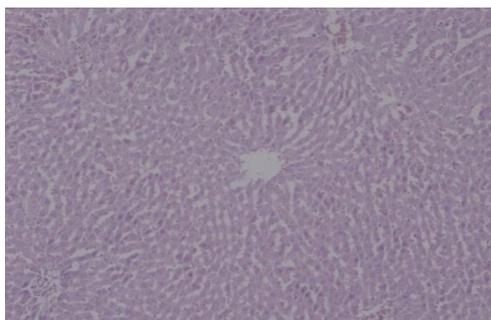


Figure 29 : Tissu hépatique du lot intoxiqué par le CCl₄ ensuite traité avec HT (GX10)

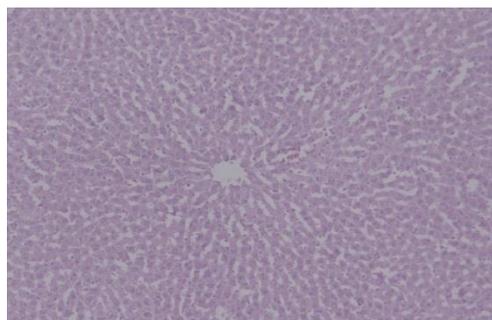


Figure 30 : Tissu hépatique du lot intoxiqué par le CCl₄ ensuite traité avec FI (GX10)

A travers la coupe histologique du rein des rats du lot T (témoin) (figures 31), nous observons la zone corticale qui est entièrement délimitée par une capsule conjonctive, fléchée en 1 ; nous constatons en 2 de petites masses sphériques, ce sont les glomérules rénaux, ou corpuscules de Malpighi où se produit la filtration glomérulaire, ils sont disséminés dans l'ensemble du cortex. La majorité des tubes rénaux acidophiles comme ceux fléchés en 3, se localisent dans le cortex (Il s'agit des tubes contournés de premier ordre), ce qui explique la coloration plus rougeâtre de cette zone corticale. La médullaire en 4 est une zone centrale moins colorée située profondément et constituée par les pyramides de Malpighi et celles de Ferrein.

Chez les animaux intoxiqués au CCl₄ (lot C) (figure 32), l'examen histologique montre que l'épithélium tubulaire est endommagé, une nécrose focale des tubes rénaux, un infiltrat inflammatoire mononucléé et la congestion.

Après administration d'un traitement curatif ou préventif à l'huile totale ou à la fraction des insaponifiables des graines de *Nigella sativa*, tous les signes de la tubulopathie aigüe ont disparu et on observe un rein tout à fait normal tel qu'il était déjà décrit chez les rats du lot témoin (figures 33, 34, 35 et 36).

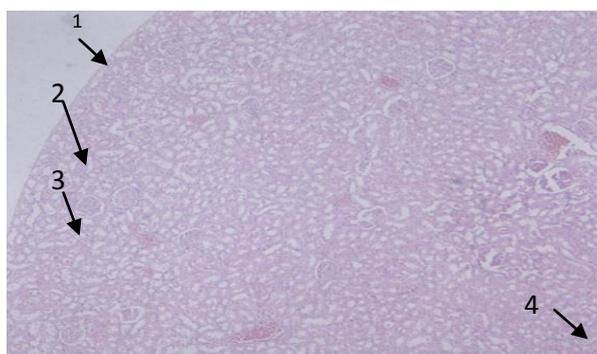


Figure 31 : Tissu rénal du lot témoin traité avec l'huile de tournesol et l'huile d'olive (GX10)

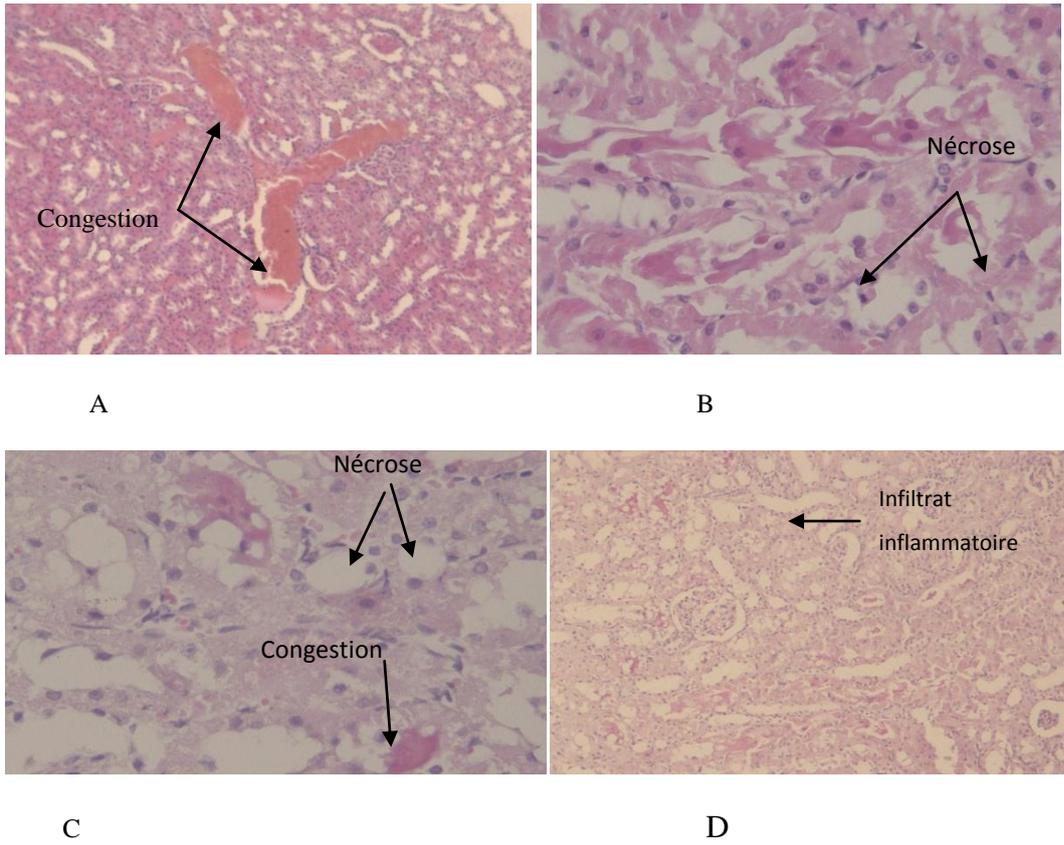


Figure 32 : Tissu rénal du lot intoxiqué par le CCl₄. A : Congestion (GX100), B : Nécrose cellulaire des tubes rénaux (GX400), C : Congestion + nécrose tubulaire(GX400), D : Nécrose tubulaire + infiltrat inflammatoire (GX100).

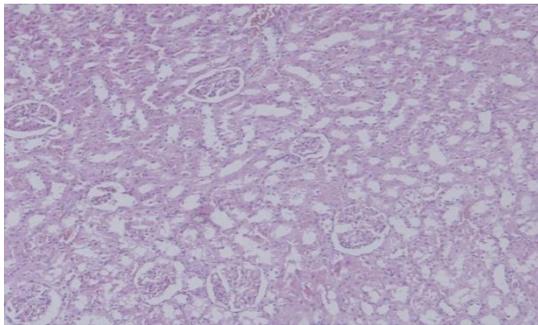


Figure 33 : Tissu rénal du lot traité avec HT puis intoxiqué par le CCl₄(GX100)

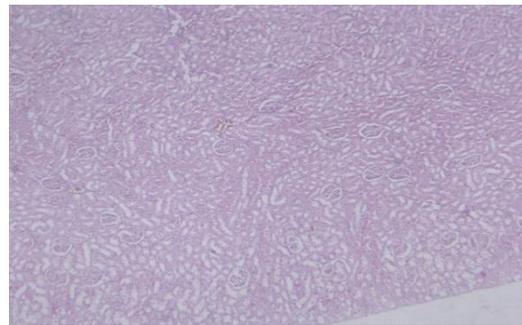


Figure 34 : Tissu rénal du lot traité avec FI puis intoxiqué par le CCl₄(GX10)

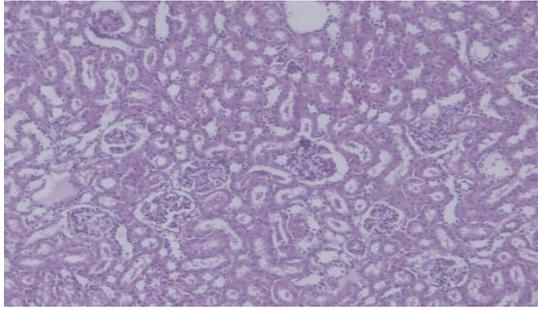


Figure 35: Tissu rénal du lot intoxiqué par le CCl_4 ensuite traité avec HT (GX100)

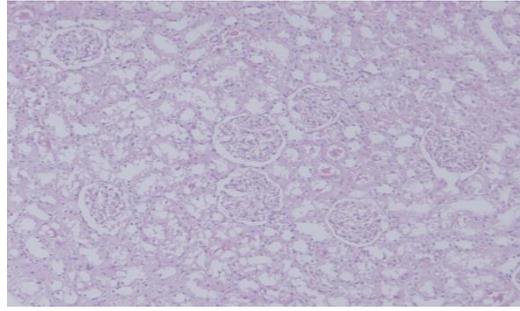


Figure 36: Tissu rénal intoxiqué par le CCl_4 ensuite traité avec FI (GX100)

4. Mécanismes de prévention contre le stress oxydatif induit par le tétrachlorure de carbone

4.1. Effet des extraits sur les marqueurs du stress oxydatif tissulaire

Les marqueurs du stress oxydatif estimés dans notre étude étaient le glutathion réduit (GSH) le malondialdéhyde (MDA), la catalase (CAT) et la superoxyde dismutase (SOD). Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 12 et la figure 37. L'hépatotoxicité induite par le tétrachlorure de carbone est marquée par une augmentation significative dans le taux du MDA (110 nmol/g par rapport à 77nmol/g du lot témoin) et une diminution significative du taux du GSH (20 μ mol/g par rapport à 34 μ mol/g du lot témoin). Par ailleurs, une diminution significative de l'activité des enzymes antioxydantes CAT et SOD a été constatée chez le groupe de rats traités par le tétrachlorure de carbone comparativement au groupe contrôle (10 U/mg par rapport à 60 U/mg et 190U/mg par rapport à 300U/mg respectivement).

Après dix jours de traitement curatif et préventif par l'huile totale et la fraction des insaponifiables des graines de *Nigella sativa*, les résultats ont montré une diminution statistiquement significative ($p \leq 0.001$) du taux du MDA par rapport au groupe traité par le tétrachlorure de carbone, la diminution la plus importante était obtenue avec la fraction des insaponifiables en traitement curatif (62 nmol/g). On enregistre une augmentation significative ($p \leq 0.01$) du taux du GSH dans les groupes traités par HT et FI par rapport au groupe traité par le tétrachlorure de carbone, le taux du GSH a augmenté le plus chez rats traités en curatif avec FI (40 μ mol/g).

A propos des enzymes antioxydantes, on note une augmentation significative ($p \leq 0.01$) de l'activité de la CAT chez la totalité des rats traités en curatif ou en préventif avec FI et HT par rapport au groupe des rats intoxiqués par le CCl₄, cependant, la susdite augmentation était flagrante chez les rats traités en curatif avec les mêmes extraits (110 U/mg pour FI et 70 U/mg pour HT par rapport à 10 U/mg du lot intoxiqué au CCl₄).

Concernant la SOD, son activité a connu une augmentation significative chez tous les rats traités en curatif ou en préventif avec FI et HT, cette dernière était mieux prononcée avec le traitement curatif (390U/mg pour FI et 330 U/mg pour HT par rapport à 190 U/mg du lot des rats intoxiqués par le CCl₄).

Tableau 12. Effet de HT et FI des grains de *Nigella sativa* sur certains marqueurs du stress oxydatif tissulaire chez des rats hépatotoxiqués.

