

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

Thèse

N° 01/SNV/2019

Présentée par

**KHITHER HANANE**

Pour l'obtention du diplôme de

**Doctorat en Sciences**

**Filière : Biologie**

**Spécialité : Biochimie**

Thème

**Etude des effets de la thymoquinone sur le stress oxydant :  
Application à l'hépatotoxicité et l'arthrite rhumatoïde induites chez  
le rat**

Soutenue publiquement le 17/01/2019

Devant le Jury

Président	<b>BOURICHE Hamama</b>	<b>Pr. UFA Sétif 1</b>
Directeur	<b>SOBHI Widad</b>	<b>MCA. UFA Sétif 1</b>
Examineurs	<b>KHETTAL Bachra</b>	<b>Pr. UAM Bejaia 1</b>
	<b>BELAALOUI Ghania</b>	<b>Pr. UMBB Batna 2</b>
	<b>NECIB Youcef</b>	<b>Pr. UMC Constantine 1</b>

*Laboratoire de Biochimie Appliquée*

*A la pensée de notre cher regretté*

***Pr. BENBOUBETRA Mustapha***

*Qui restera à jamais gravé dans mon cœur et esprit. Je voudrais le remercier, d'avoir accepté de m'encadrer, pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et pour ses conseils si précieux durant toute la période de mes études. Qu'il trouve ici mes sentiments de gratitude et l'expression de ma vive reconnaissance.*

*Que Dieu l'accueille dans son vaste paradis et*

*Lui accorde son pardon et sa miséricorde.*

## **Remerciements**

*J'exprime d'abord mes profonds remerciements à mon DIEU, le tout puissant, qui m'a donné le courage, la patience et la volonté d'achever ce travail.*

*Je remercie infiniment **W. SOBHI** professeur à l'université Ferhat Abbas - Sétif, pour avoir accepté de poursuivre l'encadrement de cette thèse, pour son soutien moral et ses conseils très importants durant toute la période de cette recherche, pour la confiance qu'elle m'a accordé. Qu'elle trouve ici mes sentiments de gratitude et l'expression de ma vive reconnaissance.*

*Ma vive reconnaissance va au Professeur **H. BOURICHE** d'avoir accepté de présider le jury de soutenance de la thèse, ainsi qu'aux Professeurs **B. KHETTAL**, **G. BELAALOU** et **Y. NECIB** d'avoir acceptés de juger ce travail de recherche.*

*Je présente ici le témoignage de ma sincère gratitude aux Enseignants et médecins pour leurs aides, **Dr. Y. DERRADJI**, **Pr. M. AMERANE**, **Pr. D. ABDELLOUCHE**, **Dr. H. LABCIR** et **Dr. A. SAFSAF**.*

## **DEDICACE**

*Je dédie ce travail à ma mère, la prunelle de mes yeux, Qu'elle trouve ici ma plus Profonde gratitude et tout mon Amour pour sa patience et son soutien et surtout pour ses prières pour moi tout au long de mes études.*

*A la pensée de mon père qu'il reste à jamais gravé dans mon Cœur et mon esprit ! Que Dieu l'accueille dans son vaste paradis, que Dieu ait son âme.*

*A la pensée de mon oncle qu'il reste à jamais gravé dans mon Cœur et mon esprit ! Que Dieu l'accueille dans son vaste paradis, que Dieu ait son âme.*

*A mes sœurs, à mon frère, à mes nièces, neveux et à toute la famille.*

*Spécialement à tous mes amies et collègues.*

*A tous ceux que j'aime.*

**Hanane**

## ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم تأثير الثيموكينون (TQ) على الإجهاد التأكسدي في حالة التسمم الكبدي والإلتهاب الرثوي الروماتيزمي المحرضين عند الجرذان. لهذا الغرض، قَدَرنا في البداية نشاطية TQ المضادة للأكسدة والمضادة للإلتهاب، خارج الجسم الحي. أظهرت النتائج المتحصل عليها أن TQ يمتلك قدرة معتبرة مضادة للأكسدة، وخاصة القدرة على تثبيط بيروكسيد الدهون بنسبة  $79.5 \pm 2.12\%$  وقدرة اقتناص الجذر الهيدروكسيلي وبيروكسيد الهيدروجين بقيم  $IC_{50}$  مساوية لـ:  $0.59 \pm 26.3$  و  $11.0 \pm 0.57$  ميكروغرام/مل، على التوالي. كما تمتلك تراكيزه الضعيفة تأثيرا معتبرا مضادا للإلتهاب. لتأكيد النتائج المحصل عليها خارج الجسم تم إجراء دراسات مكتملة داخل الجسم الحي، من خلال تقدير تأثير TQ على الإجهاد التأكسدي المرافق للتسمم الكبدي من جهة، بتقييم القدرة الوقائية والعلاجية للكبد ضد التسمم المحرض بـ  $CCl_4$  قبل وبعد علاج الجرذان الذكور بـ TQ لمدة 07 أيام. أظهرت النتائج أن TQ يملك تأثيرا وقائيا وعلاجيا معتبرا، ناتج عن تحسين حالة مؤشرات الإجهاد التأكسدي (GSH, MDA, SOD, CAT) في البلازما والأنسجة وكذا تعديل المؤشرات البيوكيميائية (الكبدية والدهنية). تم تأكيد هذه القدرة المضادة لسمية الكبد عن طريق دراسة المقاطع النسيجية. من جهة أخرى تم تقدير تأثير TQ على الإجهاد التأكسدي في حالة الإلتهاب الرثوي الروماتيزمي، باستعمال نموذج محرض بالكولاجين II عند الجرذان الذكور، إثر علاجهم بـ TQ لمدة 40 يوم. أظهرت النتائج أن TQ سمح بتعديل حالة مؤشرات الإجهاد التأكسدي بصفة مرتبطة بالجرعة، كما بينت نتائج دراسة المقاطع النسيجية والفحص بالأشعة السينية لمفاصل الجرذان المعالجة تحسنا معنويا لحالة المفاصل. من أجل فهم تأثير الـ TQ المضاد للأكسدة والمضاد للإلتهاب تم تقدير تأثيره على نشاطية انزيم الكزانيتين أكسيداز على المستوى النسيجي والمصلي. أظهرت النتائج تعديل نشاطية هذا الانزيم لدى الحيوانات المعالجة بـ TQ إلى مقدار مماثل لنشاطيته عند الجرذان السليمة. أثبتت نتائج هذه الدراسة قدرة عالية لـ TQ مضادة للإلتهاب الرثوي الروماتيزمي وكذلك قدرة وقائية وعلاجية ضد التسمم الكبدي من خلال النشاطية التثبيطية للكزانيتين أكسيداز وتعديل حالة مؤشرات الإجهاد التأكسدي.

**الكلمات المفاتيح:** الثيموكينون، الإجهاد التأكسدي، مضادات الأكسدة، الكزانيتين أكسيداز، سمية الكبد، الإلتهاب الرثوي الروماتيزمي.

## RESUME

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet de la thymoquinone (TQ) sur le stress oxydant dans le cas de l'hépatotoxicité et de l'arthrite rhumatoïde induites chez les rats. Pour cela, l'activité antioxydante et anti-inflammatoire de la thymoquinone (TQ) a été initialement évaluée, *in vitro*. Les résultats obtenus montrent que la TQ est dotée d'un pouvoir antioxydant important, notamment l'inhibition de la peroxydation lipidique avec  $79,5 \pm 2,12$  % et le pouvoir scavenger du radical hydroxyle et du peroxyde d'hydrogène, avec des IC50 de l'ordre de  $26.3 \pm 0.59$  et  $11.0 \pm 0.57$  µg/ml, respectivement. Elle est également douée d'un bon effet anti-inflammatoire à des faibles concentrations. Pour confirmer les résultats obtenus *in vitro*, des études complémentaires ont été évaluées, *in vivo*. D'une part, en évaluant l'effet de la TQ sur le stress oxydant associé à l'hépatotoxicité. Les pouvoirs hépatoprotecteur et hépatocuratif ont été évalués, dans un modèle d'hépatotoxicité induite par CCl<sub>4</sub> avant ou après le traitement des rats mâles avec la TQ pendant 07 jours. Les résultats montrent que la TQ possède des effets hépatoprotecteur et hépatocuratif importants, en améliorant le statut plasmatique et tissulaire des marqueurs du stress oxydant (GSH, CAT, SOD et MDA) et les paramètres biochimiques (hépatiques et lipidiques). Ce potentiel anti-hépatotoxique est confirmé par une étude histologique. D'autre part, l'effet de la TQ sur le stress oxydant dans le cas de l'arthrite rhumatoïde a été évalué, en utilisant un modèle d'arthrite induite par le collagène II ; développé chez les rats mâles qui sont traités pendant 40 jours avec la TQ. Les résultats montrent que la TQ a rétabli le statut des marqueurs du stress oxydant d'une manière dose-dépendante. L'étude histologique et radiologique aux rayons X des articulations des rats arthritiques traités montre une amélioration significative de leur état. Pour mieux comprendre le pouvoir antioxydant et anti-inflammatoire de la TQ, son effet sur l'activité plasmatique et tissulaire de la xanthine oxydase (XO) a été évalué. Les résultats montrent que l'activité XO est rétablie chez les animaux traités avec la TQ à un niveau comparable à celui des rats normaux. En conclusion, les résultats révèlent un pouvoir anti-arthritique, hépatoprotecteur et hépatocuratif de TQ, via l'inhibition de l'activité XO et le rétablissement du statut des marqueurs du stress oxydant.

**Mots-clés :** Thymoquinone, stress oxydant, antioxydant, xanthine oxydase, hépatotoxicité et arthrite rhumatoïde.

## SUMMARY

The objective of this research was to evaluate the effect of thymoquinone (TQ) on oxidative stress in the case of the induced hepatotoxicity and rheumatoid arthritis in rats. For this, *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory effects of TQ were initially evaluated. The results show that TQ is endowed with an important antioxidant power, in particular the inhibition of  $79.5 \pm 2.12\%$  of lipid peroxidation and the scavenging power of hydroxyl radical and hydrogen peroxide, with  $IC_{50}$  of  $26.3 \pm 0.59$  and  $11.0 \pm 0.57$   $\mu\text{g/ml}$ , respectively. It had also a good anti-inflammatory effect. To confirm the results obtained *in vitro*, additional studies were evaluated *in vivo*. On the one hand and by estimating the effect of TQ on oxidative stress associated with hepatotoxicity. Hepatoprotective and hepatocurative potency was evaluated in a model of  $\text{CCl}_4$ -induced hepatotoxicity before or after treatment of male rats with TQ for 7 days. The results show that TQ has significant hepatoprotective and hepatocurative effects via improving the plasmatic and tissular status of oxidative stress markers (GSH, CAT, SOD and MDA) and biochemical parameters (hepatic and lipid). This anti-hepatotoxicity potential is confirmed through a histological study. On the other hand, the effect of TQ on oxidative stress in rheumatoid arthritis was evaluated using a Collagen II-induced arthritis model, developed in male rats which are treated with TQ for 40 days. The results demonstrate that TQ restored the status of oxidative stress markers in a dose-dependent manner. The histological and X-ray radiological studies of the joints of treated arthritic rats show a significant improvement in their state. To better understand the antioxidant and anti-inflammatory potency of TQ, its effect on plasmatic and tissular xanthine oxidase (XO) activity was assessed. The results show that the XO activity was restored in TQ-treated animals to the level observed in normal rats. In conclusion, the results reveal the anti-arthritic, hepatoprotective and hepatocurative power of TQ, by the inhibition of xanthine oxidase activity and the restoration of the status of oxidative stress markers.

**Keywords:** Thymoquinone, oxidative stress, antioxidant, xanthine oxidase, hepatotoxicity and rheumatoid arthritis.

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ALAT :</b>	Alanine-AminoTranférase
<b>ASAT :</b>	Aspartate-AminoTransférase
<b>ASLO:</b>	Anti-Strepto-Lysine O
<b>CAT :</b>	Catalase
<b>CCl<sub>4</sub> :</b>	Tétrachlorure de carbone
<b>CD :</b>	Classe de Différentiation
<b>CYP:</b>	Cytochrome P
<b>DMSO:</b>	Diméthyle Sulfoxyde
<b>ERO:</b>	Espèces Réactifs de l'Oxygène
<b>FAD:</b>	Flavine Adénine Dinucléotide
<b>GSH:</b>	Glutathion Réduit
<b>HLA:</b>	Antigène Leucocytaire Humain
<b>IC<sub>50</sub>:</b>	Concentration Inhibitrice à 50%
<b>IgG:</b>	Immunoglobuline G
<b>IFN-<math>\gamma</math>:</b>	Interféron gamma
<b>IL:</b>	Interleukine
<b>MDA:</b>	Malondialdéhyde
<b>NAD:</b>	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
<b>NADP:</b>	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
<b>PAD :</b>	Peptidyl Arginine Deiminase
<b>PAL :</b>	Phosphatase Alkaline
<b>SOD :</b>	Superoxide Dismutase
<b>TNF :</b>	Facteur de nécrose tumorale
<b>Vit C :</b>	Acide ascorbique
<b>XDH :</b>	Xanthine Déshydrogénase
<b>XO :</b>	Xanthine Oxydase
<b>XOR :</b>	Xanthine Oxydoréductase

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 01:</b> Structure chimique de la thymoquinone .....	3
<b>Figure 02:</b> Réactions d'oxydoréduction de la thymoquinone. ....	5
<b>Figure 03:</b> Origine des différentes espèces réactives de l'oxygène et de l'azote .....	12
<b>Figure 04:</b> Schéma des défenses antioxydantes enzymatiques. ....	15
<b>Figure 05:</b> Les réactions catalysées par la XOR. ....	19
<b>Figure 06:</b> Anatomie segmentaire du foie .....	21
<b>Figure 07:</b> Produits du métabolisme du CCl <sub>4</sub> .....	25
<b>Figure 08:</b> L'inflammation de la membrane synoviale .....	26
<b>Figure 09:</b> Rôle des Cellules dendritiques dans la réponse inflammatoire au cours de la PR. ....	29
<b>Figure 10:</b> Rôle des LT dans la pathogénie de la PR. ....	32
<b>Figure 11:</b> Effet piègeur du radical OH <sup>•</sup> par la TQ et l'acide ascorbique.....	48
<b>Figure 12:</b> Effet scavenger du peroxyde d'hydrogène par la TQ et l'acide ascorbique.....	49
<b>Figure 13:</b> Effet piègeur de l'anion superoxyde par la TQ et l'acide ascorbique .....	50
<b>Figure 14:</b> Cinétique de blanchissement du β-carotène. ....	51
<b>Figure 15:</b> Pouvoir réducteur de la TQ et du standards (Vit C et BHT). ....	51
<b>Figure 16:</b> Effet chélateur du fer ferreux de la TQ et du standard (EDTA). ....	52
<b>Figure 17:</b> Effet antiarthritique de la TQ et du standard (Acide diclofénac) <i>in vitro</i> .....	55
<b>Figure 18:</b> Statut des enzymes hépatiques des rats traités avec le CCl <sub>4</sub> en présence et en absence de la TQ. ....	57
<b>Figure 19:</b> Bilan rénal des groupes des rats traités avec le CCl <sub>4</sub> en présence et en absence de la TQ (2.5 et 5 mg/kg) pendant 7 jours.....	59
<b>Figure 20:</b> Bilan lipidique des groupes des rats traités avec le CCl <sub>4</sub> en présence et en absence de la TQ (2.5 et 5 mg/kg) pendant 7 jours. X100.....	59
<b>Figure 21:</b> Coupes histologiques du foie des rats traités avec le CCl <sub>4</sub> en présence et en absence de la TQ par rapport ceux normaux.....	63
<b>Figure 22:</b> Coupes histologiques des reins des rats traités avec le CCl <sub>4</sub> en présence et en absence de la TQ par rapport ceux normaux.....	63

<b>Figure 23:</b> Effet de la thymoquinone sur le statut hépatique des marqueurs du stress oxydant...	<b>65</b>
<b>Figure 24:</b> Effet de la Thymoquinone sur le statut des marqueurs du stress oxydatif au niveau du plasma .....	<b>66</b>
<b>Figure 25:</b> Effet de la TQ sur l'activité xanthine oxydase dans le cas de l'hépatotoxicité induite par CCl <sub>4</sub> .....	<b>68</b>
<b>Figure 26:</b> Bilan hépatique (ASAT, ALAT et PAL) des groupes des rats arthritiques en présence et en absence de la Thymoquinone par rapport au groupe contrôle .....	<b>73</b>
<b>Figure 27:</b> Bilan rénal des groupes des rats arthritiques en présence et en absence de la TQ .....	<b>74</b>
<b>Figure 28:</b> Coupes histologiques du foie des rats.....	<b>75</b>
<b>Figure 29:</b> Coupes histologiques des reins des rats.....	<b>76</b>
<b>Figure 30:</b> Coupes histologiques de la rate des rats .....	<b>77</b>
<b>Figure 31:</b> Taux plasmatique des facteurs rhumatoïdes (FR) et l'ASLO des rats arthritiques et traités.....	<b>78</b>
<b>Figure 32:</b> Effet de la TQ sur l'évolution du score arthritique des rats.....	<b>81</b>
<b>Figure 33:</b> Effet de la TQ sur l'évolution de l'épaisseur des pattes des rats. ....	<b>84</b>
<b>Figure 34:</b> Radiographies des pattes postérieures et antérieures des rats.....	<b>86</b>
<b>Figure 35:</b> Coupes histologiques des articulations des rats arthritiques .....	<b>88</b>
<b>Figure 36:</b> Effet de la Thymoquinone sur le statut des marqueurs du stress oxydatif au niveau de l'homogénat du foie.....	<b>89</b>
<b>Figure 37:</b> Effet de la Thymoquinone sur le statut des marqueurs du stress oxydatif au niveau de l'homogénat de la rate.....	<b>90</b>
<b>Figure 38:</b> Effet de la Thymoquinone sur le statut des marqueurs du stress oxydatif au niveau plasmatique .....	<b>91</b>
<b>Figure 39:</b> Effet de la TQ sur la xanthine oxydase dans cas de l'arthrite. ....	<b>93</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I:</b> Les espèces réactives d'oxygène et de nitrogène. ....	<b>10</b>
<b>Tableau II:</b> Valeurs des IC <sub>50</sub> de la TQ et de l'acide ascorbique contre l'anion superoxyde. ....	<b>50</b>
<b>Tableau III:</b> Les EC <sub>50</sub> de la TQ et de l'EDTA de la chélation du fer ferreux. ....	<b>52</b>
<b>Tableau IV:</b> Effet de la thymoquinone sur le statut des enzymes hépatiques. ....	<b>58</b>
<b>Tableau V:</b> Pourcentage de l'activité hépatoprotectrice et hépatocurative de la TQ contre la toxicité induite par CCl <sub>4</sub> . ....	<b>58</b>
<b>Tableau VI:</b> Effet de la TQ sur les paramètres biochimiques rénaux chez les différents groupes expérimentaux. ....	<b>60</b>
<b>Tableau VII:</b> Effet de la TQ sur les paramètres biochimiques lipidiques chez les différents groupes expérimentaux. ....	<b>60</b>
<b>Tableau VIII:</b> Effet de la TQ sur le statut hépatique des marqueurs du stress oxydant. ....	<b>65</b>
<b>Tableau IX:</b> Effet de la TQ sur le statut plasmatique des marqueurs du stress oxydant. ....	<b>67</b>
<b>Tableau X:</b> Effet de la TQ sur l'activité xanthine oxydase dans le cas de l'hépto-toxicité induite par CCl <sub>4</sub> . ....	<b>68</b>
<b>Tableau XI:</b> Bilan hépatique et rénal des groupes des rats arthritique traités et non traités avec la Thymoquinone par rapport au groupe de rats normaux. ....	<b>74</b>
<b>Tableau XII:</b> Effet de la thymoquinone sur la formule et numération sanguine (FNS). ....	<b>79</b>
<b>Tableau XIII:</b> Effet de la thymoquinone sur le statut des marqueurs du stress oxydant au niveau de l'homogénat du foie. ....	<b>89</b>
<b>Tableau XIV:</b> Effet de la thymoquinone sur le statut des marqueurs du stress oxydant au niveau de l'homogénat de la rate. ....	<b>90</b>
<b>Tableau XV:</b> Effet de la Thymoquinone sur le statut plasmatique des marqueurs du stress oxydant. ....	<b>92</b>
<b>Tableau XVI:</b> Effet de la TQ sur la xanthine oxydase dans le cas de l'arthrite. ....	<b>93</b>

# SOMMAIRE

<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>Revue Bibliographique .....</b>	<b>3</b>
<b>1. Thymoquinone .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Structure et propriétés.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Propriétés pharmacologiques de la thymoquinone .....</b>	<b>4</b>
1.2.1. Effet antioxydant.....	4
1.2.2. Effets anti-inflammatoire et immunomodulateur.....	5
1.2.3. Effet anticancéreux .....	6
1.2.4. Effet antimicrobien .....	7
1.2.5. Effet antidiabétique .....	8
<b>1.3. Toxicité de la thymoquinone .....</b>	<b>8</b>
<b>2. Stress oxydant .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1. Génération des radicaux libres .....</b>	<b>9</b>
2.1.1. Production endogène.....	10
2.1.2. Production exogène .....	11
<b>2.2. Principales cibles biologiques des espèces réactives de l'oxygène .....</b>	<b>12</b>
2.2.1. Acides désoxyribonucléiques .....	13
2.2.2. Protéines.....	13
2.2.3. Lipoprotéines .....	13
2.2.4. Lipides membranaires .....	14
<b>2.3. Systèmes antioxydants .....</b>	<b>14</b>
2.3.1. Système antioxydant enzymatique.....	14
2.3.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques .....	16
<b>3. Xanthine oxydoréductase .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1. Mécanisme d'action et formes de la xanthine oxydoréductase.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2. Distribution et expression de la XOR .....</b>	<b>19</b>
<b>3.3. Rôle de la XOR dans l'inflammation .....</b>	<b>20</b>
<b>4. Hépatotoxicité.....</b>	<b>21</b>
<b>4.1. Anatomie et histologie du foie .....</b>	<b>21</b>
<b>4.2. Fonctions principales du foie .....</b>	<b>22</b>

4.2.1. Métabolisme des nutriments .....	22
4.2.2. Sécrétion biliaire .....	22
4.2.3. Défense immunitaire.....	22
4.2.4. Détoxification sanguine.....	22
<b>4.3. Hépatotoxicité induite par CCl<sub>4</sub>.....</b>	<b>23</b>
4.3.1. Biotransformation du tétrachlorure de carbone.....	23
<b>5. Arthrite rhumatoïde .....</b>	<b>26</b>
<b>5.1. Prévalence de l'AR .....</b>	<b>26</b>
<b>5.2. Facteurs de risques .....</b>	<b>27</b>
<b>5.3. Immunophysiopathologie de l'AR.....</b>	<b>28</b>
5.3.1. Acteurs cellulaires .....	28
5.3.2. Acteurs intercellulaires.....	32
5.3.3. Acteurs intracellulaires.....	33
<b>5.4. Destruction articulaire .....</b>	<b>34</b>
<b>5.5. Immuno-pathologie des manifestations extra-articulaires .....</b>	<b>34</b>
<b>5.6. Rôle des ERO dans la physiopathologie de l'AR .....</b>	<b>35</b>
<b>5.7. Modèles murins d'arthrite .....</b>	<b>36</b>
<b>Matériel et Méthodes .....</b>	<b>37</b>
<b>1. Matériel .....</b>	<b>37</b>
1.1. Animaux.....	37
1.2. Réactifs .....	37
<b>2. Méthodes.....</b>	<b>37</b>
<b>2.1. Etude de l'activité antioxydante <i>in vitro</i> de la thymoquinone .....</b>	<b>37</b>
2.1.1. Evaluation de l'effet scavenger .....	37
2.1.2. Evaluation de l'effet sur la peroxydation lipidique.....	39
2.1.3. Pouvoir réducteur .....	39
2.1.4. Chélation du fer ferreux .....	40
<b>2.2. Evaluation de l'effet anti-inflammatoire <i>in vitro</i> .....</b>	<b>40</b>
<b>2.3. Evaluation de l'effet hépatoprotecteur et hépatocuratif de la thymoquinone.....</b>	<b>40</b>
2.3.1. Induction de l'hépatotoxicité par CCl <sub>4</sub> .....	40
2.3.2. Prélèvement sanguin .....	41
2.3.3. Dosage des paramètres sanguin.....	41

2.3.4. Prélèvement des organes et étude histopathologique .....	42
2.3.5. Préparation de l'homogénat .....	42
2.3.6. Dosage des marqueurs du stress oxydant .....	42
2.3.7. Dosage de la xanthine oxydase .....	44
<b>2.4. Effet de la thymoquinone sur l'arthrite rhumatoïde .....</b>	<b>45</b>
2.4.1. Induction de l'arthrite rhumatoïde .....	45
2.4.2. Evaluation de l'évolution de l'arthrite rhumatoïde .....	46
1. Score de la maladie .....	46
2. Epaisseur des pattes .....	46
2.4.3. Prélèvement sanguin .....	46
2.4.4. Dosage des paramètres sanguins .....	46
2.4.5. Prélèvement des organes et étude radiologique et histopathologique .....	47
2.4.6. Préparation de l'homogénat .....	47
2.4.7. Dosage des marqueurs du stress oxydant .....	47
2.4.8. Dosage de la xanthine oxydase .....	47
<b>3. Analyses statistique.....</b>	<b>47</b>
<b>Résultats et Discussion .....</b>	<b>47</b>
<b>1. Etude de l'activité antioxydante in vitro de la thymoquinone .....</b>	<b>48</b>
<b>1.1. Evaluation de l'effet scavenger.....</b>	<b>48</b>
1.1.1. Effet scavenger du radical hydroxyle .....	48
1.1.2. Effet scavenger du peroxyde d'hydrogène.....	49
1.1.3. Effet scavenger de l'anion superoxyde .....	49
<b>1.2. Effet sur la peroxydation lipidique.....</b>	<b>50</b>
1.2.1. Test de blanchissement de la $\beta$ -carotène .....	50
<b>1.3. Pouvoir réducteur.....</b>	<b>51</b>
<b>1.4. Chélation du fer ferreux.....</b>	<b>52</b>
<b>2. Effet anti-inflammatoire in vitro.....</b>	<b>54</b>
<b>3. Effet hépatoprotecteur et hépatocuratif de la thymoquinone .....</b>	<b>55</b>
<b>3.1. Effet sur les paramètres biochimiques hépatiques .....</b>	<b>55</b>
<b>3.2. Effet sur les paramètres biochimiques rénaux et lipidiques .....</b>	<b>58</b>
<b>3.3. Effet de la thymoquinone sur l'histologie du foie .....</b>	<b>60</b>
<b>3.4. Effet de la thymoquinone sur le statut des marqueurs du stress oxydant.....</b>	<b>63</b>
3.4.1. Statut des marqueurs du stress oxydant au niveau de l'homogénat du foie .....	63

3.4.2. Statut des marqueurs du stress oxydant au niveau du plasma .....	66
<b>3.5. Effet de la thymoquinone sur l'activité xanthine oxydase.....</b>	<b>67</b>
<b>4. Effet de la thymoquinone sur l'arthrite rhumatoïde .....</b>	<b>73</b>
<b>4.1. Etude de l'hépatotoxicité et la néphrotoxicité .....</b>	<b>73</b>
4.1.1. Etude des paramètres biochimiques .....	73
4.1.2. Etude histologique .....	75
<b>4.2. Evolution de l'arthrite induite chez le rat .....</b>	<b>77</b>
4.2.1. Taux plasmatique des marqueurs de l'inflammation .....	77
4.2.2. Evolution du score arthritique .....	79
4.2.3. Evolution de l'épaisseur des pattes .....	81
4.2.4. Etude radiologique.....	84
4.2.5. Etude histologique des pattes .....	87
<b>4.3. Statut des marqueurs du stress oxydant dans le cas de l'arthrite.....</b>	<b>88</b>
4.3.1. Statut des marqueurs du stress oxydant au niveau tissulaire .....	88
4.3.2. Statut plasmatique des marqueurs du stress oxydant .....	91
<b>4.4. Effet de la TQ sur l'activité xanthine oxydase.....</b>	<b>92</b>
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>98</b>
<b>Références .....</b>	<b>99</b>

# *Introduction*

Le stress oxydant est un déséquilibre de la balance entre les antioxydants et les oxydants. Ce déséquilibre se manifeste par une surproduction des radicaux libres et/ou une défaillance du système antioxydant (CAT, SOD, GSH). Le stress oxydant est impliqué dans l'induction et l'amplification de diverses pathologies, telles que les pathologies hépatiques développées suite à l'exposition aux produits chimiques toxiques. Parmi ces produits le CCl<sub>4</sub>. Il induit diverses lésions hépatiques : stéatose, nécrose, hépatite aiguë, parfois fibrose et cirrhose voire carcinome hépatocytaire. Les mécanismes impliqués dans le développement des pathologies hépatiques sont liés au stress oxydant résultant de la biotransformation du CCl<sub>4</sub> en radicaux libres hautement toxiques par l'intermédiaire du cytochrome P<sub>450</sub>.