Groupes	Paramètres			
	GSH ($\mu\text{mol/g}$)	MDA (nmol/g)	CAT (U/mg)	SOD (U/mg)
C	20,131 \pm 0,072	110,2 \pm 0,028	10,448 \pm 0,027	190,66 \pm 0,057
T	34,368 \pm 0,035*	77,103 \pm 0,053*	60,16 \pm 0,032*	300,761 \pm 0,038*
CH	37,553 \pm 0,029*	66,27 \pm 0,133*	70,07 \pm 0,056*	330,565 \pm 0,064*
HC	34,711 \pm 0,021*	70,381 \pm 0,188*	59,903 \pm 0,024*	323,401 \pm 0,090*
CI	40,785 \pm 0,036*	62,373 \pm 0,028*	110,126 \pm 0,070*	390,04 \pm 0,042*
IC	35,285 \pm 0,028*	69,196 \pm 0,016*	61,34 \pm 0,037*	325,951 \pm 0,040*

Groupe C : rats intoxiqués avec le CCl₄, **Groupe T** : rats normaux, **Groupe CH** : rats intoxiqués au CCl₄ puis traités avec 400 mg/Kg/j de HT, **Groupe HC** : rats traités avec 400 mg/Kg/j de HT ensuite intoxiqués au CCl₄, **Groupe CI** : rats intoxiqués au CCl₄ puis traités avec 20 mg/Kg/j de FI, **Groupe IC** : rats traités avec 20 mg/Kg/j de FI puis intoxiqués au CCl₄.

GSH : glutathion réduit, **MDA** : malondialdéhyde, **CAT** : catalase, **SOD** : superoxyde dismutase.

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm Ecart-type, (N = 6); * $p \leq 0.05$ différence significative contre le groupe de rats traité par le tétrachlorure de carbone.

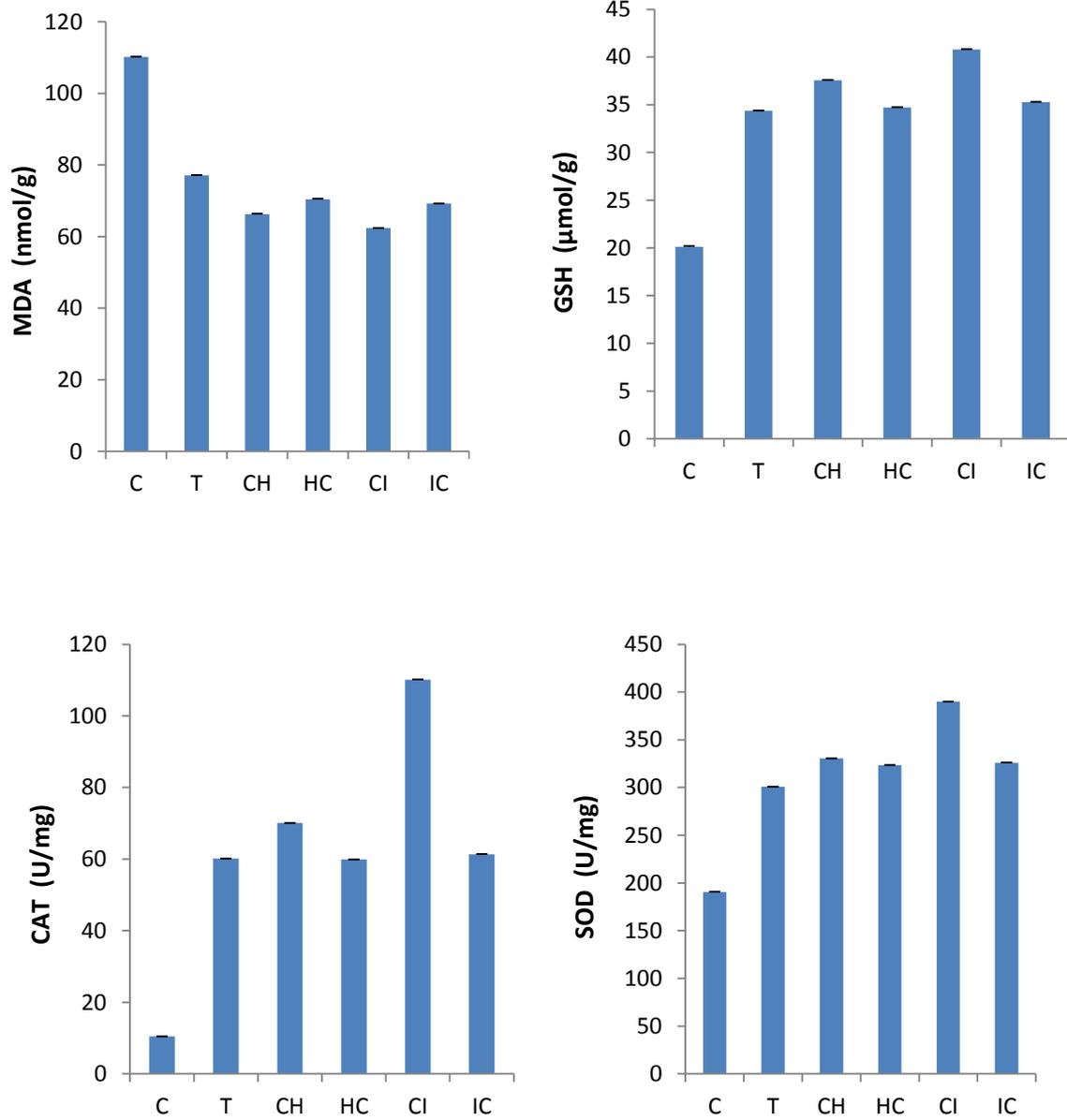


Figure 37. Effet des extraits HT et FI des graines de *Nigella sativa* sur les marqueurs du stress oxydatif au niveau tissulaire.

4.2. Effet des extraits sur les marqueurs du stress oxydatif plasmatique

Pour estimer l'effet de nos extraits sur le stress oxydatif, on a dosé au niveau plasmatique certains marqueurs à savoir : le glutathion réduit (GSH) le malondialdéhyde (MDA), la catalase (CAT) et la superoxyde dismutase (SOD). Le stress oxydatif induit par le tétrachlorure de carbone a été illustré par une augmentation de la peroxydation lipidique comme le démontre le taux du MDA élevé : 98 nmol/mg de protéines par rapport à 60 nmol/mg du lot témoin ; une diminution du taux du GSH : 1,1 μ mol/mg par rapport à 2 μ mol/mg du lot témoin ; ainsi par une diminution de l'activité des enzymes antioxydantes CAT (9 U/mg par rapport à 20 U/mg du lot témoin) et SOD (35 U/mg par rapport à 49 U/mg du lot témoin).

L'administration de HT et FI en curatif ou en préventif a significativement diminué le taux du MDA (43 nmol/mg pour le groupe CI par rapport à 98 nmol/mg du groupe traité par le CCl₄). Elle a augmenté de façon significative le taux du GSH (2,69 μ mol/mg pour le groupe CI par rapport à 1,1 μ mol/mg du groupe traité par le CCl₄) ainsi que l'activité des enzymes antioxydantes CAT (40 U/mg pour le groupe CI par rapport à 9 U/mg du groupe traité par le CCl₄) et SOD (54 U/mg pour le groupe CI par rapport à 35 U/mg du groupe traité par le CCl₄). Les résultats sont illustrés dans la figure 38 et le tableau 13 ci-dessous.

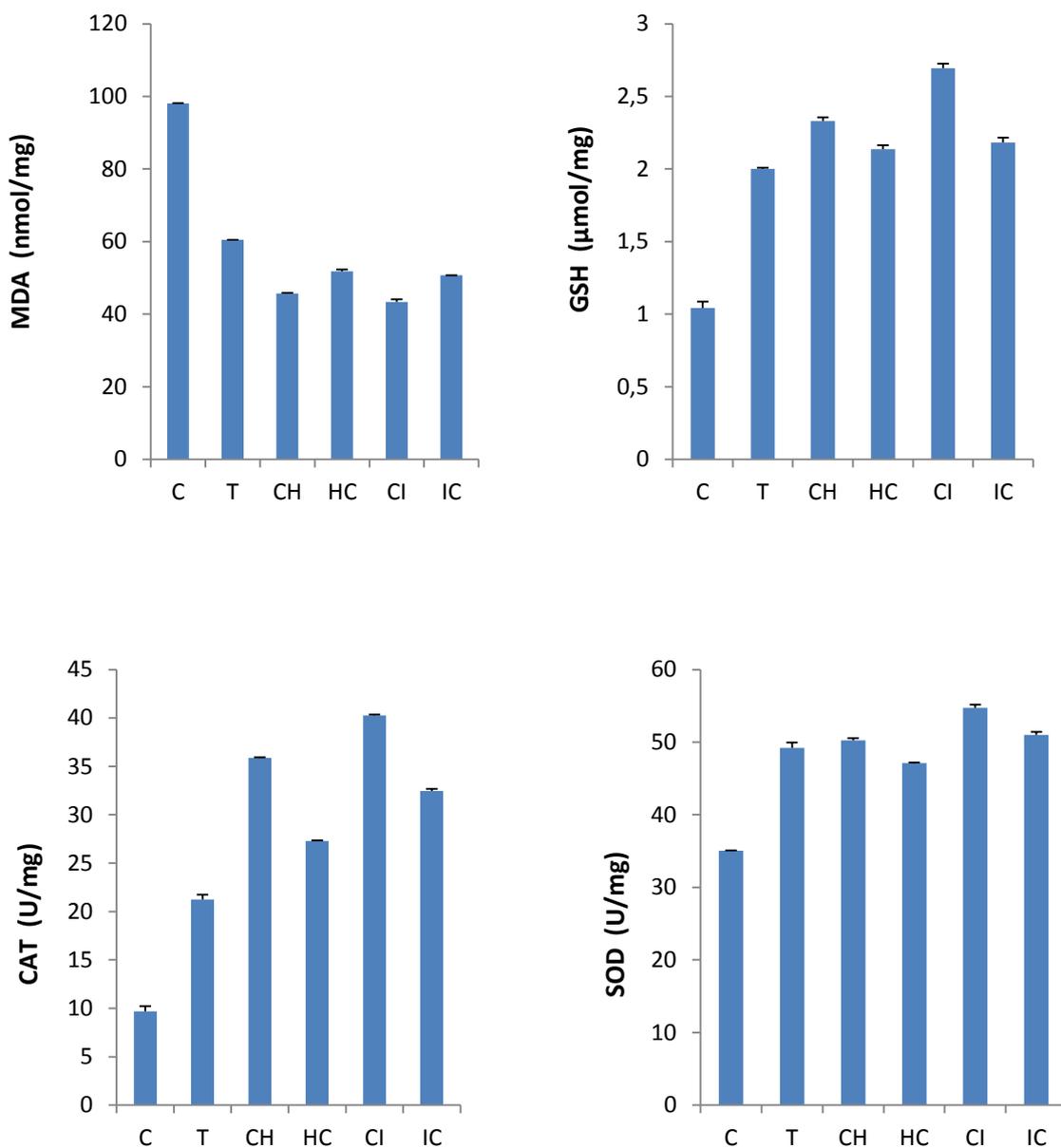


Figure 38. Effet des extraits HT et FI des graines de *Nigella sativa* sur les marqueurs du stress oxydatif au niveau plasmatique

Tableau 13. Effet de HT et FI des grains de *Nigella sativa* sur certains marqueurs du stress oxydatif plasmatique chez des rats hépatotoxiqués.

Groupes	Paramètres			
	GSH ($\mu\text{mol/mg}$)	MDA (nmol/mg)	CAT (U/mg)	SOD (U/mg)
C	1,043 \pm 0,044	98,111 \pm 0,061	9,673 \pm 0,536	35,065 \pm 0,027
T	2 \pm 0,008*	60,453 \pm 0,010*	21,258 \pm 0,480*	49,193 \pm 0,746*
CH	2,33 \pm 0,026*	45,711 \pm 0,192*	35,871 \pm 0,067*	50,25 \pm 0,273*
HC	2,136 \pm 0,028*	51,846 \pm 0,424*	27,293 \pm 0,06*	47,12 \pm 0,090*
CI	2,695 \pm 0,03*	43,373 \pm 0,076*	40,253 \pm 0,083*	54,701 \pm 0,465*
IC	2,183 \pm 0,032*	50,698 \pm 0,065*	32,468 \pm 0,195*	50,988 \pm 0,452*

Groupe C : rats intoxiqués avec le CCl₄, **Groupe T** : rats normaux, **Groupe CH** : rats intoxiqués au CCl₄ puis traités avec 400 mg/Kg/j de HT, **Groupe HC** : rats traités avec 400 mg/Kg/j de HT ensuite intoxiqués au CCl₄, **Groupe CI** : rats intoxiqués au CCl₄ puis traités avec 20 mg/Kg/j de FI, **Groupe IC** : rats traités avec 20 mg/Kg/j de FI puis intoxiqués au CCl₄.