Le stress oxydant est également impliqué dans l'amplification d'autres pathologies telle que l'arthrite rhumatoïde ; une maladie inflammatoire systémique accompagnée par une destruction importante du cartilage articulaire et de l'os. Les espèces réactives oxygénées (ERO) et les produits finaux de la peroxydation lipidique sont des modulateurs de l'inflammation articulaire dans l'arthrite rhumatoïde. Des quantités importantes des ERO ont été détectées dans les sérums et les liquides synoviaux des articulations enflammées. Elles peuvent être induites par les cytokines pro-inflammatoires ou par des enzymes génératrices des ERO telle que la xanthine oxydase. Cette dernière génère l'anion superoxyde au cours de l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique. Des taux élevés de la xanthine oxydase ont été observés dans diverses pathologies hépatiques et rhumatoïdes et autres, d'où l'intérêt croissant pour ses rôles pathologiques potentiels.

Bien qu'il existe de nos jours des thérapies efficaces contre les atteintes hépatiques et articulaires dans l'arthrite rhumatoïde, elles présentent de sérieux effets secondaires souvent indésirables. Pour y remédier les recherches sont actuellement orientées vers des produits anti-inflammatoires naturels. D'ailleurs, certains patients utilisent déjà des plantes médicinales riches en molécules bioactives naturelles pour atténuer l'inflammation. *Nigella sativa* est l'une des plantes les plus utilisées. Sur le plan scientifique, la thymoquinone est le principe actif majeur des huiles essentielles de la nigelle. Elle présente un large spectre d'activités pharmacologiques telles que l'activité hépatoprotectrice, immunostimulante, anti-inflammatoire et antioxydante.

Ce travail est réalisé afin d'évaluer l'effet de la TQ sur le stress oxydant et la xanthine oxydase dans le cas de l'hépatotoxicité et l'arthrite rhumatoïde induites chez les rats mâles. Pour cela, nous avons étudié initialement l'activité antioxydante et l'effet anti-inflammatoire de la TQ, *in vitro*.

Des études *in vivo* ont été effectuées par la suite. Premièrement, évaluation de l'effet hépatoprotecteur et hépatocuratif de la TQ contre la toxicité induite par CCl<sub>4</sub> chez les rats mâles par le biais de ; *(i)* bilans biochimiques plasmatiques (hépatique, rénal et lipidique), *(ii)* étude histologique du foie et *(iii)* marqueurs du stress oxydatif plasmatique et tissulaire. À la fin, l'activité de la xanthine oxydase a été déterminée au niveau tissulaire et plasmatique en tant que marqueur du stress oxydant hépatique.

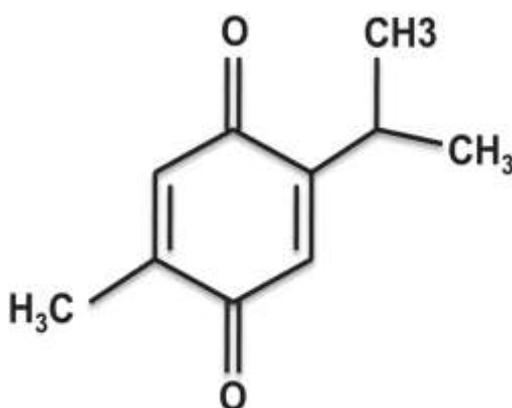
Deuxièmement, nous présentons l'effet de la TQ contre l'arthrite rhumatoïde induite chez l'animal grâce aux ; *(i)* bilans biochimiques plasmatiques (hépatique, rénale et lipidique), *(ii)* étude histologique du foie et *(iii)* marqueurs du stress oxydant plasmatique et tissulaire. De la même manière, l'activité de la xanthine oxydase est mesurée au niveau tissulaire et plasmatique.

# *Revue Bibliographique*

## 1. Thymoquinone

### 1.1. Structure et propriétés

La thymoquinone (TQ) est un monoterpène isolé pour la première fois par chromatographie sur couches minces, à partir des huiles essentielles des graines de *Nigella sativa*, en 1963 par EL-Dakhakhny (1963). Des recherches ultérieures ont signalé la présence de la TQ dans d'autres espèces de plantes telles que : *Eupatorium ayapana* (Trang *et al.*, 1993), *Calocedrus decurrens* (Manter *et al.*, 2007), *Origanum syriacum* (Lukas *et al.*, 2009), *Nepeta distans* Raul (Hussaun *et al.*, 2010), *Thymus vulgaris* L (Grosso *et al.*, 2010) et *Satureja spicigera* (Gohari *et al.*, 2012). La TQ (2-Isopropyl-5-methylbenzo-1,4-quinone) est une molécule hydrophobe. Elle contient un noyau quinone lié à des chaînes latérales isopropyl et méthyle en position 2 et 5, respectivement (figure 01). Elle se caractérise par la formule moléculaire  $C_{10}H_{12}O_2$  et la masse molaire de 164,201 g/mol. La TQ existe en solution sous deux formes tautomériques différentes ; énol et céto. Cette dernière (~90%) est responsable des propriétés pharmacologiques de ce composé (Alkharfy *et al.*, 2011).



**Figure 01** : Structure chimique de la thymoquinone (Darakhshan *et al.*, 2015).

### 1.2. Propriétés pharmacologiques de la thymoquinone

Depuis l'isolement de la TQ en 1963, une grande attention lui a été accordée, plusieurs études ont été réalisées afin de démontrer ses propriétés pharmacologiques (Elbarbry *et al.*, 2012 ; Darakhshan *et al.*, 2015), dont les plus intéressantes sont les suivantes :

#### 1.2.1. Effet antioxydant

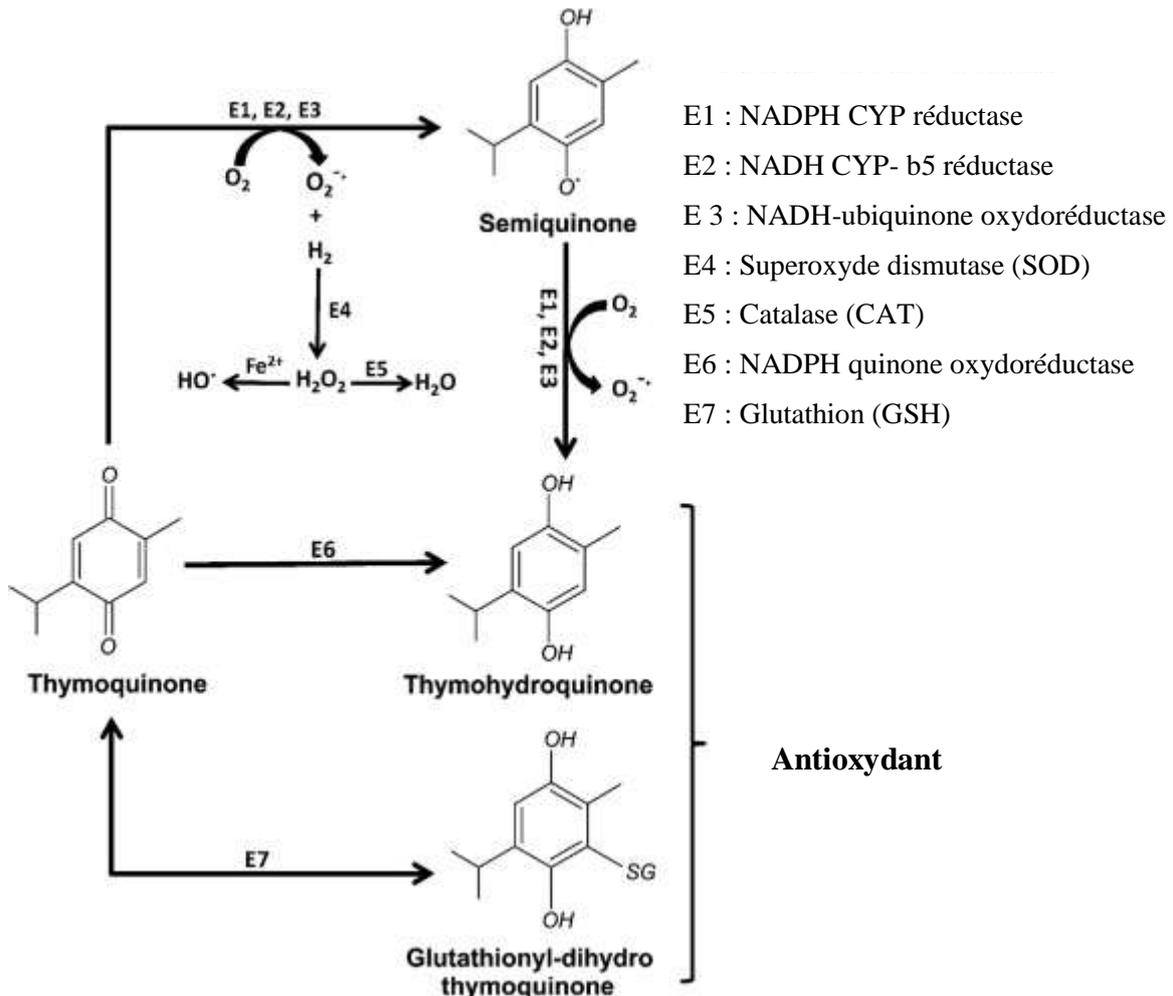
Des études *in vitro* ont été effectuées afin d'évaluer l'effet antioxydant de la TQ. Les résultats obtenus ont démontré que la thymoquinone est un antioxydant phytochimique puissant, cet effet est dû à l'activité de piégeage contre plusieurs espèces réactives de l'oxygène (ERO) incluant l'anion superoxyde, le radical hydroxyle et l'oxygène singulet (Nagi et Mansour, 2000 ; Mansour *et al.*, 2002).

Le potentiel antioxydant de la TQ peut être lié aux propriétés redox de la structure quinone de la molécule et de la capacité illimitée de la TQ de franchir les barrières physiologiques et d'accéder facilement aux compartiments subcellulaires, ce qui favorise les effets de piégeage radicalaire (Daba *et al.*, 1998 ; Badary *et al.*, 2003).

Dans des conditions physiologiques, la TQ réagit avec le glutathion (GSH), le NADH et le NADPH par réaction spontanée pour former des espèces réduites : le glutathionyl-dihydro-TQ après une réaction rapide avec le GSH et la dihydrothymoquinone après une lente réaction avec NADH et NADPH (Khalife et Lupidi, 2007). La TQ peut subir un processus de réduction à un électron en deux étapes par la NADPH CYP réductase microsomale, la NADHCYP-b5 réductase ou la NADH-ubiquinone oxydoréductase ou une réduction à deux électrons par la NADPH-quinone oxydoréductase pour produire la thymohydroquinone (Khalife et Lupidi, 2007) (figure 02). Lorsque ces métabolites sont formés, ils peuvent éliminer les radicaux libres. Cet effet peut remplacer l'effet des molécules de défense antioxydantes endogènes, le GSH et la superoxyde dismutase (SOD) et empêchent la peroxydation lipidique (Khalife et Lupidi, 2008).

Les enzymes antioxydantes telles que la SOD, la catalase (CAT), la glutathion-S-transférase (GST) et la glutathion peroxydase (GSH-Px) constituent le pôle principal du système antioxydant de la plupart des cellules. Il est bien connu que les enzymes antioxydantes sont responsables de la neutralisation des dommages oxydatifs induits par les radicaux libres (Harzallah *et al.*, 2010). Plusieurs études *in vivo* ont montré que la TQ induit l'expression et / ou l'activité de la GST (Badary et Gamal EL-Din, 2001 ; Elbarbry *et al.*, 2012), de la GSH-Px et de la glutathion réductase (Elbarbry *et al.*, 2012) et de la SOD (Mansour *et al.*, 2002 ; Badary *et al.*, 2003 ; Kanter *et al.*, 2005).

La TQ est capable de protéger différents organes contre les lésions oxydatives induites par une variété de substances et médicaments générateurs de radicaux libres (Nagi et Almakki, 2009 ; Ismail *et al.*, 2010 ; Darakhshan *et al.*, 2015 ; Taha *et al.*, 2016).



**Figure 02 :** Réactions d’oxydoréduction de la thymoquinone (Darakhshan *et al.*, 2015).

### 1.2.2. Effets anti-inflammatoire et immunomodulateur

L’inflammation est une réponse biologique complexe à des stimuli nocifs principalement médiée par deux enzymes : la cyclooxygénase et la lipoxygénase qui génèrent respectivement des prostaglandines et des leucotriènes (Nagi et Mansour, 2000).

Houghton et ses collaborateurs (1995) ont montré que l’effet anti-inflammatoire de TQ est le résultat de la diminution de la génération des eicosanoïdes tels que le thromboxane B2 et le leucotriène B4 par les leucocytes du rat stimulés par le calcium ionophore, en inhibant à la fois les cyclooxygénases et la 5-lipoxygénase.

De même, El Gazzar et ses collaborateurs (2006b) ont confirmé la capacité de la TQ d’inhiber l’expression de la 5-lipoxygénase et la biosynthèse des leucotriènes LTB4 et LTC4 par les

cellules pulmonaires, dans un modèle d'asthme allergique induit chez la souris par l'ovalbumine (OVA).

La capacité de la TQ d'atténuer l'inflammation pulmonaire a été démontrée par la suite. Elle se produit en réduisant l'accumulation des éosinophiles pulmonaires, en inhibant l'expression de la cyclooxygénase 2 (COX-2), la production de la prostaglandine D2 (PGD2) et les cytokines de type Th<sub>2</sub> (IL-4, IL-5 et IL-13). L'effet de la TQ sur l'inflammation est aussi lié à sa capacité à diminuer également les taux élevés d'IgE et d'IgG1 spécifiques dans le sérum ainsi qu'en induisant la production de l'IFN- $\gamma$  dans le liquide broncho-alvéolaire (El Gazzar *et al.*, 2006a ; El Mezayen *et al.*, 2006a).

Par ailleurs, l'administration de la TQ a réduit significativement les symptômes oculaires dans la conjonctivite allergique en atténuant le recrutement des éosinophiles et en réduisant les taux d'IgE, de l'histamine et des cytokines.

Chez les souris immunisées et exposées à l'OVA, la TQ a diminué l'expression de l'ARNm et le taux sérique des interleukines comprenant l'IL-4, l'IL -5 et l'IL -13, ainsi que le TGF-  $\alpha$  (Hayat *et al.*, 2011).

Ammar et ses collaborateurs (2011) ont montré aussi que la TQ est un inhibiteur puissant de l'accumulation des cellules inflammatoires dans les lavages broncho-alvéolaires et les tissus pulmonaires des souris asthmatiques. Elle inhibe l'expression du TGF- $\beta$ 1 et l'expression de l'ARNm de l'oxyde nitrique synthase (iNOS) inductible.

De plus, l'effet anti inflammatoire de la TQ a été démontré dans l'arthrite rhumatoïde, *in vivo* et *in vitro*, Vaillancourt et ses collaborateurs (2011) et Umar et ses collaborateurs (2012 et 2015) ont rapporté que la TQ réduit le taux sérique de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6, du TNF- $\alpha$ , de l'IFN- $\gamma$  et de la prostaglandine E2 (PGE2) et qu'elle diminue également, significativement l'infiltration des polynucléaires neutrophiles dans l'articulation, chez les rats arthritiques.

### 1.2.3. Effet anticancéreux

Actuellement, la TQ fait l'objet de recherche de plusieurs études menées sur le potentiel thérapeutique anticancéreux. Plusieurs chercheurs ont démontré que la TQ exerce une activité anticancéreuse considérable et qu'elle inhibe la prolifération et induit l'apoptose des lignées cellulaires humaines des cancers du côlon, du sein, du cerveau, du pancréas, du poumon, du foie, de la prostate, des ovaires et d'autres (Gali-Muhtasib *et al.*, 2004a ; Chehl *et al.*, 2009 ; Jafri *et al.*, 2010 ; Koka *et al.*, 2010 ; Woo *et al.*, 2011 ; Odeh *et al.*, 2012 ; Attoub *et al.*, 2013 ; Taha *et al.*, 2016).

Concernant l'apoptose, la TQ induit à la fois les mécanismes p53-dépendants (Gali-Mustasib *et al.*, 2008 ; Arafa *et al.*, 2011) et p53-indépendants (Roepke *et al.*, 2007 ; Alhosin *et al.*, 2012).

Elle joue un rôle majeur dans la répression du cancer par l'induction des facteurs pro-apoptotiques et / ou la régulation négative des protéines anti-apoptotiques. Elle régule les voies de la caspase (Roepke *et al.*, 2007 ; Gali-Mustasib *et al.*, 2008 ; Banerjee *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2010 ; Hussain *et al.*, 2011).

L'apoptose peut également survenir à la suite de la production des ERO (El-Najjar *et al.*, 2010 ; Jafri *et al.*, 2010) et la déplétion des niveaux du GSH (Koka *et al.*, 2010 ; Dergarabetian *et al.*, 2013). De plus, une exposition prolongée à la TQ entraîne une perte du potentiel mitochondrial de la membrane induisant ainsi l'apoptose par la libération du cytochrome c et l'inhibition de la phosphorylation de Akt (Rajput *et al.*, 2013). En revanche, La croissance et la prolifération incontrôlées des cellules cancéreuses sont des caractéristiques importantes de la carcinogénèse, qui entraîne une augmentation de la taille de la tumeur et devient problématique pour la guérison. L'expression et/ou l'activité des régulateurs de la progression et de la prolifération du cycle cellulaire est affectée par la TQ, conduisant à la détention du cycle cellulaire et aux dommages de l'ADN. La TQ a la capacité d'arrêter les cellules cancéreuses à différentes phases du cycle cellulaire : G0/G1 (Shoieb *et al.*, 2003 ; Gali-Muhtasib *et al.*, 2004b ; Roepke *et al.*, 2007), G1/S (Caseb *et al.*, 2007) et G2/M (Gali-Muhtasib *et al.*, 2004b ; Arafa *et al.*, 2011).

L'avantage de l'effet anticancéreux de la TQ est qu'elle exerce un effet anticancéreux avec une cytotoxicité partielle sur des tumeurs normales et que ses effets anticancéreux sont activés plus spécifiquement contre les cellules cancéreuses que les cellules normales (Shoieb *et al.*, 2003).

La TQ est un composé présentant une activité chimiopréventive et réduit les effets toxiques des agents anti-néoplasiques standards. Elle est également un chimiosensibilisant lorsqu'elle est utilisée en combinaison avec des agents chimiothérapeutiques (Darakhshan *et al.*, 2015).

### **1.2.4. Effet antimicrobien**

L'effet antibactérien de la TQ a été rapporté contre certaines souches bactériennes, notamment *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis* (Khan *et al.*, 2003). La TQ présente une activité bactéricide significative, en particulier vis-à-vis des cocci à Gram positif et empêche l'adhérence cellulaire à la surface des glaçons et la formation de biofilm des bactéries pathogènes pour l'homme (Kokoska *et al.*, 2008 ; Chaieb *et al.*, 2011). Elle possède une activité antibactérienne sélective contre les bactéries buccales. Les souches buccales *Streptococcus aureus*, *S. mutans* et *S. salivarius* sont sensibles à la TQ avec des CMI allant de 8 à 64 µg/ml (Darakhshan *et al.*, 2015).

Aussi, il a été rapporté que la TQ a des effets synergiques en combinaison avec des agents antibactériens. La TQ a réduit d'au moins 4 fois la valeur des CMI de tétracycline. Dans le cas du

chlorure de benzalkonium, une diminution de 8 fois des valeurs de CMI a été observée en particulier pour *S. aureus* et *Vibrio parahaemolyticus* (Kouidhi *et al.*, 2011).

La TQ possède une activité antituberculeuse contre des isolats cliniques de *Mycobacterium tuberculosis* (Randhawa, 2011). Elle présente également une activité antifongique contre *Candida albicans*, *Candida tropicalis* et *Candida krusei* (Piras *et al.*, 2013) et contre les souches pathogènes de dermatophytes, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* et *Microsporum gypseum* (Mohmoudvand *et al.*, 2014).

### 1.2.5. Effet antidiabétique

La TQ est un agent antidiabétique. El-Mahmoudy et ses collaborateurs (2005) ont montré que la TQ supprime les réponses hyperglycémiques et hypo-insulinémiques dans un modèle de diabète induit par la streptozotocine, chez le rat. De plus, la TQ atténue la plupart des effets toxiques de la streptozotocine et préserve l'intégrité des cellules bêta en diminuant le stress oxydatif (Abdelmeguid *et al.*, 2010). La TQ supprime l'hyperglycémie et induit l'hyper-insulinémie par l'inhibition de la gluconéogenèse en inhibant l'activité des enzymes gluconéogéniques : la glucose-6-phosphatase et la fructose 1-6 diphosphatase (Fararh *et al.*, 2005 ; Pari et Sankaranarayanan, 2009). La TQ améliore également les complications associées au diabète (Woo *et al.*, 2012) que ce soit de la neuropathie (Kanter, 2008) ou de la néphropathie (Kanter, 2009 ; Omran, 2014). Par ailleurs, Al Wafai (2013) et Liu et ses collaborateurs (2016) ont montré que le traitement des rats diabétiques avec la TQ atténue l'inflammation par la normalisation du taux des cytokines proinflammatoires IL1- $\beta$  et TNF- $\alpha$  et atténue également le stress oxydant par l'augmentation du taux de la SOD, l'inhibition de la peroxydation lipidique et par la diminution du taux du MDA. La TQ peut également être utilisée comme agent thérapeutique potentiel pour normaliser la production de l'insuline dérégulée observée chez les patients VIH-1 positifs traités par une thérapie antirétrovirale hautement active (Chandra *et al.*, 2009).

### 1.3. Toxicité de la thymoquinone

La toxicité de la TQ a été l'objet de recherche de plusieurs études, dans différents modèles des animaux. El-Dakhakhany (1965) a rapporté une DL<sub>50</sub> de 10 mg/kg suivant une administration intrapéritonéale, chez le rat. Une autre étude a rapporté que chez la souris, la DL<sub>50</sub> était de 90.3 mg/kg (Mansour *et al.*, 2001). Par ailleurs, Al-Ali et ses collaborateurs (2008) ont montré que chez le rat, Les DL<sub>50</sub> obtenues suivant une administration orale et intrapéritonéale de la TQ étaient de 794.3 mg/kg et 57.5 mg/kg, respectivement.

Cependant, chez la souris, les  $DL_{50}$  obtenues étaient respectivement de 870.9 mg/kg et 104.7 mg/kg. Généralement, La dose maximale tolérée pour l'injection intrapéritonéale est de 22.5 mg/kg chez les rats mâles et de 15 mg/kg chez les femelles. Alors que dans l'étude de Abukhader (2012), la dose maximale tolérée était de 250 mg/kg pour l'administration orale chez les rats mâles et femelles.

Une seule étude clinique a été effectuée pour tester l'efficacité anti-cancéreuse de la TQ. Elle était réalisée chez 21 patients en situation de récurrence ou après échec de thérapies standards et elle a duré 20 semaines (Al-Amri et Bambosa, 2009). Aucune toxicité ni réponse thérapeutique n'ont été rapportée et la TQ a été bien tolérée à des doses de 75-2600 mg/jour (Al-Amri et Bambosa, 2009).

## 2. Stress oxydant

Le stress oxydant est un déséquilibre de la balance entre les oxydants et les antioxydants en faveur des premiers, ce qui conduit à une hyperproduction des radicaux libres et/ou une défaillance du système antioxydant (Pincemail *et al.*, 2000). Le stress oxydant se développe lorsque la production des radicaux libres, molécules oxydantes est plus rapide que leur élimination, ce qui rend l'organisme incapable de les neutraliser (Pincemail *et al.*, 1999 ; Ríos-Arrabal *et al.*, 2013).

### 2.1. Génération des radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié au niveau de l'orbitale externe. Cet électron est extrêmement instable, le radical libre peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairer son électron. Il peut soit arracher un électron (se comportant comme un oxydant), soit céder un électron (agissant comme un réducteur). La première réaction conduit généralement à la formation en chaîne de nouveaux radicaux. Ceci explique le fait que la production d'un premier radical libre peut causer des lésions importantes dans la cellule (Milane, 2004). Le tableau I et la figure 03 résument les principaux radicaux libres impliqués en biologie. Il existe deux sources des radicaux libres.

**Tableau I :** Les espèces réactives d'oxygène et de nitrogène (Devasagayam *et al.*, 2004).

L'espèce réactive	Symbole	Demi-vie biologique (seconde)
<b>Les espèces réactives de l'oxygène</b>		
Anion superoxyde	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	10 <sup>-6</sup> s
Radical hydroxyle	OH <sup>•</sup>	10 <sup>-9</sup> s
Peroxyde d'hydrogène	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Stable
Radical peroxyde	ROO <sup>•</sup>	Seconde
Hydroperoxyde	ROOH	Stable
Oxygène singulet	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	10 <sup>-6</sup> s
Ozone	O <sub>3</sub>	Seconde
<b>Les espèces réactives d'azote</b>		
Oxyde nitrique	NO <sup>•</sup>	Seconde
Peroxynitrite	ONOO <sup>-</sup>	10 <sup>-3</sup> s
Acide peroxynitrique	ONOOH	Stable
Dioxyde de nitrogène	NO <sub>2</sub>	Seconde

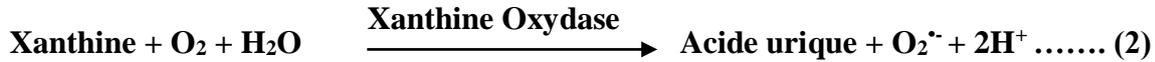
### 2.1.1. Production endogène

Les radicaux dérivés de l'oxygène représentent la classe la plus importante des radicaux libres générées dans les systèmes vivants (Grassi *et al.*, 2010), produits par des réactions enzymatiques dans les cellules (Pérez-Pérez *et al.*, 2013). La génération des espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les cellules phagocytaires commence suite à l'absorption rapide de l'oxygène. Ce dernier est une molécule biradicalaire formée de deux atomes présentant sur leurs orbitaux externes deux électrons non appariés. Il est donc susceptible de capter facilement 1<sup>er</sup> puis 2<sup>ème</sup> électron pour être partiellement réduit en anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) suite à l'activation d'une enzyme membranaire des cellules phagocytaires : la NADPH oxydase (Equation 1).



Au niveau de la mitochondrie, lors du transfert d'électron dans la chaîne respiratoire, l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> est généré par réaction de l'O<sub>2</sub> avec un radical semi-ubiquinone (Lagourge et Lorsson, 2013). Les complexes NADH-ubiquinone oxydoréductase et l'ubiquinone-cytochrome c réductase de la mitochondrie génère l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> et l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Zhang et Gutterman, 2007 ; Grivennikova et Vinogradov, 2013).

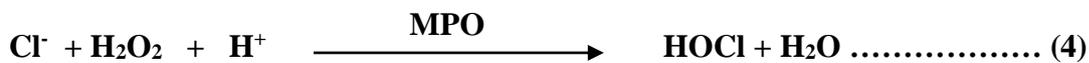
La xanthine oxydase (XO) est une autre enzyme qui utilise l'oxygène moléculaire comme un accepteur d'électrons en produisant l' $O_2^{\cdot-}$  (Equation 2) au cours de l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique (O'Mahony *et al.*, 2013).