GSH : glutathion réduit, **MDA** : malondialdéhyde, **CAT** : catalase, **SOD** : superoxyde dismutase.

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm Ecart-type, (N = 6); * $p < 0.05$ différence significative contre le groupe de rats traité par le tétrachlorure de carbone.

5. Discussion

La présente étude a été établie en trois volets complémentaires. Au premier volet, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de 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 divers essais sur l'huile de ces graines (Ramdan et Mörsel, 2002 a, 2002b). 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 obtenu avoisine les 30%. Cette valeur est légèrement plus faible que celles citées 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), d'autres facteurs entrent en jeu également, à savoir, les facteurs écologiques, l'origine géographique, les pratiques agronomiques et les conditions du stockage (Atta, 2003; Bourgou, 2008; Hamrouni-Sellami, 2008).

Dans un second temps, on a opté pour l'extraction des insaponifiables qui requièrent une importance majeure vu leur richesse en composés biologiques actifs, il s'agit des phytostérols, des vitamines liposolubles et d'autres métabolites secondaires lipophiles différents des lipides classiques. Cinq grands groupes de substances sont présents dans la plupart des insaponifiables de matières grasses végétales : les hydrocarbures saturés ou insaturés, les alcools aliphatiques ou terpéniques, les stérols, tocophérols et tocotriénols, et les pigments caroténoïdes, notamment les xanthophylles, donc malgré sa faible teneur dans l'huile, la fraction insaponifiable revêt une importance capitale grâce aux nobles composés qu'elle contient (Rahmani, 2006).

Le rendement de l'extraction a été estimé à 2,5%, un taux bien inférieur 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'Égypte (0,66 %), (Üstun et *al.*, 1990).

L'étape de caractérisation de nos deux matrices (huile totale et insaponifiables) a permis de déterminer la teneur de chacune en alpha-tocophérol, composés phénoliques et flavonoïdes ; et de souligner la richesse de la fraction insaponifiable en ces composés.

Les tocophérols figurent comme des constituants cruciaux dans la fraction insaponifiable grâce à leurs activités vitaminique et antioxydante. L'huile totale est majoritairement constituée de composés apolaires (environ 97%) et une petite quantité de composés polaires dont les composés phénoliques (Ramadan et Morsel, 2003).

Le deuxième volet de l'étude avait comme objet d'évaluer l'activité antioxydante des deux extraits via divers tests *in vitro* : effet scavenger des radicaux DPPH, ABTS, H₂O₂ et OH[•], du moment où la toxicité du CCl₄ est essentiellement due à l'apparition de radicaux libres ou des espèces réactives de l'oxygène qui sont susceptibles d'épuiser l'activité des systèmes enzymatiques antioxydants de la cellule (SOD, CAT, etc.), et qui induisent une peroxydation lipidique aboutissant à l'augmentation du niveau intracellulaire du MDA et à la destruction des membranes cellulaires (Conso, 2000). Les tests d'inhibition de la peroxydation lipidique et d'hémolyse ont été également établis. Les résultats qui en découlent montrent que nos extraits ont une grande capacité à réagir avec les radicaux libres afin de les convertir en espèces non réactives et interrompre la chaîne de réactions radicalaires et de ce fait protègent contre les effets délétères de la peroxydation lipidique.

Ces résultats représentaient une ébauche pour le troisième volet de l'étude et nous ont orienté concernant le rôle des constituants majeurs de l'huile totale et la fraction des insaponifiables dans leur effet hépatoprotecteur face à l'intoxication induite par le CCl₄.

Le troisième volet était donc consacré à l'étude de l'activité hépatoprotective des susdits extraits et à notre connaissance, c'est une première quant à la fraction insaponifiable. L'huile d'olive utilisée pour préparer la solution d'intoxication est sans inconvénient sur les rats, elle peut même avoir un effet de protection en provoquant une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes et la diminution des signes de dommage au niveau du foie (Visioli et *al.*, 2002 ; Nakbi et *al.*, 2010).

La congestion observée sur le foie de certains animaux du lot témoin traité avec le solvant de dilution du CCl₄ serait liée à l'effet solvant direct qui est observé lors des tests d'hépatoprotection utilisant des hépatotoxiques apolaires comme inducteurs de l'hépatotoxicité et dont l'administration nécessite leur dilution dans un solvant lipophile (Fleurentin et Joyeux, 1990). Le CCl₄ est un hépatotoxique à action obligatoire et prévisible de type indirect

(Testud, 2005). On sait que le CCl₄ est un hépatotoxique dose dépendant. Sa toxicité est essentiellement due à l'apparition de radicaux libres ou des formes toxiques de l'oxygène qui induisent une peroxydation lipidique aboutissant à la destruction des membranes cellulaires (Conso, 2000). L'augmentation du taux des transaminases et de la phosphatase alcaline est une indication claire de leur fuite cellulaire et de la perte de l'intégrité fonctionnelle de la membrane résultant de lésions du foie (Saraswat et al., 1993).

La capacité des substances hépatoprotectrices à réduire les effets dommageables ou à préserver les mécanismes du fonctionnement du foie contre les perturbations d'une hépatotoxine, est un indice de leur effet protecteur (Krishna et al., 2010; Sakr et al., 2011).

La réduction très significative des taux des enzymes hépatiques après prétraitement avec l'huile totale et la fraction des insaponifiables des graines de *Nigella sativa* suggère que ces dernières sont hépatoprotectrices. Il a été suggéré que l'effet protecteur des extraits de plantes contre les dommages du foie induits par le CCl₄ peut être attribué à la présence de tels constituants : flavonoïdes, tanins, triterpénoïdes et alcaloïdes (Gilani et Janbaz, 1995; Tran et al., 2001; Gupta et al., 2004).

Les flavonoïdes sont connus pour être des antioxydants, des piègeurs de radicaux libres et anti-lipoperoxidants ce qui procure de l'hépatoprotection (Yuting et al., 1990; Cook and Samman 1996; Khalid et al., 2002; Al-Qarawi, et al., 2004; Mankani et al., 2005).

Il a été rapporté que *Nigella sativa* dispose d'une activité antioxydante in vitro (Ramadan et al., 2003; Badary et al., 2003; Mosbah et al., 2015) et in vivo (El-Saleh et al., 2004; Atta et al., 1998), principalement liée aux composants lipidiques des graines.

L'analyse de l'huile totale par CG (chromatographie en phase gazeuse) et HPLC a permis de révéler sa composition en acides gras, triglycérides, stérols et alcools supérieurs.

Ces résultats indiquent sa richesse en composés lipidiques bioactifs expliquant ainsi les propriétés pharmacologiques que l'on a attribuées (Boudiaf et al., 2010; Sobhi et al., 2011).

L'administration des deux extraits entraîne une réduction des effets de l'hépatotoxique c'est-à-dire des signes de souffrance hépatique : stéatose, congestion, clarification et ballonnisation des hépatocytes, infiltrat inflammatoire (figures 27, 28, 29 et 30). Les résultats des tests préventifs (figures 27, 28) montrent que les extraits n'ont pas été en mesure de réparer totalement les lésions hépatocytaires induites par le CCl₄ mais pourraient les limiter, cependant, les résultats des tests curatifs étaient spectaculaires « disparition des signes d'intoxication : foie normal »

(figures 29, 30), dans les deux cas, l'effet hépatoprotecteur était meilleur avec la fraction des insaponifiables.

L'hépatoprotection assurée par l'huile totale et la fraction insaponifiable extraites des graines de *Nigella sativa* se manifestait aussi par une diminution du taux du MDA ainsi que par une augmentation de l'activité des systèmes de défense antioxydants GSH, SOD et CAT dans le plasma et le foie. Cet effet suggère que ces dernières ont tendance à prévenir les lésions hépatiques et de supprimer la fuite des enzymes vers le courant circulatoire en préservant les membranes hépatocytaires, une étude a déjà démontré que l'huile totale de la susdite plante possède une importante activité antihémolytique *in vitro* (Mosbah *et al.*, 2015).

Les résultats des dosages des marqueurs hépatiques (ALAT, ASAT, PA) allaient dans le même sens vu que les diminutions des taux de ces derniers étaient meilleures avec la fraction des insaponifiables qu'avec l'huile totale et en traitement curatif qu'en traitement préventif.

L'administration réitérée des extraits protège donc contre l'hépatotoxicité provoquée par le CCl₄. Au total, le traitement curatif avec la fraction des insaponifiables semble avoir le meilleur effet hépatoprotecteur face à l'intoxication au CCl₄.

En outre, nos deux extraits se sont avérés néphroprotecteurs face à la tubulopathie aigüe occasionnée par le CCl₄, cet effet protecteur a été exprimé par le rétablissement des taux sanguins de la CREA et de l'URE aux normes et par la régénération de l'épithélium tubulaire. Une preuve biologique mesurable vient d'être apportée à l'efficacité de nos extraits comme de puissants agents hépatoprotecteurs et même néphroprotecteurs.

Conclusion

La présente étude a permis, via des tests *in vivo* et d'autres *in vitro*, de caractériser l'huile des graines de *Nigella sativa* ainsi que sa fraction insaponifiable, d'étudier leur activité antioxydante et d'évaluer leurs effets hépato et rénoprotecteur.

En effet, nos deux extraits ont montré une richesse en composés bioactifs (flavonoïdes, polyphénols, alpha-tocophérol), la fraction insaponifiable était plus riche en alpha-tocophérol ; leur pouvoir antioxydant intéressant a été élucidé par la capacité de piéger les radicaux libres, l'aptitude à inhiber la peroxydation lipidique ainsi que par le test d'hémolyse ; leurs puissantes vertus hépato et rénoprotectrices sont attestées par la réduction du taux des marqueurs hépatiques (ASAT, ALAT et PA) obtenue grâce aux traitements avec les extraits de plante (huile totale et insaponifiables), le rétablissement à la normale des taux sanguins de la CREA et de l'URE, l'histologie des foies des animaux qui montre des foies en meilleur état morphologique et architectural que ceux des animaux intoxiqués, la régénération de l'épithélium tubulaire et par l'amélioration du statut des enzymes et molécules antioxydantes (SOD, CATA, GSH, MDA).

L'ensemble des résultats ouvrent de nouvelles perspectives dans l'étude de l'effet hépatoprotecteur de *Nigella sativa*, à savoir la caractérisation des molécules de la fraction des insaponifiables, Cette étude permettrait de proposer de nouvelles molécules d'origine naturelle comme hépatoprotecteurs, rappelons ici que les molécules commercialisées en l'occurrence et dédiées à cet effet sont bien rares. Les perspectives d'avenir de la fraction insaponifiable semblent prometteuses, ce travail peut être une ébauche à la mise en œuvre des essais cliniques en vue de la mise au point d'un nouveau remède.

Références bibliographiques

- Abdel-Aal E, Attia R. Characterization of Black cumin (*Nigella sativa*) seeds. Alexandria Science Exchange Journal.1993; 14: 497-482.
- Aebi H. Catalase *in vitro*.Methods in Enzymology.1984; 105: 121-126.
- Al-Ghamdi, The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of *Nigella sativa*, *J. Ethnopharmacol*, 2001 Jun;76(1):45-8.
- Al-Ghamdi, Protective effect of *Nigella sativa* seeds against carbon tetrachloride-induced liver damage, *Am. J. Chin. Med.* 31, 721 (2003).
- Ali, G. Blunden, Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*, *Phytother. Res.* 17, 299 (2003).
- Ali, The effect of *Nigella sativa* oil on gentamicin nephrotoxicity in rats, *Am. J. Chin. Med.* 32, 49 (2004).
- Al-Kubaisy K, Al-Noaemi MA. Protective role of *Nigella sativa* oil against the harmful effect of CCl₄ on the liver cells. *The internet journal of nutrition and wellness*.2007; 3: 1-12.
- Al-Qarawi A A, Mousa H M, Ali B H, Abdel-Rahman H, El-Mougy S A. Protective effect of extracts from dates (*Phoenix dactylifera* L.) on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Intern J Appl Res Vet Med*.2004;2:176–180.
- Al-saleh I, Billedo G, El-Doush I. Levels of selenium, DL- α - tocopherol, DL- γ -tocopherol, all-trans-retinol, thymoquinone and thymol in different brands of *Nigella sativa* seeds. *Journal of Food Composition and Analysis*.2006; 19: 167-175.
- Atta, K. Imaizumi, Antioxidant activity of nigella (*Nigella sativa* L.) seeds extracts, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.* 47, 49 (1998).

- Banskota A H, Tezuka Y, Adnyana I K, Midorikawa K, Matsushige K, Message D, Huertas A A, Kadota S. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *J. Ethnopharmacol.* 2000;72:239–246.
- Awad, In vitro decrease of the fibrinolytic potential of cultured human fibrosarcoma cell line, HT1080, by *Nigella sativa* oil, *Phytomedicine.* 12, 100 (2005).
- Boudiaf K., Houcher Z., Sobhi W., Benboubetra M. Evaluation of Antioxidant and Anti-Xanthine Oxidoreductase Activities of *Nigella sativa* Linn seeds' extracts. *JABS, 4 (1): 7-16, 2010.R*
- Bourgou S, Ksouri R, Bellila A, Skandrani I, Falleh H, Marzouk B. Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *Comptes Rendus Biologies.*2008; 331: 48-55.
- Brai BI, Adisa RA, Odetola AA. Hepatoprotective Properties of Aqueous Leaf Extract of *Persea Americana*, Mill (Lauraceae) 'Avocado' Against CCL₄-Induced Damage in Rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med.*2014;11(2):237-244.
- Burits M, Bucar F. Antioxydant activity of *Nigella sativa* L. essential oil. *Phytotherapy Research.* 2000; 14: 323-328.
- Carlson DA, Smith AR, Fischer SJ, Young KL, Packer L. « The plasma pharmacokinetics of R-(+)-lipoic acid administered as sodium R-(+)-lipoate to healthy human subjects ». *Altern Med Rev.*2007 Dec;12(4):343-351.
- Chaitanya KV, Pathan AAK, Mazumdar SS, Chakravarthi GP, Parine N, Bobbarala V. Role of oxidative stress in human health: An overview. *Journal of Pharmacy Research.*2010; 3: 1330-1333.

Cheikh-rouhou S, Besbes S, Lognay G, Blecher VC, Deroanne C, Atti H. Sterol composition of black cumin (*Nigella sativa*) and Aleppo pine (*Pinushalepensis* Mill.) seed oils. *Journal of Food Composition and Analysis*.2008; 21: 162-168.

Chyka PA, Butler AY, Holliman BJ, Herman MI. Utility of Acetyl cysteinein treating poisonings and adverse drug reactions. *Drug Saf* 2000;22:123—48.

Conso F, Hermouet C. Maladies hépatiques toxiques d'origine professionnelle. *Encycl Méd Chir* (Elsevier, Paris). Toxicologie-Pathologie professionnelle, 16-530-J-10. 1993 : 7 p.

Cook N C, Samman S. Flavonoids -chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J Nutr Biochem*. 1996;7:66–76.

David JM, Arditti-Djiane J. Intoxications par les plantes. In :Danel V, Barriot P, Eds. Intoxications aiguës en réanimation. 2^e éd.Paris : Arnette ; 1999. p. 573-74.

Didier Bereau. Oils and unsaponifiables fraction of eight species of Amazonian palms.2001;128 Diméthylformamide. Fiche toxicologique n° 69. *Institut national de Recherche et de Sécurité*. 2000.

El-Dakhakhny M. Studies on the chemical constitution of Egyptian *Nigella sativa* L seeds. The essential oil. *Planta Medica*. 1965; 11: 465-470.

El-Dakhakhny, N.J. Madi, N. Lembert, 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).

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)

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).

- 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).
- Faulstich H, Zilker TR. Amatoxins. In: Spoerke DG, Rumack BH, Eds. Handbook of mushroom poisoning. Diagnosis and treatment. Boca Rota: *CRC Press*; 1994. p. 233-48
- Fleurentin J., Joyeux M. The tests in vivo and in vitro evaluation of anti-hepatotoxic properties of the original substances In natural Ethnopharmacology: sources, methods, goals. Proceedings of the 1st European Conference of Ethnopharmacology, Metz, 22-25 May 1990. Ed. ORSTOM; 248-269.
- Fromenty B, Pessayre D. Inhibition of mitochondrial β -oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacol Ther*, 1995 ; 67 : 101-54.
- 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).
- Gani MS, John AS. Evaluation of hepatoprotective effect of *Nigella sativa* L. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2013; 5: 428-430.
- Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z, Jore D. Espèces réactives de l'oxygène: Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique*, - novembre-décembre. 2003; 91-96.
- Gilani A, H, Janbaz K H. Preventive and curative effects of *Artemisia absinthium* on acetaminophen and CCl₄-induced hepatotoxicity. *Gen Pharmacol*. 1995;26:309–315.
- Gilani A, Jabeen Q, Khan M. A review of medicinal uses and pharmacological activities of *Nigella sativa*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2004; 7: 441-451.

- Giustarini D, Dalle-Donne I, Tsikas D, Rossi R. Oxidative stress and human diseases: origin, link, measurements, mechanisms and biomarkers. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*.2009; 46: 241-281.
- Greenish HG. Contribution to the Chemistry of *Nigella sativa*. *Journal of Pharmacy*.1880; 10: 909-911.
- Guillouzo A., Clerc C., Malledent Y., Cvhesne C., Ratanasavanh D., Gugen-Guillouzo C. Study Models liver cytoprotection. *Gastroenterol.Clin. Biol.*, 1989;13 : 725-730.
- Gupta M, Mazumder U K, Kumar T S, Gomathi P, Kumar R S. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Bauhinia racemosa* against paracetamol and carbon tetrachloride induced liver damage in rats. *Iranian J Pharmacol Therapeut*. 2004; 3:12–20.
- 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. Immunopharmaol*. 21, 283 (1999).
- Heimberg M, Weinstein I, Dishmon G, Dunkerley A. The action of carbon tetrachloride on the transport and metabolism of triglycerides and fatty acids by the isolated perfused rat liver and its relationship to the etiology of fatty liver. *J Biol Chem*. 1962;237: 3623–3627.
- Hildebrand DH, Terao J, Kito M. Phospholipids plus tocopherols increase soybean oil stability. *Journal of The American Oil Chemists Society*. 1984; 61: 552-525.
- 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).
- Jacqueson A, Piriou A. Mécanismes et manifestations de l'action toxique au niveau hépatique. Toxicologie. Collection Le Moniteur Internat. 2^e éd. Rueil-Malmaison : Éditions Groupe Liaisons SA ; 1999. p. 59-78.

- Jones AL. Mechanism of action and value of *N*-acetylcysteine in the treatment of early and late acetaminophen poisoning: A critical review. *J Toxicol Clin Toxicol* 1998;36:277—85.
- Kaplowitz N. Biochemical and cellular mechanisms of toxic liver injury. *Semin Liver Dis* 2002;22:137—44.
- Jones AL, Dargatzis PI. Hepatic toxicology. In: Shannon MW, Boron SW, Burns MJ, editors. Haddad and Winchester's clinical management of poisoning and drug overdose. Philadelphia: Saunders: *Elsevier*; 2007. p. 223—48.
- 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).
- Kennon J. Heard, M.D. Acetyl cysteine for Acetaminophen Poisoning. *N Engl J Med.* 2008 Jul 17; 359(3): 285–292.
- Khalid H J, Sheikh A S, Anwar H G. Protective effect of rutin on paracetamol and CCl_4 -induced hepatotoxicity in rodents. *Fitoterapia.* 2002;73:557–563.
- Kierszenbaum ,*Histologie et biologie cellulaire, 2006-* 619 pages
- Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nature Medicine* 2000 ; 6 : 513-9. *Lavoisier*, Paris. Lipides et corps gras alimentaires, édition technique et alimentaire.
- Lin S C, Yao C J, Lin C C, Lin Y H. Hepatoprotective activity of Taiwan folk medicine: *Eclipta prostrata* Linn. against various hepatotoxins induced acute hepatotoxicity. *Phytother Res.* 1996;10:483–490.
- Lydia Ferrara. Use Of *Chrysanthellum Americanum* (L.) Vatke As Supplement. *European Scientific Journal (ESJ).* 2013; VOL 9, NO 36

- Mankani K L, Krishna V, Manjunatha B K, Vidya S M, Jagadeesh Singh S D, Manohara Y N, Raheman A, Avinash K R. Evaluation of hepatoprotective activity of stem bark of *Pterocarpus marsupium* Roxb. *Indian J Pharmacol.* 2005;37:165–168.
- Martin E., Feldmann G. Histopathology of liver and biliary tract in adults and children. Ed. *Masson*, Paris.1983; 357 pages.
- McCay P B, Lai E K, Poyer J L, DuBose C M, Janzen E G. Oxygen and carbon-centred free radical formation during carbon tetrachloride metabolism. *J Biol Chem.* 1984;259: 2135–2143.
- Meeks RG, Harrison SD, Bull RJ, (1991). *Hepatotoxicology*, 700 p.
- Mégarbane, N. Deye, F. Baud. Foie toxique : mécanismes lésionnels et thérapeutiques pharmacologiques spécifiques. *Réanimation* (2007) **16**, 632—642
- Meziti A, Meziti H, Boudiaf K, Mustapha B, Bouriche H. Polyphenolic profile and antioxidant activities of *Nigella sativa* seed extracts *in vitro* and *in vivo*. *World Academy of Science, Engineering and Technology.*2012; 64: 24–32.
- Milane H. La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat de l'université de Louis Pasteur. 2004.
- Mollazadeh H, Hosseinzadeh H. The protective effect of *Nigella sativa* against liver injury: a review. *Iranian journal Basic Medical Sciences.*2014; 17: 958-966.
- Mosbah A., Sobhi W., Benboubetra M. Antioxidant and anti-hemolytic activities of Algerian *Nigella sativa* oil and its neutral lipid fraction. *Int J Pharm and Pharm Sci.* 2015, Vol 7, Issue 11, 50-54.

- Nagi MN, Alam K, Badary OA, al-Shabanah OA, Al-Sawaf HA, Al-Bekairi AM.
Thymoquinone protects against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice via an antioxidant mechanism. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 1999; 47: 153-159.
- Navarro VJ, Senior JR. Drug-related hepatotoxicity. *N Engl J Med* 2006;354:731—9.
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).
- Pessayre D, Haouzi D, Fau D, Robin MA, Mansouri A, Berson A. Withdrawal of life support, altruistic suicide, fratricidal killing and euthanasia by lymphocytes : different forms of drug-induced hepatic apoptosis. *J Hepatol.* 1999 ; 31 : 760-70.
- Pessayre D, Berson A, Fromenty B, Mansouri A. Mitochondria in steatohepatitis. *Sem Liver Dis* 2001 ; 22 : 57-69
- Plaa, G.L., and M. Charbonneau.2001. Detection and evaluation of chemically induced liver injury. *In principles and methods of toxicology, 4th ed.*, ed. A.W. Hayes, pp.1145 – 1187. Philadelphia: Taylor & Francis.
- Prescott LF, Park J, Ballantyne A, Adriaenssens P, ProudfootAT. Treatment of paracetamol (acetaminophen) poisoning with N-acetylcysteine. *Lancet.* 1977;2:432–4.
- Ramadan MF, Mörsel JT. Characterization of phospholipid composition of black cumin (*Nigella sativa L.*) seed oil. *Nahrung.* 2002; 46:240-244.
- 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).