L'anion superoxyde est rapidement converti en un peroxyde d'hydrogène par l'intermédiaire de la Superoxyde Dismutase (SOD) (Equation 3).



Les espèces réactives peuvent également être générées par la myéloperoxydase (MPO), qui est présente dans les granules cytoplasmiques des neutrophiles. En présence de l'ion chlorure qui est omniprésent, le  $H_2O_2$  est converti en hypochloreux (HOCl), un oxydant puissant et un agent antimicrobien (Equation 4) (Babior, 1999 ; Nimse et Pal, 2015).



Le radical hydroxyle peut être également généré à partir de  $O_2^{\cdot-}$  et  $H_2O_2$  par la réaction de Fenton en présence de fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ) (Equation 5) et/ou Haber-Weiss (Equation 6), donnant naissance au radical hydroxyle (Night, 1999).

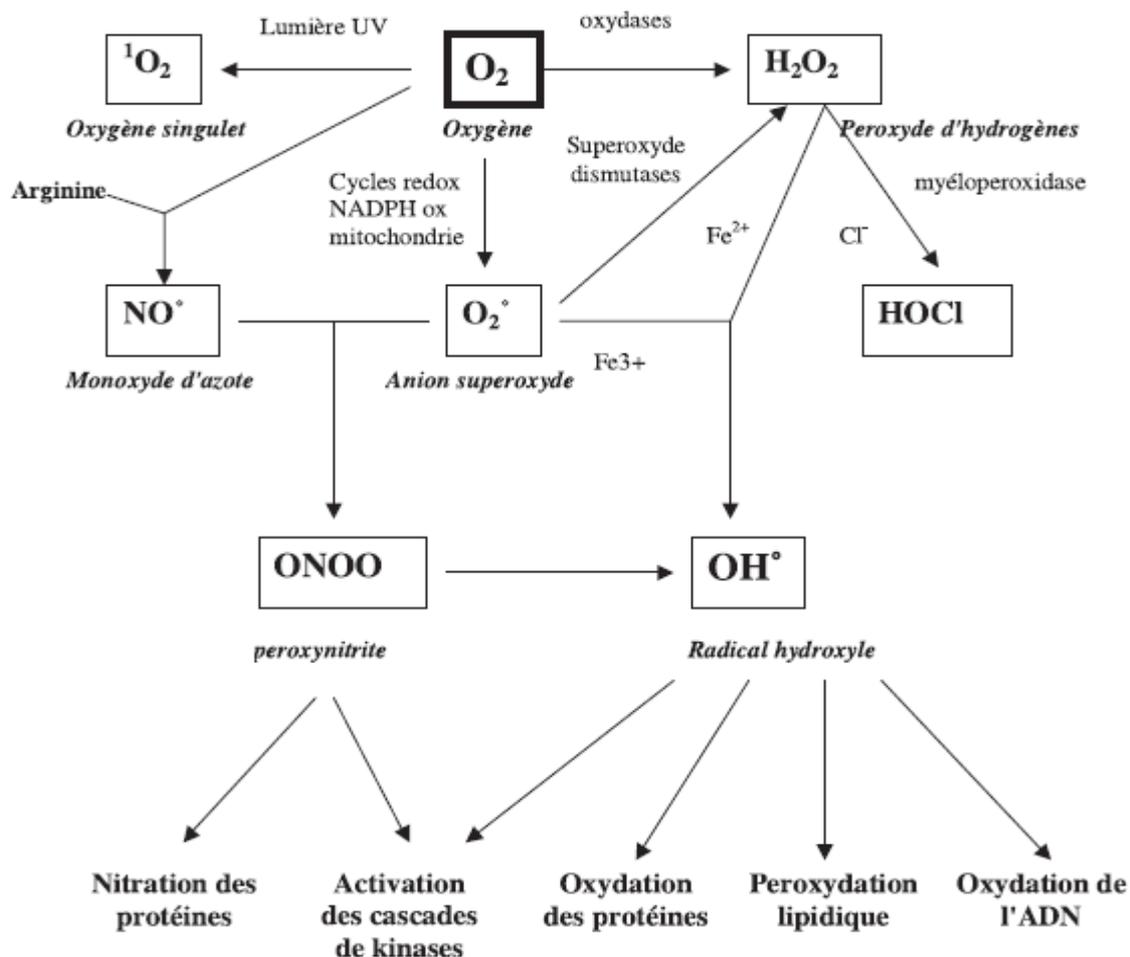


L'oxyde nitrique synthase (NOS) est un générateur important du  $NO^{\cdot}$ , à des fins de médiation par les neurones, les cellules endothéliales ou les macrophages. Le  $NO^{\cdot}$  permet la production des autres espèces réactives du nitrogène tel que le peroxydinitrite  $ONOO^-$  (Rahal *et al.*, 2014).

### 2.1.2. Production exogène

L'organisme humain est exposé à l'agression de différents agents capables d'induire la génération des radicaux libres. Les rayonnements UV (ultra-violet) induisent la synthèse de radicaux libres et de molécules génératrices de radicaux libres par l'intermédiaire d'agents photo-sensibilisants. Les radiations ionisantes provoquent également la génération de radicaux libres dérivés de l'oxygène (Afonso *et al.*, 2007). L'ingestion d'alcool est suivie de la formation de radicaux libres selon divers mécanismes (Hadi, 2004). Des molécules toxiques telles que le NO, le  $NO_2$ , le  $SO_2$  et l' $O_3$  sont responsables d'une auto-oxydation des acides gras polyinsaturés des alvéoles pulmonaires (Hadi, 2004).

Les métaux de transition tels que le mercure, le fer, le cadmium, le nickel, l'arsenic et l'amiante ont la capacité de produire les ERO par l'intermédiaire de la réaction de Fenton comme la production du radical hydroxyle et l' $O_2^{\cdot-}$ . Le  $Ni^{+2}$  et le  $Fe^{+3}$  peuvent réagir avec  $H_2O_2$  par différents mécanismes pour former des complexes du métal-oxygène (Mena *et al.*, 2009 ; Wanges *et al.*, 2014). Les métaux lourds ayant une grande affinité avec les groupements sulfhydryles (-SH), inactivent facilement les antioxydants contenant du soufre (Moller *et al.*, 1996 ; Valko *et al.*, 2005). Les médicaments (traitements contre le cancer, psoralène), les radiations (ionisantes, ultraviolets, micro-ondes) et l'absorption dermique (insecticides, médicaments) peuvent également contribuer à la génération des ERO (Moller *et al.*, 1996).



**Figure 03 :** Origine des différentes espèces réactives de l'oxygène et de l'azote impliquées en biologie (Favier, 2003).

### 2.2. Principales cibles biologiques des espèces réactives de l'oxygène

Les radicaux libres (RLs) sont des molécules instables très réactives. Ils retrouvent leur stabilité en participant à des réactions chimiques dont la conséquence est l'oxydation des acides nucléiques, des lipides membranaires, des acides aminés et des glucides (Dalton *et al.*, 2002 ; Favier, 2003). À des concentrations physiologiques, les RLs jouent des rôles dans la

signalisation, la migration et la différenciation cellulaire (Ziech *et al.*, 2010). Mais à des concentrations plus élevées, ils peuvent contribuer à l'apparition de diverses pathologies comme les cancers ou les maladies cardio-vasculaires, ils peuvent encore induire la mort cellulaire et l'apoptose (Salido et Rosado, 2009).

### 2.2.1. Acides désoxyribonucléiques (ADN)

L'ADN est une cible privilégiée pour les espèces réactives de l'oxygène. Ces dernières peuvent induire de nombreuses modifications telles que des lésions de bases nucléotidiques (purines et pyrimidines). La guanine par exemple, peut réagir avec  $\text{OH}^\bullet$  pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) qui au lieu de s'apparier avec la cytosine, s'associera avec l'adénine. Ce nouvel appariement entraîne des mutations au sein de l'ADN et conduit à des altérations du message génétique permettant ainsi le déclenchement du cancer et du vieillissement (Haleng *et al.*, 2007).

### 2.2.2. Protéines

Les acides aminés possèdent des susceptibilités différentes vis-à-vis des ERO. Les plus réactifs sont ceux qui comportent une fonction thiol (SH) (Favier, 2003). Les acides aminés les plus privilégiés pour les ERO sont l'histidine, le tryptophane, la proline, la cystéine et la tyrosine. Toute attaque radicalaire d'un acide aminé provoquera l'oxydation de certains résidus, ce qui conduit à l'apparition de groupements carbonylés, de clivages des chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaînes. La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes (non- reconnaissance d'un récepteur par un ligand, perte d'activité enzymatique...) (Favier, 2003). Certaines protéines oxydées sont peu dégradées et forment des agrégats qui s'accumulent dans les cellules et dans le compartiment extracellulaire (Haleng *et al.*, 2007). D'autres deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases et notamment celle du protéasome (Favier, 2003). Le dosage plasmatique des protéines carbonylées est actuellement le marqueur d'oxydation avancée des protéines le plus utilisé, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. Il permet de mesurer les dommages oxydatifs des protéines (Halliwell et Gutteridge, 2007).

### 2.2.3. Lipoprotéines

L'attaque radicalaire des lipoprotéines circulantes aboutit à la formation de molécules LDL oxydées, qui seront captées par des récepteurs spécifiques des macrophages. Ces macrophages se transforment petit à petit en cellules spumeuses qui ont un rôle important dans les premières étapes de l'athérosclérose) (Nakajima *et al.*, 2006). En outre, ces LDL oxydées sont

immunogènes et les complexes immuns formés peuvent activer la voie classique du complément et générer la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages (Saad *et al.*, 2006).

### **2.2.4. Lipides membranaires**

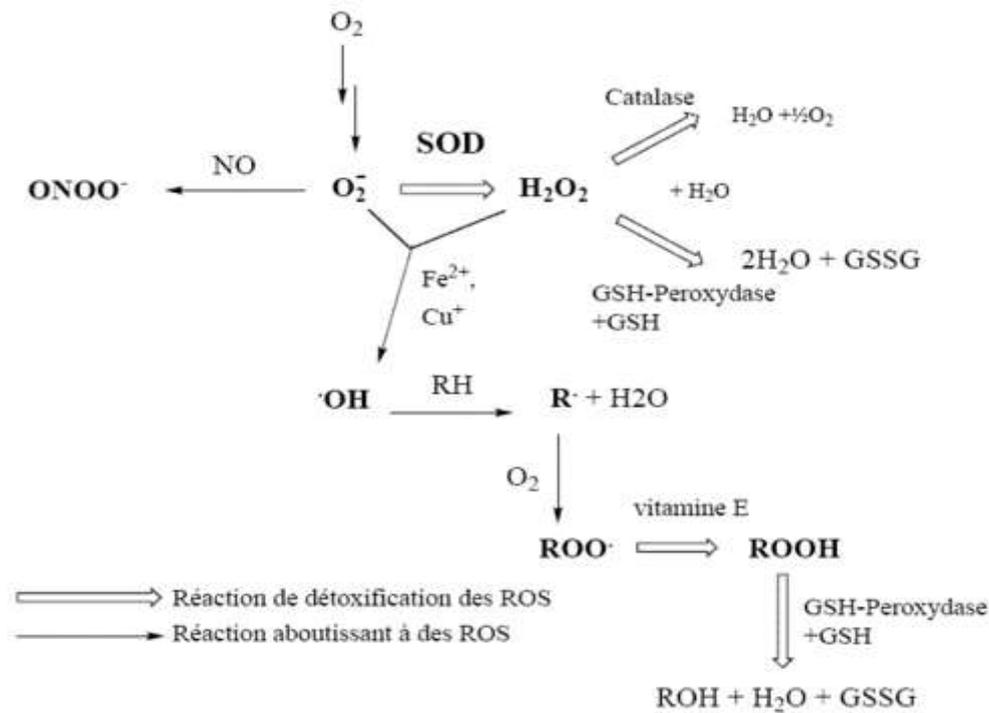
Les acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle. Ce radical est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons des acides gras polyinsaturés (AGPI) : c'est la phase d'initiation. Le radical lipidique réagit avec une molécule d'oxygène pour former un radical peroxyde (ROO<sup>•</sup>), suffisamment réactif pour arracher un H<sup>+</sup> à un AGPI voisin, propageant ainsi la réaction (Atkin *et al.*, 2006). Il en résulte une altération de la fluidité membranaire qui conduit inévitablement à la mort cellulaire. La peroxydation lipidique génère une variété de produits de décomposition relativement stables, principalement des aldéhydes  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturés tels le malondialdéhyde, le 4-hydroxy-2- nonéanal, le 2-propéanal et les isoprostanes qui peuvent être dosés dans le plasma et l'urine comme marqueurs indirects du stress oxydant (Gardès *et al.*, 2003).

### **2.3. Systèmes antioxydants**

Il existe deux sortes d'antioxydants : les antioxydants enzymatiques et les antioxydants non enzymatiques. Le rôle de ces antioxydants est de maintenir un niveau non cytotoxique des espèces réactives de l'oxygène. Une défaillance ou un dysfonctionnement de ces systèmes engendre une augmentation des dommages tissulaires (Gardès *et al.*, 2003 ; Germain *et al.*, 2003).

#### **2.3.1. Système antioxydant enzymatique**

Les antioxydants enzymatiques sont considérés comme la première ligne de défense de l'organisme contre les ERO. Parmi ces enzymes on trouve : la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion réductase (figure 04).



**Figure 04** : Schéma des défenses antioxydantes enzymatiques (Bonnefont-Rouselet, 2003).

### 2.3.1.1. Catalase

La catalase est une enzyme cytoplasmique homotétramérique de 240 kD, responsable de l'élimination du  $H_2O_2$  par une transformation en  $H_2O$  et  $O_2$ . L'affinité de la catalase vis-à-vis de l' $H_2O_2$  est élevée seulement lorsque les teneurs en peroxyde d'hydrogène sont accrues (Mates *et al.*, 1999 ; Powers et Lennon, 1999). Cette enzyme est considérée comme la source majeure de protection (Milane, 2004 ; Borg et Reeber, 2008). Elle est abondante dans le foie et les globules rouges. Elle se retrouve préférentiellement dans les peroxysomes et en plus faible quantité dans le cytosol. L'activité de la catalase est augmentée lorsque le niveau du stress oxydatif est élevé ou la quantité du glutathion peroxydase est faible. Elle joue un rôle significatif en permettant d'éliminer l'excès de peroxyde d'hydrogène afin que la réaction de Fenton ne puisse s'amplifier (Cantin, 1999).

### 2.3.1.2. Superoxyde dismutase

Les superoxydes dismutases (SOD) sont des métalloprotéines qui catalysent la dismutation de l' $O_2^{\cdot -}$  en  $H_2O_2$  et oxygène. Ils existent sous trois isoformes qui se différencient par leur localisation cellulaire, leur cofacteur métallique et leur structure quaternaire. On trouve une forme présente au niveau des cytosols, noyaux et dans l'espace inter-membranaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD). (Okado-Matsumoto et Fridovich, 2001 ; Sturtz *et al.*, 2001). Une deuxième forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une troisième forme

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

### **2.3.1.3. Glutathion peroxydase (GPx)**

La glutathion peroxydase (GPx) est une sélénoprotéine, une enzyme cytosolique qui agit en synergie avec la CAT puisqu'elle accélère la dismutation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O et O<sub>2</sub>. Cette réaction de réduction des peroxydes nécessite l'oxydation de deux molécules de glutathion réduit (GSH) en glutathion-disulfure (GSSG) (Mates *et al.*, 1999 ; Powers et Lennon, 1999). Il existe également une glutathion peroxydase associée à la membrane mitochondriale, la phospholipide-hydroperoxyde glutathion peroxydase (PHGPx) qui est responsable de la diminution de la peroxydation lipidique (Nomura *et al.*, 2000).

### **2.3.1.4. Glutathion réductase (GR)**

La glutathion réductase est l'enzyme responsable de la génération du GSH à partir du GSSG par l'intermédiaire du NADPH qui est utilisé en tant que donneur de protons. En effet, la concentration cellulaire en glutathion étant limitée, il est nécessaire de le réduire constamment pour que la GPx maintienne sa fonction. Cette enzyme est présente dans le cytosol et dans les mitochondries (Avissar *et al.*, 1989).

## **2.3.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques**

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

### **2.3.2.1. Glutathion réduit**

Le glutathion réduit (GSH) est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine), c'est le substrat de la glutathion peroxydase (GPx), utilisé pour réduire le peroxyde d'hydrogène et/ou les peroxydes organiques. Il peut aussi réduire les niveaux de peroxydation lipidique, les radicaux formés par l'oxydation des vitamines E et C et peut chélater les métaux de transition (Power et Lennon, 1999 ; Packer *et al.*, 2001). Le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur de la peroxydation lipidique et permet d'objectiver l'importance du stress oxydant puisque plus le flux des peroxydes est important, plus le

glutathion réduit est consommé et par conséquent le glutathion oxydé augmente (Milane, 2004 ; Haleng *et al.*, 2007).

### 2.3.2.2. Vitamines

La vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol) et la vitamine C (acide ascorbique) sont les antioxydants les plus puissants. La vitamine E, grâce à son caractère hydrophobe se fixe aux membranes et peut ainsi séquestrer les radicaux libres empêchant la propagation des réactions de peroxydation lipidique (Evans, 2006). L'acide ascorbique, hydrosoluble se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire et peut capter directement l' $O_2^{\cdot-}$  et l' $OH^{\cdot}$ . Elle inhibe également la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire issue de sa réaction avec des radicaux lipidiques (Evans, 2006).

La vitamine A est un antioxydant qui peut protéger les lipides contre l'oxydation. Plusieurs recherches ultérieures ont montré son potentiel en tant qu'antioxydant dans le cas des maladies cardiaques et sa contribution à la protection des LDL humains contre l'oxydation (Vieira *et al.*, 1995 ; Ciaccio et Riccio, 1995 ; Parker, 1996).

### 2.3.2.3. Oligoéléments

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

### 2.4.2.4. Acide urique et bilirubine

L'acide urique est le produit terminal majeur du métabolisme des purines chez l'homme. Il est majoritairement ionisé, à pH physiologique, sous forme d'urate. Ce dernier est un piègeur puissant de radicaux ( $OH^{\cdot}$ ,  $ROO^{\cdot}$  et  $NOO^{\cdot}$ ) (Haleng *et al.*, 2007). Ces réactions conduisent à des espèces radicalaires qui seront à leur tour réduites (notamment par l'acide ascorbique). Les propriétés antioxydantes de l'urate *in vivo* peuvent être appréciées indirectement du fait qu'un produit de réaction de l'urate avec les ERO ; l'allantoïne est présente à des taux élevés lors d'un stress oxydant (Haleng *et al.*, 2007).

La bilirubine est un produit terminal de la dégradation de l'hème et résulte essentiellement du catabolisme de l'hémoglobine par les cellules réticuloendothéliales. Composé non hydrosoluble, elle se lie à l'albumine dans un rapport stœchiométrique 1/1, ce qui empêche sa pénétration dans des tissus riches en lipides tels que le cerveau. La bilirubine est capable de piéger ROO• et l'oxygène singulet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). Ainsi, elle protège l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (Haleng *et al.*, 2007).

### 3. Xanthine oxydoréductase

La xanthine oxydoréductase (XOR) est un complexe molybdoflavoenzyme. C'est le composant majeur de la membrane du globule gras du lait (Keenan, 2001). Cette enzyme est un homodimère de poids moléculaire de 300 KDa (Humain) et 290 KDa (Bovin), chaque sous-unité est constituée de quatre centres d'oxydoréduction : un cofacteur de molybdène (Mo), un FAD (flavine adénine dinucléotide), et deux centres Fe-S (2 Fe-S) (Harrison, 2002 ; Kelley, 2015). Elle est généralement reconnue comme l'enzyme qui catalyse les deux dernières réactions du catabolisme des bases azotées purines. Il s'agit de l'hydroxylation oxydative de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique (Harrison, 2002).

#### 3.1. Mécanisme d'action et formes de la xanthine oxydoréductase

La Xanthine oxydoréductase (XOR) apparaît sous deux formes inter-convertibles entre elles, réversiblement par des réactions des sulfures ou irréversiblement par la protéolyse d'un segment de la xanthine déshydrogénase (XDH). Les deux formes sont fonctionnellement distinctes.

a) **La xanthine déshydrogénase** (XDH ; EC 1.1.1.204), exprimée d'une manière constitutive. C'est la forme qui prédomine *in vivo*. Elle utilise préférentiellement le NAD<sup>+</sup> comme accepteur d'électrons pour ses réactions d'oxydoréduction, ce qui génère un produit stable, le NADH (figure 05 A) (Harrison, 2002).

b) **La xanthine oxydase** (XO ; EC 1.1.3.22), cette forme est générée par la modification post-traductionnelle de la XDH. Elle est incapable d'utiliser le NAD<sup>+</sup> comme accepteur d'électrons, alors qu'elle nécessite l'utilisation de l'oxygène moléculaire comme accepteur d'électrons, produisant ainsi l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène (figure 05 B) (Harrison, 2002 ; Terpolilli *et al.*, 2012). La XO catalyse aussi la réduction du nitrate en nitrite et NO• (figure 05 C) (Terpolilli *et al.*, 2012).

En plus de l'hypoxanthine et la xanthine, la XOR catalyse l'oxydation d'une large gamme de N-hétérocycliques et des substrats aldéhydiques. Il peut également agir comme un NADH oxydase (Bray, 1975). Les substrats réducteurs agissent sur le centre Mo, et les électrons sont transférés

par l'intermédiaire des 2 centres Fe/S vers le centre FAD où le  $\text{NAD}^+$  ou l' $\text{O}_2$  est réduit (figure 05 A et B). Par contre, Le NADH agit et donne ses électrons au centre FAD qui sont en suite transférés au centre Mo où le nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) est réduit en  $\text{NO}^*$  (figure 05 D). En présence d'oxygène la  $\text{NO}^*$  synthétisée peut réagir avec l'anion superoxyde pour former la peroxyntrite (Cantu-Medellin et Kelley, 2013b).

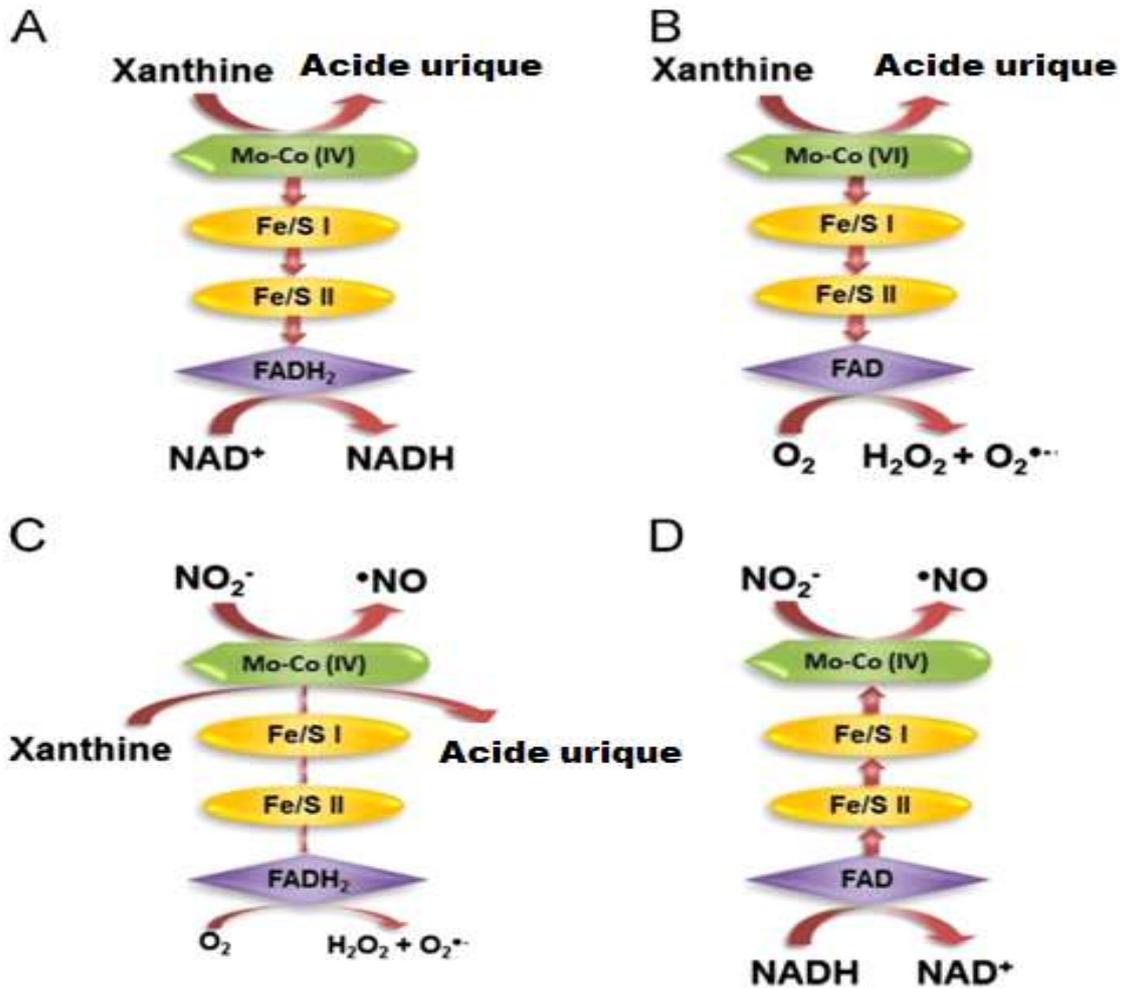


Figure 05 : Les réactions catalysées par la XOR.

(A) La XDH. (B) La XO. (C) Le nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) est réduit en  $\text{NO}^*$  au centre Mo-co (l'électron est fourni par la xanthine). (D) Le  $\text{NO}_2^-$  est réduit en  $\text{NO}^*$  au centre Mo-co (les électrons sont fournis par le NADH au centre FAD puis transférés au centre Mo) (Cantu-Medellin et Kelley, 2013a ; 2013b).

### 3.2. Distribution et expression de la XOR

La XOR se trouve dans un large éventail d'espèces (Harrison, 2002), chez les mammifères, le foie et l'intestin expriment l'activité XOR la plus élevée par rapport aux autres tissus qui expriment peu d'activité XOR (Harrison, 2002).

Dans les cellules, la localisation de la XOR est montrée par une immunoréactivité XOR, dans les cellules épithéliales des glandes mammaires et les cellules endothéliales capillaires d'une variété de tissus comprenant le foie, le poumon, le muscle squelettique, le cœur et l'intestin (Cantu-Medellin et Kelley, 2013a ; Kelley, 2015).

Dans les hépatocytes humains, la XOR est exprimée plus fortement dans la région périportale, l'endothélium sinusoidal, les cellules épithéliales et la région apicale. Alors que, dans l'intestin, l'enzyme est détectée dans les jonctions serrées entre les cellules épithéliales intestinales humaines (Harrison, 2002). En revanche, plusieurs autres études ont localisé la XOR dans les hépatocytes des rats (Ichikawa *et al.*, 1992) et le foie de poulet (Hattori, 1989). Dans les hépatocytes des rats (Ichikawa *et al.*, 1992). La XOR est localisée dans le cytosol et sur la surface luminale des cellules endothéliales sinusoidales (Harrison, 2002). De même, une localisation dans les peroxysomes, le réticulum endoplasmique et les lysosomes a été mise en évidence (Hoare, 2002). Cette enzyme se trouve également dans les fluides biologiques tels que le sang, le lait, le fluide nasal, la salive et le liquide synovial (Benboubetra *et al.*, 2001 ; Vorbach *et al.*, 2003 ; Battelli *et al.*, 2014a).