- Ramadan MF. Nutritional value, functional properties and nutraceutical applications of black cumin (*Nigella sativa* L.): an overview. *International Journal of Food Science and Technology*.2007; 42: 1208-1218.
- Robak J, Gryglewski RJ. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochemical pharmacology*.1988; 37: 837-841.
- Sakr S A, Mahran H A, Lamfon H A. Protective effect of ginger (*Zingiberofficinale*) on adriamycin-induced hepatotoxicity in albino rats. *J Med Plant Res*. 2011;5:133–140.
- Salem ML. Immunomodulatory and therapeutic properties of *Nigella sativa* L. seed. *International Immunopharmacology*.2005; 5: 1749-1770.
- Sánchez-Fidalgo, A. Cárdeno, M. Sánchez-Hidalgo, M. Aparicio-Soto, I. Villegas, M.A. Rosillo, C. Alarcón de la Lastra. Dietary unsaponifiable fraction from extra virgin olive oil supplementation attenuates acute ulcerative colitis in mice. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 48 (2013) 572–581
- Sandhar HK, Kumar B, Prasher S, Tiwari P, Salhan M, Sharma P. A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *Internationale Pharmaceutical Scientia*.2011;1: 25-41.
- Saraswat B, Visen P K, Patnaik G K, Dhawan B N. Anticholestic effect of picroliv, active hepatoprotective principle of *Picrorhizakurrooa*, against carbon tetrachloride induced cholestatis. *Indian J Exp Biol*. 1993;31:316–318.
- Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG, (2001). Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis*, 21 : 351-72.
- Sebei K, Boukhchina S, Kallel H. Évolution des tocophérols en relation avec les acides gras insaturés au cours de la maturation des graines de colza de printemps. *C R Biol*. 2007 ; 330:55-61.

Sibulesky L. Normal liver anatomy. *Clinical Liver Disease*.2013; 2: 1-3.

Sircar D, Albazi SJ, Atallah Y, Pizzi W. Validation and application of an HPLC method for determination of di (2-ethylhexyl) phthalate and mono (2-ethylhexyl) phthalate in liver samples. *J Chromatogr Sci*. 2008 Aug;46(7):627-31.

Smirnoff N, Cumbes QJ. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*.1989; 28: 1057-1060.

Sobhi W., Khettal B., Belmouhoub M., Atmani D., Duez P., Benboubetra M. Hepatotoxicity and Langerhans Islets Regenerative Effects of Polar and Neutral Lipids of *Nigella sativa* L. in Nicotinamide/streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Pteridines / Vol. 22*, 2011, pp. 97 – 104

Tétrachlorométhane. Fiche toxicologique n° 8. *Institut national de Recherche et de Sécurité*. 1997.

Tran Q I, Adnyana I K, Tezuka Y, Nagaoka T, Tran Q K, Kadota S. Triterpenesaponins from Vietnamese ginseng (*Panaxvietnamensis*) and their hepatocytoprotective activity. *J Nat Prod*. 2001;64:456–461.

Valiollah H, Alireza G, Hadi J. Black cumin seed essential oil, as a potent analgesic and anti-inflammatory drug. *Phytotherapy Research*. 2004; 18: 195–199

Vidal 2015 : le dictionnaire.

Wang B J, Liu C T, Tseng C Y, Wu C P, Yu Z R. Hepatoprotective and antioxidant effects of *Bupleurumkaoi* Liu (Chao et Chuang) extract and its fractions fractionated using supercritical CO₂ on CCl₄-induced liver damage. *Food Chem Toxicol*. 2004;42:609–617.

Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.2004; 44: 275-295.

Yuting C, Rongliang Z, Zhongjian J, Yong J. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Rad Biol Med*. 1990;9:19–23.

Biotope : Milieu défini par des caractéristiques physicochimiques stables et abritant une communauté d'êtres vivants (ou biocénose). Le biotope et sa biocénose constituent un écosystème.

Pline l'Ancien : Ecrivain et naturaliste romain auteur d'une encyclopédie intitulée *Histoire naturelle*

L'éclectisme : Une attitude philosophique consistant à choisir dans plusieurs philosophies les éléments qui paraissent intéressants pour former un dispositif complet.

Stérol : Alcool polycyclique de masse moléculaire élevée. Les stérols ne peuvent pas être fabriqués par l'organisme humain. Ainsi, ils ne peuvent être apportés à l'organisme que par l'alimentation. Les **stérols** sont considérés comme une sous-classe des stéroïdes.

Etude randomisée est l'étude au cours de laquelle les participants sont répartis de façon aléatoire dans le groupe témoin et le groupe expérimental.

En double aveugle : les sujets et les investigateurs eux-mêmes n'ont pas connaissance du traitement reçu, pour supprimer tout jugement a priori.

Prébiotiques : Substances alimentaires composées d'oligosaccharides et de polysaccharides à courte chaîne, qui sont censés promouvoir de façon sélective la croissance de certaines bactéries

Cholestérose : **Dépôts** de cholestérol dans divers tissus

Cholangite sclérosante primitive (CSP) : Maladie hépatique choléstatique chronique caractérisée par une inflammation et une fibrose des voies biliaires.

Gingérol : composé phénolique de la famille des arylalcanes. Le gingérol est responsable de la saveur piquante du gingembre.

Coenzyme Q₁₀ =ubiquinone : benzoquinone pour laquelle **Q** fait référence au groupe quinone et **10** au nombre d'unités isopréniques, substance semblable à une vitamine liposoluble, présente dans les mitochondries, où elle participe à la chaîne respiratoire dans le cadre de la respiration cellulaire aérobie.

Saponosides : Hétérosides caractérisés par leurs propriétés tensio-actives : ils se dissolvent dans l'eau en formant des solutions moussantes. Sont des molécules Hémolytiques, Anti-inflammatoire, Anti-œdémateuses, Antimycosiques et Expectorantes

Carnitine : Composé comprenant une fonction ammonium quaternaire, elle est biosynthétisée à partir de lysine et de méthionine. Cette molécule intervient au sein de la cellule dans le transport des acides gras du cytosol vers les mitochondries lors du catabolisme des lipides dans le métabolisme énergétique. Cette molécule est souvent vendue en tant que complément alimentaire. La carnitine possède deux stéréo-isomères, sa forme biologique est la L-carnitine alors que la forme D est biologiquement inactive. La carnitine est utilisée de façon expérimentale comme adjuvant dans le traitement de l'angine de poitrine, de l'insuffisance cardiaque, de la cardiomyopathie et des suites d'un infarctus du myocarde. Indication : améliorer les performances physiques

Asperge est une plante potagère, on consomme les rhizomes

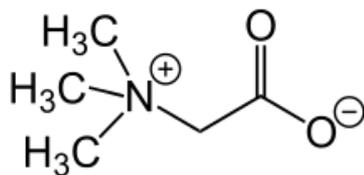
Aflatoxine : Mycotoxine produite par certains champignons proliférant notamment sur des graines conservées en atmosphère chaude et humide, possèdent un pouvoir cancérigène élevé.

β -glucuronidase : Une glycoside hydrolase qui dégrade des glucides complexes. Se trouve dans les lysosomes. Dans l'intestin, elle convertit la bilirubine conjuguée sous sa forme non conjuguée pour la réabsorption.

Monoterpènes et sesquiterpènes : Éléments principaux des huiles essentielles, font partie de la classe des terpènes : les sesquiterpènes sont formés de trois unités isopréniques, Les monoterpènes de deux molécules d'isoprène

Aryl hydrocarbure hydroxylase : **Enzyme** qui convertit les substances chimiques cancérigènes dans la fumée de tabac et dans l'air pollué en cancérogènes actifs dans les poumons.

Bétaïnes : Composés zwitterioniques dont l'atome portant la charge positive ne porte pas d'atome d'hydrogène et n'est pas adjacent à l'atome portant la charge négative Un **zwitterion** ou **amphion** est une espèce chimique moléculaire possédant des charges électriques formelles d'une unité, de signes opposés et situées en général sur des atomes non adjacents



Homocystinurie : Maladie métabolique héréditaire rare qui peut conduire à une altération grave de l'état clinique du patient si un traitement ou un régime alimentaire ne sont pas rapidement mis en œuvre. Elle est due à un déficit d'une enzyme, la cystathionine bêta-synthase (CBS), qui provoque l'accumulation dans l'organisme d'acides aminés issus de la métabolisation des protéines apportées par l'alimentation à des niveaux toxiques. Ces acides aminés sont l'homocystéine et la méthionine qui sont normalement éliminés par voie urinaire

Extrait normalisé : Extrait qui a été réalisé conformément aux critères de la normalisation, ensemble des règles techniques établies afin d'améliorer le rendement.

Coloration trichrome de Masson : Utilisée pour différencier les fibres de collagène et le tissu musculaire dans des coupes histologiques. Associe trois colorants :

- un colorant nucléaire violet (hématoxyline)
- un colorant cytoplasmique rouge (fuchsine ponceau)
- un colorant des fibres de collagène vert (vert lumière)

Loi de Henry : « À température constante et à l'équilibre, la quantité de gaz dissout dans un liquide est proportionnelle à la pression partielle qu'exerce ce gaz sur le liquide. »

Écart type des moyennes : C'est une mesure de la dispersion des valeurs par rapport à la moyenne. Plus l'écart type est important, plus la dispersion est importante, ce qui signifie que la moyenne est peu représentative.

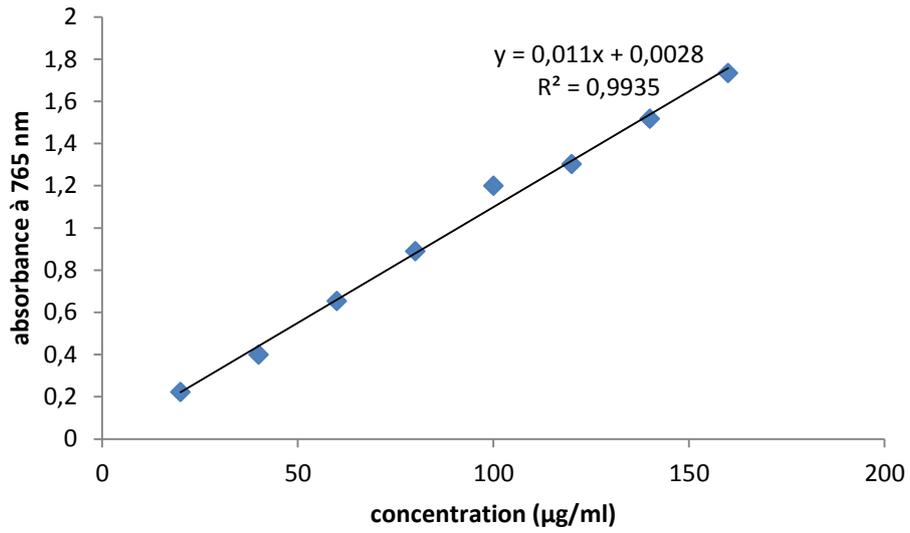
Valeur P : Est la probabilité pour un modèle statistique donné sous l'hypothèse nulle d'obtenir la même valeur ou une valeur encore plus extrême que celle observée.

La p-value est utilisée pour quantifier la significativité statistique d'un résultat dans le cadre d'une hypothèse nulle.

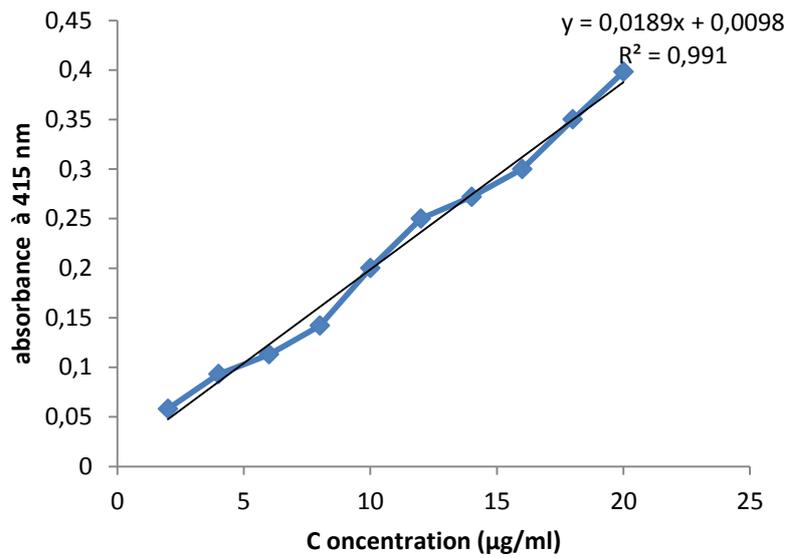
Pennatiséquées : Feuille découpée de manière symétrique par rapport à l'axe de la nervure centrale avec des lobes atteignant la nervure centrale.

Hermaphrodite : la fleur porte à la fois les organes mâles (étamines) et femelles (pistil)

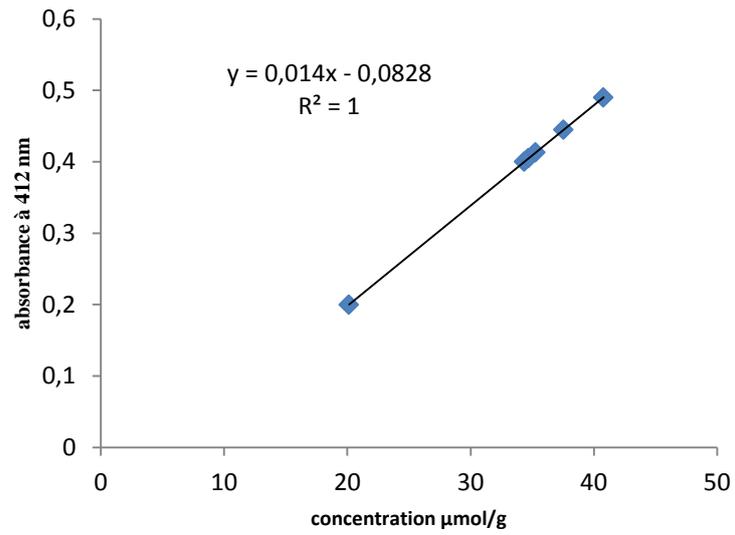
Nectarifère : Qui sécrète le nectar, liquide sucré attirant les insectes pollinisateurs



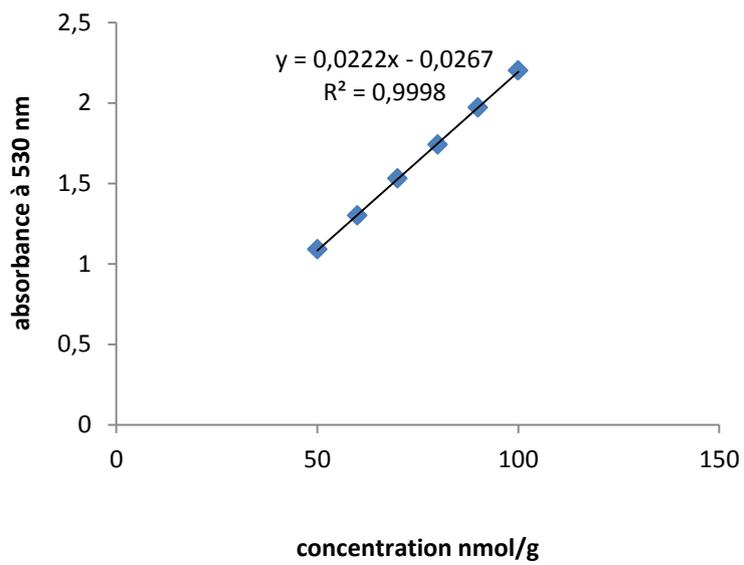
Figures 39. Droite d'étalonnage de l'acide gallique



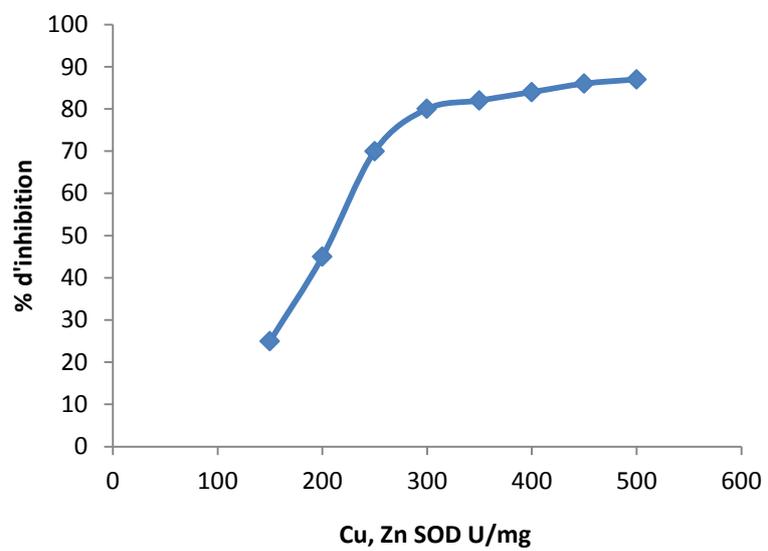
Figures 40. Droite d'étalonnage de la quercétine



Figures 41. Courbe standard du glutathion réduit



Figures 42. Droite d'étalonnage du MDA



Figures 43. Inhibition par le Cu, Zn SOD de la réduction du NBT dans le système xanthine-xanthine oxydase

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/321134324>

Antioxidant activity of Algerian Nigella sativata total oil and its unsaponifiable fraction

Article · November 2017

CITATIONS

0

READS

19

3 authors, including:



Widad Sobhi

University of Ferhat Abbas Sétif 1, Sétif , Algeria

17 PUBLICATIONS 10 CITATIONS

SEE PROFILE

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



research of new compounds for treatment of Diabetes [View project](#)



Thymoquinone and its derivative compounds as potent antitumor agents [View project](#)

The Journal of Phytopharmacology

(Pharmacognosy and phytomedicine Research)

Research Article

ISSN 2230-480X

JPHYTO 2016; 6(4): 234-238

July- August

Received: 25-03-2017

Accepted: 22-05-2017

© 2017, All rights reserved

Fatima Zohra Guergouri

a) Laboratory of Applied Biochemistry,
Faculty of Nature and Life Sciences,
University Setif 1, Setif 19000
Algeria,

b) Department of Pharmacy, Faculty of
Medicine, University Setif 1, Setif
19000 Algeria

Widad Sobhi

Laboratory of Applied Biochemistry,
Faculty of Nature and Life Sciences,
University Setif 1, Setif 19000 Algeria

Mustapha Benboubetra

^aLaboratory of Applied Biochemistry,
Faculty of Nature and Life Sciences,
University Setif 1, Setif 19000 Algeria

Correspondence:

Widad Sobhi

Laboratory of Applied Biochemistry,
Faculty of Nature and Life Sciences,
University Setif 1, Setif 19000 Algeria
Email: sobhiwidad[at]yahoo.fr

Antioxidant activity of Algerian *Nigella sativa* total oil and its unsaponifiable fraction

Fatima Zohra Guergouri, Widad Sobhi*, Mustapha Benboubetra

ABSTRACT

Background/Aim: *Nigella sativa*(NS) oil is usually considered as oxidatively stable, the aim of this study is to evaluate its antioxidant capacity in vitro and that of its unsaponifiable fraction by several mechanisms. **Methods:** NS seed total oil (TO) was extracted with n-hexane and this oil was further the matrix to extract the unsaponifiable fraction (UF). TO and its UF were investigated for the antioxidant activity using the following spectrophotometric assays: ABTS (2,2'-azino-bis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), DPPH (2, 2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and H₂O₂ (Hydrogen peroxide) radicals scavenging tests and lipid peroxidation inhibition capacity assay. All tests were realized by spectrophotometric methods. **Results:** Quantitative determination of phenols and flavonoids in TO and UF showed that UF has the highest phenolic and flavonoid concentrations with 24,73±0,51 µg GAE/g extract and 8,31±0,40 µg QAE/g extract respectively. All antioxidant assays showed that UF has the strongest antioxidant capacity with; IC₅₀ 0,455 ±0,01 mg/ml in ABTS scavenging assay, IC₅₀ 113,24 ±0,425 mg/ml in DPPH scavenging assay and IC₅₀ of 0,324±0,003 mg/ml in H₂O₂ scavenging assay, equally, UF has the strongest Lipid peroxidation inhibition capacity With a percentage inhibition of 57.5%. **Conclusion:** The results obtained in this investigation showed that the UF has an important antioxidant capacity, which make NS an attractive source of new therapeutic components.

Keywords: Antioxidant capacity, Flavonoid content, Lipid peroxidation inhibition capacity assay, *Nigella sativa*, Phenolic content.

INTRODUCTION

It is generally accepted that free radicals (also called pro-oxidants) and reactive oxygen species (ROS) play an important role in the development of tissue damage and pathological changes. An antioxidant is defined as a compound capable of preventing the pro-oxidation process, or biological oxidative damage. The organism must confront and control the presence of both pro-oxidants and antioxidants continuously [1]. Changing the balance toward an increase in the pro-oxidants over the capacity of antioxidants is defined as oxidative stress which is the origin of most pathologies [2]. 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.

Medicinal plants constitute an inexhaustible source of interesting bioactive compounds, that's why there is an increased interest in their use as therapeutic agents [3, 4]; in this respect, *Nigella sativa* is one of the most studied plants, it has a large therapeutic spectrum and has long been used as a natural remedy for a number of human illnesses and disorders [5, 6].

The oil of *Nigella sativa* is usually considered as oxidatively stable, it prevents the deterioration through the reducing of radical reactions responsible for lipid oxidation, also, the presence of tocopherol, carotenoid, phospholipids and phenolics improves its stability and its antioxidant properties [7, 8].

The unsaponifiable fraction contains carbohydrates, phospholipids, liposoluble vitamins, pigments, tocopherols, phytosterols and polyphenols [9] which are the most important natural antioxidants in the oil. The consumption of this oil in our food may protect us against oxidative damages. These natural antioxidants may function (a) as reducing agents, (b) as free radical scavengers, (c) as complexes of pro-oxidants metals, and (d) as inhibitors of the formation of singlet oxygen [10].

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Nigella sativa seeds come from the same batch of seeds procured from an herbalist. They are local, grown in the highlands of Northeastern Algeria (Batna and Biskra). Their identification was confirmed in the laboratory.

Seeds were washed, dried and powdered with an electric micronizer.

Total oil extraction

Seed powder was extracted in a Soxhlet-extractor with methanol solvent to get the methanol extract, to which we added n-hexane for obtaining the total oil. During the extraction, the extracted lipids required the addition of 0, 75 % aqueous sodium chloride solution. The solvent was removed on a rotary evaporator at 40°C. Total oil was collected in a flask and stored at 4°C for further analysis [11].

Unsaponifiable fraction extraction

UF was isolated following conventional procedures, as described IUPAC 2401.

In a 250 ml flask fitted with a condenser, we introduced 5 g of the total oil of *Nigella sativa* seeds, which we added 50 ml of alcoholic potassium hydroxide solution 2 M. The mixture is heated in a water bath for 1 hour and circular stirring. After cooling to a temperature below 25 ° C the content was transferred into a separatory funnel and 100 ml of water was added.

The mixture was washed (3 x 100 ml) with petroleum ether 40-60 ° C. Ethereal liquids are then combined in another separatory funnel containing 40 ml of water. After separating the two phases, the ethereal phase is recovered and washed initially with 40 ml of a potassium hydroxide solution at 30 g / l then with 40 ml of water. This washing is repeated several times until the aqueous phase is not alkaline anymore. The ethereal phase is transferred to another flask. After removal of the ether on a rotary evaporator at 30°C, the residue is dried at 100-105 ° C to constant mass [12]. The yield in all samples was 2,5%.