### 3. 3. Rôle de la XOR dans l'inflammation

La XOR est impliquée dans le déroulement de la réaction inflammatoire, elle participe également à son amplification par sa capacité de produire les espèces réactives oxygénées et azotées (Meneshian et Bulkley, 2002). Au cours de l'inflammation, la XOR est activée par différentes cytokines, tels que IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , l'IL-1, l'IL-3 et C5a qui provoquent ainsi la conversion de la XDH en XO (Harrison, 2002 ; Meneshian et Bulkley, 2002). Par conséquent, la production des ERO est augmentée, ce qui provoque l'activation de NF- $\kappa$ B, le régulateur de la production des cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2 et IL-6) (Schreck et Baeuerle, 1991 ; Burdon et Gill, 1993).

La XOR endothéliale est suggérée de déclencher une réponse inflammatoire microvasculaire, menant au recrutement et à l'activation des neutrophiles circulants, ce qui conduit à la phagocytose et au piégeage des pathogènes circulants (Meneshian et Bulkley, 2002 ; Vorbach *et al.*, 2003). En revanche, les ERO générées par la XOR peuvent également réagir avec les composés de la membrane cellulaire, tel que l'acide arachidonique, pour produire des lipides chimioattractants des neutrophiles amplifiant ainsi la réponse inflammatoire (Perez *et al.*, 1990). Ces ERO induisent ainsi l'expression de P-sélectine à la surface des cellules endothéliales en réponse à l'inflammation (Takano *et al.*, 2005). La génération des ERO par la XOR semble aussi être impliquée dans l'activation du système complément (Tanhehco *et al.*, 2000 ; Vorbach *et al.*,

2003). D'après ces données, on peut dire que la XOR est considérée comme une composante importante du système immunitaire inné.

La XOR cause aussi la goutte, une maladie inflammatoire due à des concentrations élevées de cristaux d'acide urique dans le sérum (Masuda *et al.*, 2014 ; Masuda *et al.*, 2015). Dans l'arthrite rhumatoïde, elle amplifie l'inflammation synoviale conduisant à l'érosion de l'os et la propagation de la maladie (Blake *et al.*, 1997).

## 4. Hépatotoxicité

### 4.1. Anatomie et histologie du foie

Malgré la complexité de ses fonctions, le foie a un aspect homogène, ce qui rend l'anatomie hépatique un sujet d'étude difficile (Juza *et al.*, 2014). Le foie est le plus gros organe du corps, il représente environ 2% du poids du corps humain. Cet organe est divisé en deux parties, le lobe gauche (1/3 du volume) et le lobe droit (2/3 du volume), séparés par le ligament falciforme. Ces lobes sont subdivisés en huit segments fonctionnels, appelés lobules, délimités par des cloisons fibreuses. Chaque segment a son propre pédicule portal, composé d'une branche de l'artère hépatique, d'une branche portale, d'une voie biliaire et une branche veineuse hépatique distincte (figure 06) (Soler *et al.*, 2001 ; Liau *et al.*, 2004). Chaque lobule est formé d'un ensemble de cellules : hépatocytes, cellules de Kupffer, cellules sinusoidales et les cellules stellaires (Malarkey *et al.*, 2005).

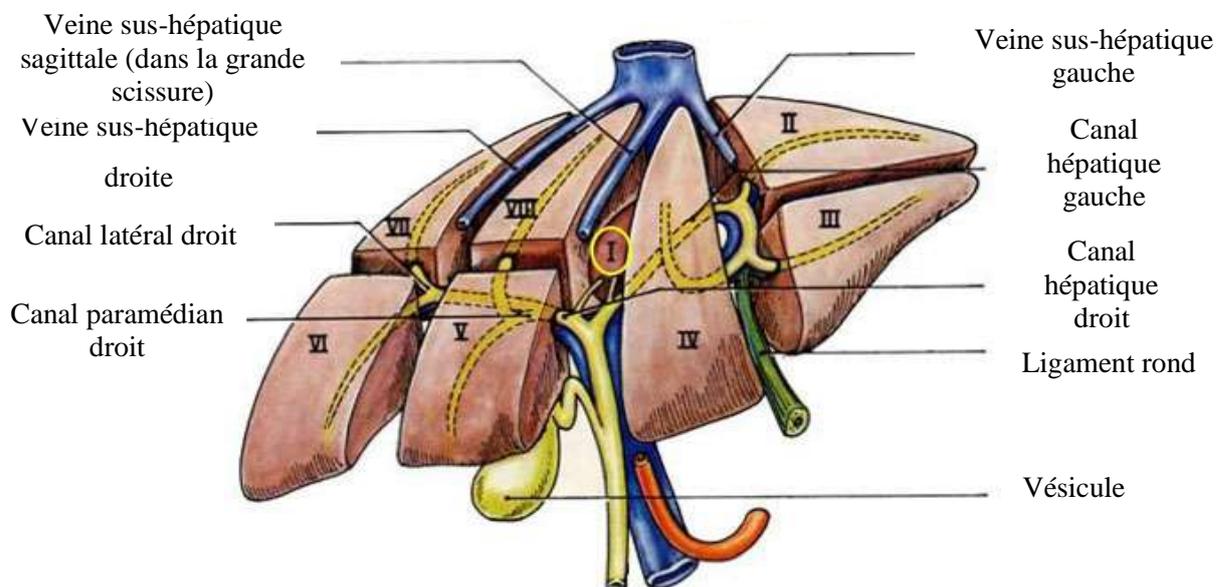


Figure 06 : Anatomie segmentaire du foie (Sibulesky, 2013).

### 4.2. Fonctions principales du foie

#### 4.2.1. Métabolisme des nutriments

Le foie est une véritable usine biochimique, principal organe responsable du métabolisme des produits chimiques et des aliments (Sicar, 2008). Il assure par les hépatocytes la glycogénogénèse ou la glycolyse, également la glycogénolyse et la néoglucogénèse à partir de molécules issues de la dégradation des triglycérides (Plaa et Charbonneau, 2001). Les hépatocytes assurent la production des triglycérides ainsi que la synthèse du cholestérol et sa dégradation en acides biliaires. Ils interviennent dans la formation des lipoprotéines telles que les VLDL et les HDL (Francis *et al.*, 2003 ; Bechmann *et al.*, 2012) et le catabolisme des peptides et des acides aminés qui sont transformés en urée (Ader *et al.*, 2006 ; Ganong *et al.*, 2012). Les hépatocytes interviennent également dans l'anabolisme de diverses protéines qui sont ensuite déversées dans le sang telles que les facteurs de coagulation, l'albumine et le fibrinogène, protéines de la phase aigüe de l'inflammation (Geown, 2003 ; Singh, 2011).

#### 4.2.2. Sécrétion biliaire

La bile est un liquide jaunâtre, composée de deux constituants majeurs : la bilirubine et les acides biliaires. La bilirubine est le produit du catabolisme de l'hème par les hépatocytes faisant suite à la dégradation des hématies âgées par les cellules de Kupffer. Les acides biliaires sont synthétisés exclusivement dans les hépatocytes à partir du cholestérol par l'addition d'un groupement OH sur le carbone 7 et la disparition de la double liaison (C5-C6). Les acides biliaires jouent un rôle primordial dans l'absorption intestinale des lipides et des vitamines liposolubles (Dooley *et al.*, 2011 ; Monfort, 2016).

#### 4.2.3. Défense immunitaire

Le foie joue un rôle primordial dans la défense immunitaire : il synthétise des protéines de la phase aigüe de l'inflammation (IL-1 et IL-6 et CRP) et du fibrinogène. En outre, il élimine des particules et des bactéries circulantes par les cellules macrophagiques de Kupffer qui confèrent au foie un rôle de filtre sanguin. L'activation des cellules de kupffer entraîne ainsi la production de cytokines proinflammatoires et des espèces réactives de l'oxygène qui agissent en tant que bactéricides (Klein *et al.*, 1994 ; Dooley *et al.*, 2011).

#### 4.2.4. Détoxification sanguine

Le foie joue un rôle clef dans les processus de détoxification en éliminant du sang les substances nuisibles en les transformant en composants moins dangereux. Le processus de détoxification est effectué en suivant deux phases : dans une première phase, les substances lipophiles sont

transformées par réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse catalysées généralement par les cytochromes P<sub>450</sub>. D'autres oxydases peuvent intervenir à savoir la monoamine oxydase (MAO), la myéloperoxydase (MPO) et la xanthine oxydase (XO), augmentant ainsi la polarité de la molécule (Rodés *et al.*, 2007).

La deuxième étape consiste à conjuguer les produits issus de la première phase avec d'autres substances dérivées du foie par glucurono-conjugaison, de sulfo-conjugaison, d'acétylation, de méthylation, de glycine conjugaison et de glutathion conjugaison (Custodio *et al.*, 2008). Le produit conjugué caractérisé par une hydrophilie accrue peut être excrété plus facilement par les reins ou dans la lumière intestinale par excrétion dans la bile. Les composés nocifs conjugués avec le glucuronide, le glutathion et le sulfate sont pompés dans la bile ou dans le sang (Custodio *et al.*, 2008).

L'ammoniaque, qui est naturellement produite par le colon lors de la décomposition du contenu digestif, est dégradée par les hépatocytes en urée, puis éliminée dans les urines (Dhiman et Chawla, 2008 ; Natesan *et al.*, 2016).

### **4.3. Hépatotoxicité induite par CCl<sub>4</sub>**

L'hépatotoxicité correspond à la destruction des hépatocytes ou à des hépatopathies suite à l'exposition à certaines substances dites hépatotoxiques ou hépatotoxines (Navarro et Senior, 2006). Parmi les principaux hépatotoxines, on peut citer : l'éthanol, certains médicaments comme le paracétamol (l'acétaminophène), les antibiotiques et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et les produits chimiques tel que le tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>). Le modèle de l'hépatotoxicité induite par CCl<sub>4</sub> constitue un modèle expérimental permettant l'étude des mécanismes physiopathogéniques (Conso et Hermouet, 1993). L'hépatotoxicité aiguë, suite à l'exposition à un produit chimique peut se manifester principalement par une stéatose et nécrose hépatiques (Pessayre *et al.*, 1999).

#### **4.3.1. Biotransformation du tétrachlorure de carbone**

Le tétrachlorure de carbone, ou tétrachlorométhane (CCl<sub>4</sub>) est un hydrocarbure halogéné, solvant hautement volatil, peu soluble dans l'eau. Il est utilisé dans les laboratoires, comme agent nettoyant et dégraissant industriel (Sahu, 2007).

Le tétrachlorure de carbone est absorbé principalement par inhalation et par voie orale chez l'homme. Le foie est le siège de la biotransformation du CCl<sub>4</sub> dans lequel le tétrachlorure de carbone est activé par les cytochromes P<sub>450</sub> : 2E1 (Raucy *et al.*, 1993 ; Gruebele *et al.*, 1996), 2B1 ou 2B2. Ces cytochromes P<sub>450</sub> catalysent la déchloration réductrice pour former le radical

trichlorométhyl ( $\text{CCl}_3^\bullet$ ). Ce radical peut interagir avec des molécules cellulaires (ADN, protéines et lipides) altérant des métabolismes essentiels comme celui des lipides (Basu, 2003 ; Manibusan *et al.*, 2007).

Dans les conditions anaérobiques, ce radical peut former du chloroforme ( $\text{CHCl}_3$ ) après avoir réagi avec l'hydrogène et l'hexachloroéthane après dimérisation. Par contre, en présence d'une forte tension en oxygène dans les tissus, le radical  $\text{CCl}_3^\bullet$  se transforme en un dérivé hautement réactif, soit le peroxyde de trichlorométhyl ( $\text{CCl}_3\text{OO}^\bullet$ ). Ce dernier peut provoquer la peroxydation des lipides et l'altération de la perméabilité des mitochondries, du réticulum endoplasmique et des membranes plasmiques et il en résulte un trouble de l'homéostasie calcique. Le  $\text{CCl}_3\text{OO}^\bullet$  peut réagir et produire du phosgène ( $\text{COCl}_2$ ), qui peut à nouveau interagir avec le tissu et les macromolécules ou avec de l'eau, produisant finalement de l'acide chlorhydrique (HCl) et le dioxyde de carbone (Manibusan *et al.*, 2007) (figure 07).

En cas de déficience en  $\text{O}_2$ , condition observée dans la région centrolobulaire du foie où prédominent les lésions anatomopathologiques lors des intoxications, le phosgène se forme du  $\text{CCl}_2$ -carbène, dérivé encore plus réactif. La compétition d'électronégativité entre l'atome de chlore et celui d'oxygène, se joue en faveur du chlore qui se détache 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  $\text{P}_{450}$ , inhibant sa possibilité de réoxydation et par conséquent son activité. 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.