Total phenolics and flavonoid content

Total phenolics content was determined using the Folin-Ciocalteu product, which based on spectrophotometric method [13]. The reaction mixture was prepared by mixing 0,5 ml of extract solution, 2,5 ml of 10% Folin-Ciocalteu's reagent dissolved in water and 2,5 ml of NaHCO₃ (7,5%) solution then, samples were incubated at 45°C for 45min.

The absorbance was determined using spectrophotometer at 765 nm. Samples were prepared in triplicate for each analysis and the mean value of absorbance was obtained. Phenolic content was measured using garlic acid equivalent per gram of dried extract (µg GAE/g extract) by means of the garlic acid calibration curve.

Total flavonoid content has been measured by a spectrophotometric method using aluminum chloride as chromophore reagent [14]. The samples contained 1 ml of extract solution and 1 ml of 2% of AlCl₃ solution dissolved in methanol and then, they were incubated for an

hour at room temperature. The absorbance was determined using spectrophotometer at 415 nm. All samples were prepared in triplicate for each analysis and the mean value of absorbance was obtained. Flavonoid content was measured using quercetin equivalent per gram of dried extract (µg QAE/g extract).

ABTS radical scavenging assay

The ABTS (2,2'-azino-bis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) radical scavenging activity is based on the estimation of ABTS radical cation formation, the color of this ABTS radical compound is suppressed in the presence of antioxidant molecules, which have the ability of scavenging this radical.

ABTS*⁺ is generated by mixing 7mM of ABTS solution with 2,45 mM of potassium sulfate then the mixture is stored at room temperature for 16h. The solution is diluted to get an absorbance of 0,7±0,05 at 734 nm. To assess the antiradical activity of TO and UF, we added 2 ml of ABTS solution to 0,3 ml of test samples with different concentrations, measurements were taking after 30 min at 734 nm [15].

The antioxidant activity was estimated by calculating the percentage of the decrease in absorbance of different samples concentrations, using the following equation:

$$\text{Inhibition (\%)} = [(\text{Abs}_{\text{Control}} - \text{Abs}_{\text{Sample}}) / \text{Abs}_{\text{Control}}] \times 100$$

Where; A Control is the absorbance of the control reaction and A Sample is the absorbance of the sample. IC₅₀ value indicated the concentration of sample required to scavenge 50% of ABTS radicals, low IC₅₀ is equivalent of high scavenging capacity, and it's calculated by plotting percentage inhibition against different concentrations of oil [16].

DPPH radical scavenging activity

The second antioxidant activity is the DPPH (2, 2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging activity, that is based on the reduction of a methanol solution of DPPH* by an antioxidant molecule which play a role of a hydrogen donating and lead to the formation of the non-radical form DPPH [17]. The sample solutions were prepared by dissolving TO and UF in DMSO (Dimethylsulfoxide) solvent with different concentrations. The reaction mixture prepared by blending samples with DPPH solution, then we kept the mixture in the dark for 30 min before measuring the absorbance at 715 nm. The antioxidant capacity was estimated by changing in the reaction color from purple to yellow and it's calculated using the following formula:

$$\text{Inhibition (\%)} = [(\text{Abs}_{\text{Control}} - \text{Abs}_{\text{Sample}}) / \text{Abs}_{\text{Control}}] \times 100$$

Where; A Control is the absorbance of the control reaction and A Sample is the absorbance of the sample at 517 nm. IC₅₀ value indicated the concentration of sample required to scavenge 50% of DPPH radicals.

H₂O₂ radical scavenging assay

The ability of our samples to trap hydrogen peroxide was determined according to the method developed by [18]. This method is based on the absorption of H₂O₂ in UV.

The principle of the reaction is to neutralize hydrogen peroxide (H₂O₂) by an antioxidant which will facilitate its decomposition into molecules of water.

An H₂O₂ solution (40 mM) was prepared in phosphate buffer (0.02M) (pH = 7.4), 1.2 ml of this solution are added to 2 ml of standard or extract already prepared in methanol. After incubation for 10 min at room temperature, the absorbance was measured at 230 nm.

The percentage of the scavenger activity of the H₂O₂ radical is calculated according to the following formula:

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(\text{Abs}_{\text{Control}} - \text{Abs}_{\text{Sample}}) / \text{Abs}_{\text{Control}} \times 100}$$

Where; A Control is the absorbance of the control reaction and A Sample is the absorbance of the sample.

Lipid peroxidation inhibition capacity assay

This activity is determined according to the method of [19].

In a tube, 1 ml of pure ethanol is added to 10 mg of the extract, and 25.1 mg of linoleic acid are also added. Afterwards, 2 ml of phosphate buffer (0.05 M, pH = 7) are added to the above mixture and 1 ml of distilled water is then added, the solution thus prepared is incubated at 40 ° C. in the dark.

After 24 hours:

A volume of 25 µl of this solution is introduced into another test tube and 2.4 ml of 75% ethanol are added. 25 µl of ammonium thiocyanate are added thereafter. The tubes are set in the dark for 3 minutes.

25 µl of FeCl₂ / HCl is added and the absorbance is read at the spectrophotometer at 500 nm. The percentage inhibition of lipid peroxidation is calculated according to the following equation:

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(\text{Abs}_{\text{Control}} - \text{Abs}_{\text{Sample}}) / \text{Abs}_{\text{Control}} \times 100}$$

Where; A Control is the absorbance of the control reaction and A Sample is the absorbance of the sample.

Statistical analysis

The results were expressed as mean ±SD. The data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA), where the difference between groups and standards were determined by Tukey's test, using Graph Pad program, p value ≤ 0,05 was regarded as significant.

RESULTS

Determination of phenolics and flavonoids contents

Polyphenols are the most important compounds that are responsible for the antioxidant activity. To assess their levels in *Nigella sativa* TO and UF we used garlic acid as a standard compound. Result expressed

as µg of GAE/g of extract, using the standard curve equation

$$y = 0,011x + 0,002, R^2 = 0,993.$$

For quantification flavonoids, we used quercetin as a standard and the result was expressed as µg of Quercetin Equivalent per g of extract following the standard curve equation

$$y = 0,018x + 0,009, R^2 = 0,991.$$

Our results indicated that *Nigella sativa*UF showed the highest amount of polyphenols with 24,73±0,51 µg GAE/g extract, the TO contains 16,67±0,35 µg GAE/g extract. Moreover, total flavonoids content was found to be highest in UF with 8,31±0,40 µg QAE/g extract than that of TO with 3,83±0,02 µg QAE/g extract (table 1).

Table 1: Total phenolics and total flavonoids contents in *Nigella sativa* TO and UF

Fractions	Total phenolics (µg GAE/g extract)	Total flavonoids (µg QAE/g extract)
TO	16,67±0,35	3,83±0,02
UF	24,73±0,51	8,31±0,40

Each value is represented as mean±SD (n = 3)

ABTS, DPPH and H₂O₂ radicals scavenging assays

The model of scavenging stable free radicals by hydrogen-donating antioxidants is widely used to evaluate the antioxidant properties in a relatively short time. To estimate this capacity, we used three assays: ABTS free radical scavenging assay, DPPH free radical scavenging assay and H₂O₂ free radical scavenging assay.

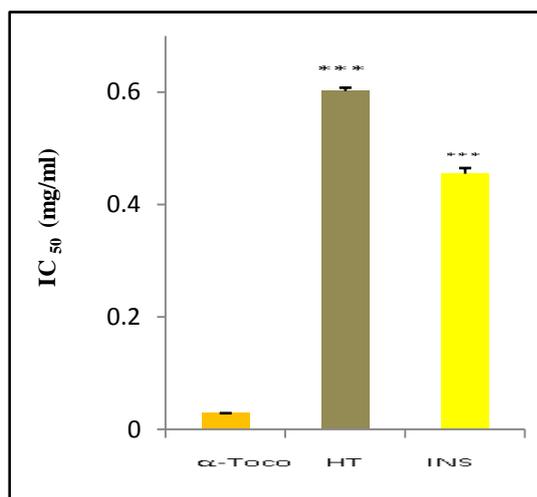
The results showed a similar tendency in the ability of the two fractions to reduce these radicals. UF showed the most important capacity followed by TO, as shown in figures 1, 2 and 3.

In the ABTS radical assay, the concentration for 50% inhibition were found to be 0,455 ±0,01 mg/ml and 0,602 ±0,006 mg/ml for UF and TO respectively. In the DPPH radical assay, IC₅₀ were found to be 113,24 ±0,425µg/ml and 173,66 ±0,174 µg/ml for UF and TO respectively. In the H₂O₂ radical assay, the IC₅₀ were 0,324±0,003 mg/ml and 0,39±0,002 mg/ml for UF and TO respectively (table 2).

Table 2: ABTS, DPPH and H₂O₂ radicals scavenging activities of TO, UF and standard

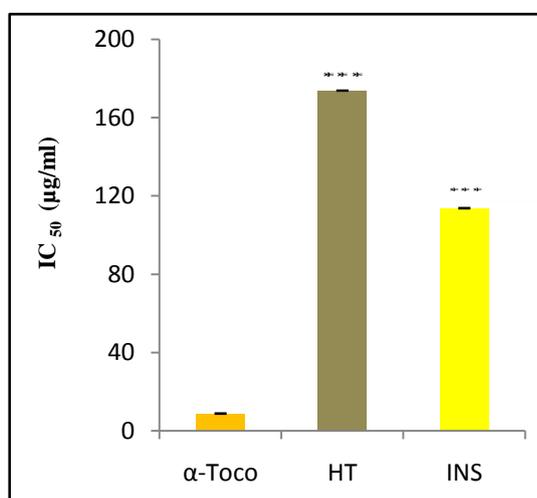
Fractions	IC ₅₀ for ABTS radical (mg/ml)	IC ₅₀ for DPPH radical (µg/ml)	IC ₅₀ for H ₂ O ₂ radical (mg/ml)
TO	0,602 ±0,006	173,66 ±0,174	0,39±0,002
UF	0,455 ±0,01	113,24 ±0,425	0,324±0,003
α-tocopherol	0,029 ±0	8,61 ±0,1	0,09±0,005

Each value is represented as mean±SD (n = 3), it has been reported that the lower IC₅₀ indicated the higher activity, in this assay, the difference between radical scavenging capacities were statistically significant according to Tukey's test at p < 0,05.



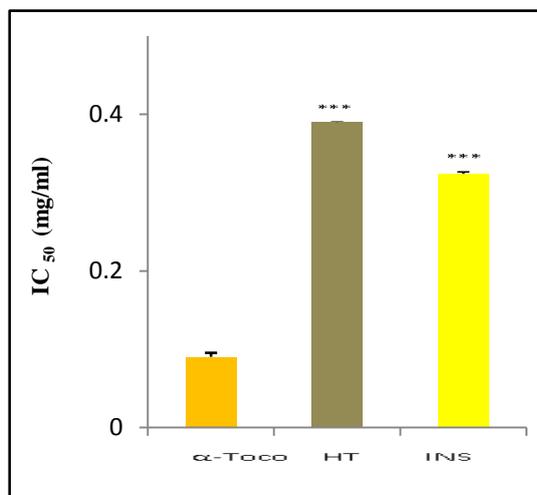
Values were expressed as the mean±SD of triplicate. Comparisons are made with α-tocopherol ***: p ≤ 0,001

Figure 1: ABTS radical scavenging effect of TO, UF and standard



Values were expressed as the mean±SD of triplicate. Comparisons are made with α-tocopherol ***: p ≤ 0,001

Figure 2: DPPH radical scavenging effect of TO, UF and standard

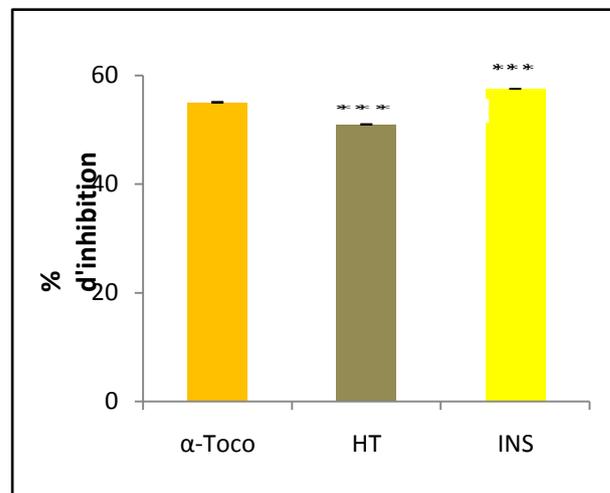


Values were expressed as the mean±SD of triplicate. Comparisons are made with α-tocopherol ***: p ≤ 0,001

Figure 3: H₂O₂ radical scavenging effect of TO, UF and standard

Lipid peroxidation inhibition capacity assay

The inhibition of the peroxidation of linoleic acid by the extracts of the seeds of *Nigella sativa* was carried out according to the ferric thiocyanate method; the results showed that UF has the most important capacity to inhibit the process of lipid peroxidation with a percentage of 57.5% (figure 4).



Values were expressed as the mean±SD of triplicate. Comparisons are made with α-tocopherol ***: p ≤ 0,001

Figure 4: Percentage of inhibition of lipid peroxidation by TO, UF and standard.

DISCUSSION

In the present study, the antioxidant activity of total oil and the unsaponifiable fraction of *Nigella sativa* was investigated, this is the first work that dealt with the unsaponifiable fraction extracted from the seeds of *Nigella sativa*.

The content of our oil in unsaponifiables has been estimated at 2.5%, a much lower rate than that of the *Nigella sativa* oil of Denizli in Turkey (5.38%) [20] India (4%), Kutahya (Turkey) (3.47%) and Konya (Turkey) (4.0%) but high compared to that of Egypt's *Nigella sativa* seeds (0.66%) [20]. This fluctuation in the unsaponifiable contents is related to the extraction method and the origin of the seed [21].

Total oil of *Nigella sativa* contains a small amount of phenolics and traces of flavonoids, many studies were reported on the different extracts of this plant, and the results pointed out that the chloroform and ethyl acetate extracts showed the highest levels of phenolics and flavonoids following by aqueous and hexane extracts [22]. The unsaponifiable fraction has the highest phenolic and flavonoid concentrations with 24,73±0,51 µg GAE/mg extract and 8,31±0,40 µg QAE/mg extract respectively.

Unsaponifiable vegetable oils are considered natural antioxidants. They are able to minimize the oxidation of oils during storage. These unsaponifiable compounds are as well recommended in food as in medicine, for their anti-cancer and / or anti-inflammatory activities.

The antioxidant activity estimated by ABTS, DPPH and H₂O₂ radicals scavenging assays indicated that the unsaponifiable fraction is very efficient. We can relate this capacity to (i) the important amounts of

polyphenols and flavonoids, (ii) the diversity of its constituents and their synergism, such as sterols, tocopherols, higher aliphatic alcohols, pigments and natural hydrocarbons, and (iii) the different kinetic behaviours of potential antioxidants.

The effect of TO and UF against the peroxidation of linoleic acid showed that UF has the highest activity. A study reported that the apolar antioxidant has an important antioxidant activity because they have the capacity to dispose and concentrate on the center of lipid-water, which permit to prevent the creation of free radicals, for neutral lipids, they dispersed in an aqueous phase, which decrease its capacity of lipid protection^[23].

CONCLUSION

This study showed clearly the antioxidant potential of *Nigella sativa* unsaponifiable fraction and this capacity is explained by the diversity of its antioxidant components. This finding illustrates the utility of this fraction as a natural antioxidant for use in therapy and lipid-containing foods. These bioactive substances could have extra nutritional properties and a central role in diet disease relationships. Further studies are required to disclose possible new bioactive constituents of the unsaponifiable fraction.

Conflicts of Interest: none

Acknowledgments

The authors wish to thank all the personnel of the laboratory of the applied biochemistry of the university Ferhat Abbas of Setif 1, Algeria, without their contribution, this study would have been impossible. Special thanks to Prof. H. Laouar, botanist at the laboratory of plant biology (University of Setif 1, Algeria).

REFERENCES

- Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 2007;35:1147-50.
- Beckman KB, Ames BN. Endogenous oxidative damage of mt DNA. *Mutat Res* 1999;424:51-8.
- Banskota AH, Tezuka Y, Adnyana IK, Midorikawa K, Matsushige K, Message D, *et al.* Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *J Ethnopharmacol.* 2000;72:239-246.
- Przybylski R, Lee YC, Eskin NAM. Antioxidant and radical scavenging activities of buckwheat seed components. *J Am Oil Chem Soc* 1998;75:1595-600.
- Wei YH, Lu CY, Wei CY, Ma YS, Lee HC. Oxidative stress in human aging and mitochondrial disease-consequences of defective mitochondrial respiration and impaired antioxidant enzyme system. *Chin J Physiol.* 2001;44:1-11.
- Mansour MA, Ginawi OT, El-Hadiyah T, El-Khatib AS, Al-Shabanah OA, Al-Sawaf HA. Effects of volatile oil constituents of *Nigella sativa* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice: evidence for antioxidant effects of thymoquinone. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2001;110:239-51.
- Lee JC, Kim HR, Kim J, Jan YS. Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. *Saboten* *J Agric Food Chem.* 2002;50:6490-6.
- Yanishlieva NV, Marinova EM. Stabilisation of edible oils with natural antioxidants. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2001;103:752-67.
- 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.
- Ramadan MF, Lothar WK, Jorg-TM. Radical scavenging activity of black cumin (*Nigella sativa* L.), Coriander (*Coriandrum sativum* L.), and Niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) crude seed oils and oil fractions. *J Agric Food Chem.* 2003;51:6961-9.
- Ramadan MF, Mörsel JT. Characterization of phospholipid composition of black cumin (*Nigella sativa* L.) seed oil. *Nahrung.*2002; 46:240-244.
- Sánchez-Fidalgo S, Cárdeno A, Sánchez-Hidalgo M, Aparicio-Soto M, Villegas I, Rosillo MA, *et al.* Dietary unsaponifiable fraction from extra virgin olive oil supplementation attenuates acute ulcerative colitis in mice. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2013; 48:572-581.
- Li HB, Cheng KW, Wong CC, Fan KW, Chen F, Jiang Y. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chem.*2007; 102:771-776.
- Bahorun T, Gressier B, Trotin F, Brunete C, Dine T, Vasseur J, *et al.* Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzneim-Forsch* 1996;46:1086-94.
- Re R, Pellegrinni N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorisation assay. *Free Radic Biol Med* 1998;26:1231-7.
- Rubalya VS, Neelamegam P. Antioxidant potential in vegetable oil. *Res J Chem Environ.* 2012;16:87-94.
- Schlesier K, Harwat M, Bohm V, Bitsch R. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radic Res* 2002;36:177-87.
- Ruch RJ, Cheng SJ, Klaunig JE. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*,1989; 10:1003-1008.
- Mitsuda H, Yuasumoto K, Iwami K. Antioxidation action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Eiyo to Shokuryo.* 1996; 19:210-214.
- 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.
- 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.
- Meziti A, Meziti H, Boudiaf K, Benboubetra M, Bourich H. Polyphenolic profile and antioxidant activities of *Nigella sativa* seed extracts *in vitro* and *in vivo*. *World Acad Sci Eng Technol* 2012;64:24-32.
- Frankel EN, Huang SW, Kanner J, German JB. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs. emulsions. *J Agric Food Chem.* 1994;42:1054-9.

HOW TO CITE THIS ARTICLE

Guergouri FZ, Sobhi W, Benboubetra M. Antioxidant activity of Algerian *Nigella sativa* total oil and its unsaponifiable fraction. *J Phytopharmacol* 2017;6(4):234-238.

هذا العمل البحثي تم إنجازه على مستخلص من حبة البركة والمتمثلين في الزيت الاجمالي والجزء غير قابل للتصبين ، التحليل وفق تقنيات CCM و HPLC أظهر غنى المواد غير قابلة للتصبين ب α - tocophérol ، نتائج أخرى بينت أن هذين المستخلصين يتمتعان بنشاط مضاد للأوكسدة في المخبر جد هام .

من اجل تقييم خاصيتهما الوقائية والعلاجية ضد تسمم الكبد الناجم عن رابع كلوريد الكربون (CCl_4) ، عملنا على نموذج حيواني (الفئران) ، أظهر كلا المستخلصين حماية جد فعالة للكبد ومؤكدة بانخفاض كبير جدا فيالترانسامينات,ALAT(ASAT) , و PA ، تحسن على مستوى البلازما والأنسجة في حالة علامات الاجهاد التأكسدي (GSH ,CAT, SOD,MDA) ومورفولوجيا الخلايا الكبدية ، وباختفاء علامات معاناة الكبد الناجمة عن التسمم ب CCl_4 .

بما أن CCl_4 معروف بقدرته على افتعال تسمم كلوي ، اهتمنا بقياس بعض المعايير الكلوية (CREA, UREE, GLY) ودراسة مقاطع نسيجية كلوية ، تبين أن مستخلصنا قاما بحماية الكلى من مرض الأنابيب الكلوية الحادة الناجم عن CCl_4 : هذا التأثير الوقائي شوهد من خلال رجوع مستويات CREA و UREE الدموية إلى المعايير الطبيعية ومن خلال تجديد الظهارة الانبوبي.

كلمات البحث: حبة البركة ، الزيت الاجمالي، CCl_4 ، المواد غير قابلة للتصبين، نشاط واقى للكبد.

RESUME

L'étude a été menée sur deux extraits des graines de la plante médicinale *Nigella sativa* : l'huile totale (HT) et la fraction insaponifiable (FI), la caractérisation effectuée par CCM et HPLC dévoile la richesse de la FI en alpha-tocophérol, d'autres résultats ont montré que ces derniers sont dotés d'une importante activité antioxydante *in vitro* et afin d'évaluer leur pouvoir hépatoprotecteur *in vivo*, on a procédé sur un modèle animal de toxicité induite par le tétrachlorure de carbone chez le rat, les deux extraits ont manifesté un effet hépatoprotecteur considérable témoigné par une réduction très significative des transaminases (ALAT, ASAT) et de la PA, une amélioration de l'état des marqueurs du stress oxydatif (GSH, CAT, SOD, MDA) plasmatique et tissulaire et de la morphologie des hépatocytes ainsi qu'une disparition des signes de souffrance hépatique résultant de l'intoxication au CCl_4 .

Vu que le CCl_4 est aussi réputé de pouvoir induire une toxicité rénale, on s'est intéressé à doser quelques marqueurs rénaux (CREA, URE, GLY) et à réaliser des coupes histologiques rénales, nos deux extraits se sont avérés rénoprotecteurs face à la tubulopathie aiguë occasionnée par le CCl_4 , cet effet protecteur a été exprimé par le rétablissement des taux sanguins de la CREA et de l'URE aux normes et par la régénération de l'épithélium tubulaire.

Mots clés : *Nigella sativa*, Huile totale, Fraction insaponifiable, CCl_4 , Activité hépatoprotective.

SUMMARY

The study was carried out on two extracts of the seeds of the medicinal plant *Nigella sativa*: The total oil (HT) and the unsaponifiable fraction (FI), the characterization performed by TLC and HPLC reveals the richness of the IF to alpha-tocopherol; other results have shown that the latter have a high antioxidant activity *in vitro* and in order to evaluate their hepatoprotective potency *in vivo*, we proceeded on an animal model of toxicity induced by carbon tetrachloride in the rat, the two extracts showed a considerable hepatoprotective effect as evidenced by a very significant reduction in transaminases (ALAT, ASAT) and PA, an improvement in the state of the markers of plasma and tissue oxidative stress (GSH, CAT, SOD, MDA) and hepatocyte morphology as well as disappearance of signs of hepatic pain resulting from CCl_4 intoxication.

Since CCl_4 is also known to induce kidney toxicity, we were interested in dosing renal markers (CREA, URE, GLY) and performing renal histological sections, our two extracts proved to be renoprotective against acute tubulopathy caused by CCl_4 , this protective effect was expressed by the restoration of the blood levels of the CREA and the ERU to the norms and by the regeneration of the tubular epithelium.

Key words: *Nigella sativa*, Total oil, Unsaponifiable fraction, CCl_4 , Hepatoprotective activity.