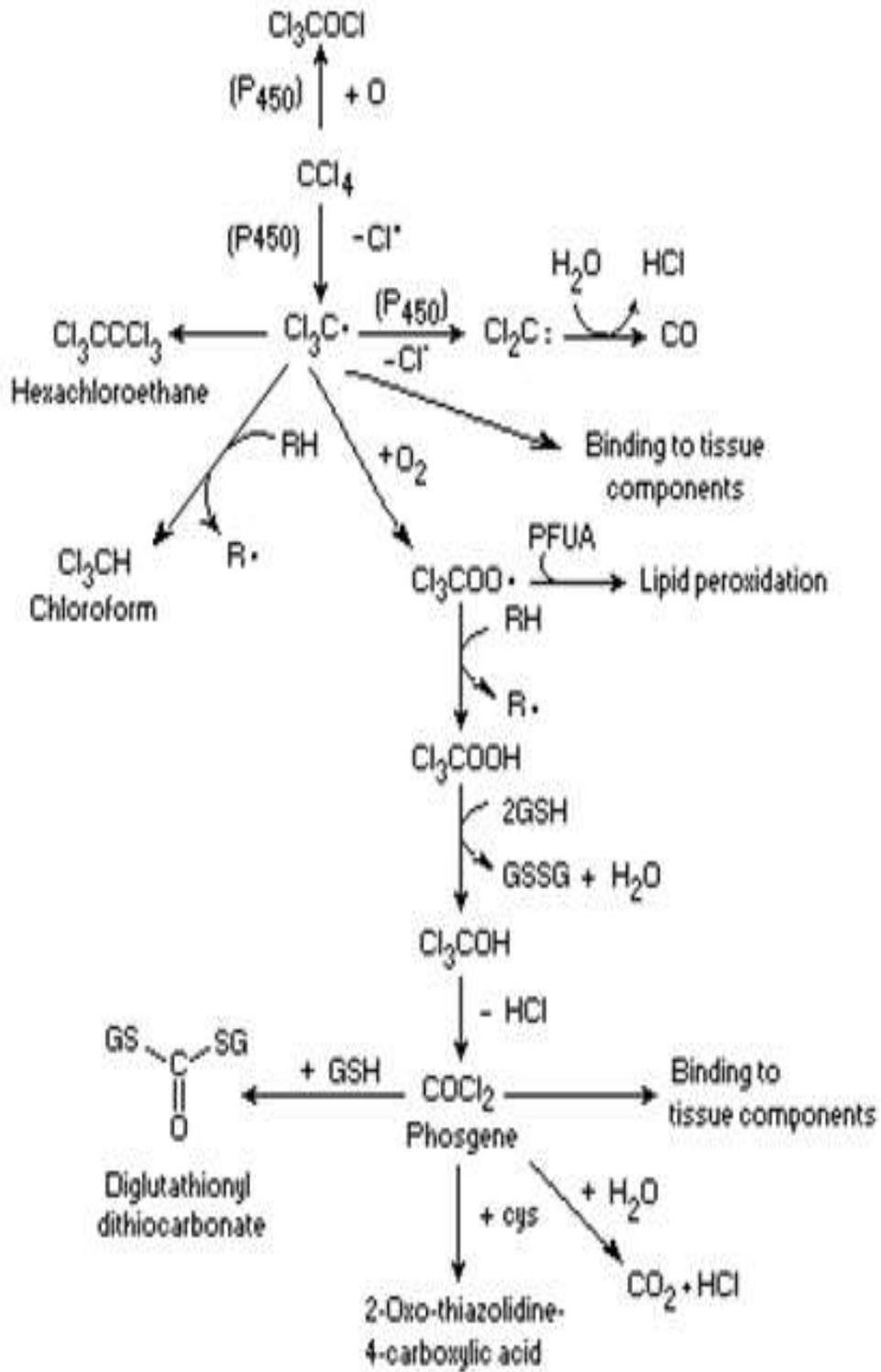
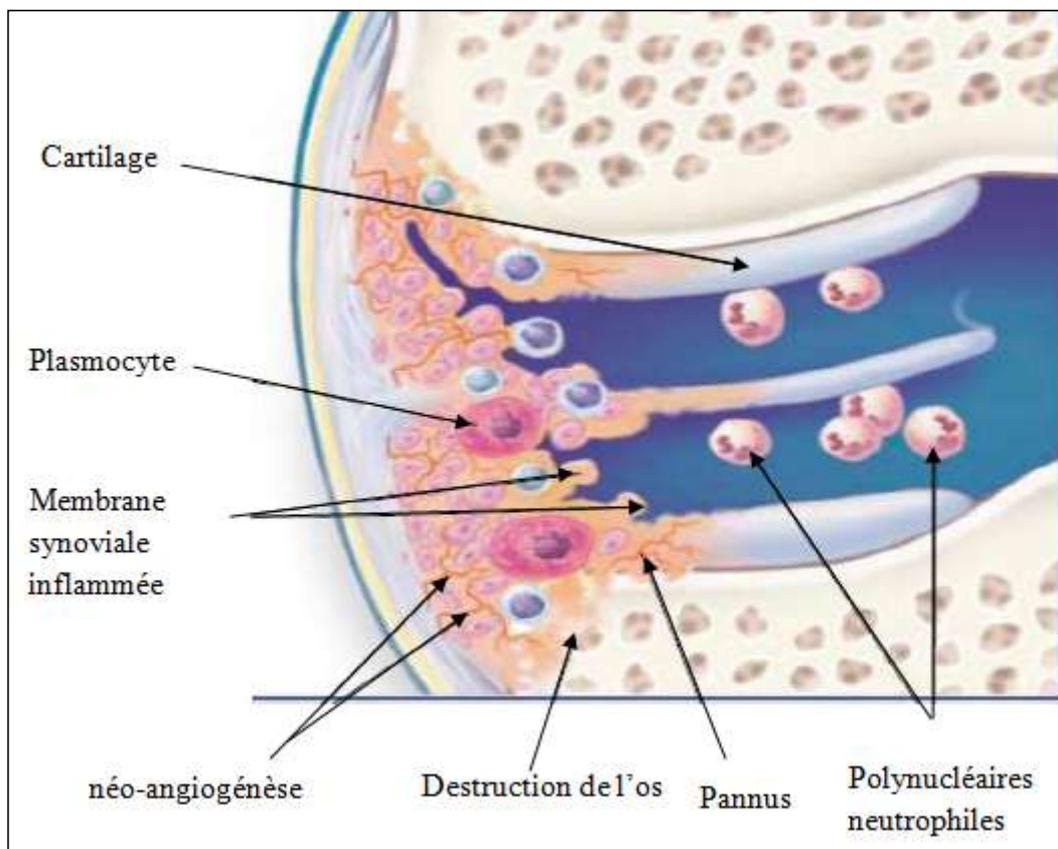


Figure 07 : Produits du métabolisme du CCl<sub>4</sub> (Environmental Health Criteria, 1999).

## 5. Arthrite rhumatoïde

L'arthrite rhumatoïde (AR) ou polyarthrite (PR) est une maladie auto-immune chronique, caractérisée par une inflammation articulaire bilatérale et symétrique (You *et al.*, 2013), évoluant vers une hyperplasie synoviale, une destruction irréversible de l'os et du cartilage et par conséquent à un gonflement et une déformation des articulations atteintes (figure 08). La maladie peut évoluer vers un handicap et éventuellement, des complications systémiques, y compris des troubles cardiovasculaires et pulmonaires (Calabresi *et al.*, 2018). La pathogenèse de la PR est attribuée à une interaction complexe entre des facteurs génétiques et environnementaux et l'activation répétée du système immunitaire inné et adaptatif conduisant à la rupture de la tolérance immunitaire, la présentation aberrante de l'auto-antigène et l'activation des cellules T et B spécifiques des antigènes. La production de cytokines inflammatoires lors de ces événements est à l'origine d'une inflammation systémique (Calabresi *et al.*, 2018).



**Figure 08** : L'inflammation de la membrane synoviale (Adaptée de Choy *et al.*, 2001).

### 5.1. Prévalence de l'AR

L'arthrite rhumatoïde (AR) est le rhumatisme inflammatoire chronique le plus fréquent. Sa prévalence est estimée jusqu'à ~ 1 % dans la population adulte, 0.51 % chez la femme et 0.09 % chez l'homme (Tobón *et al.*, 2010). Cette différence de *sexe ratio* s'atténue progressivement au-

delà de 70 ans. La maladie peut se déclarer à tout âge bien qu'il existe une augmentation de l'incidence entre 40 et 60 ans (Silman et Pearson, 2002).

### 5.2. Facteurs de risques

Bien que l'origine de la maladie demeure inconnue, les données récentes de la littérature incriminent les cellules de l'immunité innée dans le développement des lésions de l'AR. Comme la plupart des maladies auto-immunes, l'AR est une pathologie multifactorielle, avec un terrain génétique particulier, dont les facteurs génétiques constituent les facteurs de risques les plus importants. Les études portant sur les jumeaux confirment la présence des facteurs génétiques prédisposants à la survenue de l'AR. On retrouve en effet 15 à 30 % de l'AR chez les jumeaux monozygotes contre 5 % parmi les jumeaux dizygotes (Dumontet et Bigot-Corbel, 2012). Parmi ces facteurs génétiques, la présence des gènes HLA-DRB1 (Olsson *et al.*, 2012), plus particulièrement, la présence d'un épitope (épitope partagé) formant la quatrième poche de la présentation du peptide (Van der Helm *et al.*, 2006). Cet épitope partagé est formé par la séquence d'acides aminés QKRAA, QRRRA ou RRAAA. On retrouve cette séquence sur les molécules HLA-DRB1\*01, HLA-DRB1\*0401 ; \*0404 ; \*0405 ; \*0408. À ce jour, on connaît peu d'information sur le potentiel arthritogène de ces épitopes partagés (Dumontet et Bigot-Corbel, 2012).

Les facteurs environnementaux qui peuvent impliquer dans l'AR, le tabagisme qui favorise la citrullination des peptides (Svendsen *et al.*, 2017) et la flore microbienne, par exemple le cas de *Porphyromonas gingivalis* qui exprime une enzyme ; la peptidyl arginine déiminase (PAD) responsable de la citrullination du fibrinogène et d'autres protéines (Wegner *et al.*, 2010) et des facteurs intrinsèques (hormonaux par exemple) (Imboden, 2009).

L'AR est une maladie auto-immune. En effet il existe des anomalies du système immunitaire qui se manifestent par la production d'auto-anticorps : les auto-anticorps anti-peptides citrullinés (anti-CCP) jouent un rôle majeur dans la maladie. Klareskog et ses collaborateurs (2006) ont montré que l'association entre la présence d'un épitope partagé et le tabagisme augmente le risque de développer des anticorps anti-CCP d'un facteur de 6.5 en présence d'une seule copie et 21 en présence deux copies. Lorsque ces facteurs sont réunis, il s'en suit une réponse immunitaire innée et acquise dirigée tout particulièrement contre la membrane synoviale (Svendsen *et al.*, 2017).

### 5.3. Immunopathologie de l'AR

La physiopathologie de l'AR reste complexe et fait intervenir de nombreux acteurs cellulaires, mais aussi inter et intracellulaires.

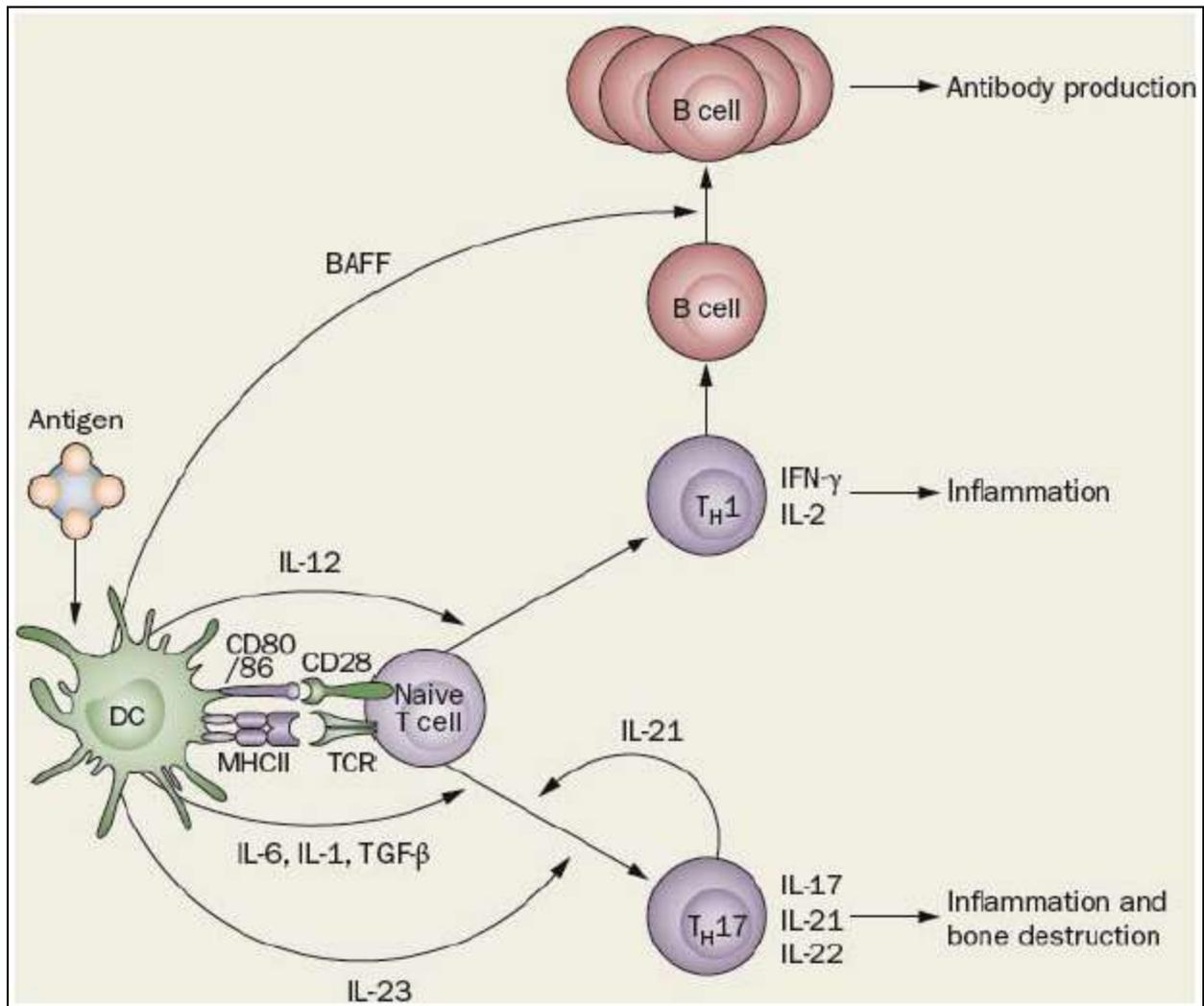
#### 5.3.1. Acteurs cellulaires

Le mécanisme physiopathologique de l'AR est basé sur le complexe tricellulaire : Cellules présentatrices d'antigène (CPA)/ lymphocytes T/ synoviocytes (Ghozlan *et al.*, 2012).

##### 5.3.1.1. Cellules présentatrices d'antigène

Les macrophages, les lymphocytes B et les cellules dendritiques sont capables de présenter un antigène aux lymphocytes T. Ces cellules expriment en effet à la surface de leur membrane des molécules HLA de classe II qui sont indispensables au déclenchement d'une réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T. Les cellules dendritiques sont les cellules présentatrices professionnelles du système immunitaire et sont les cellules qui présentent initialement l'antigène aux lymphocytes T dans l'AR. Les Cellules dendritiques jouent un rôle majeur dans la physiopathologie de l'AR. Elles interviennent aussi dans la transformation phénotypique des Lymphocytes T naïfs en type Th1 ou Th2, selon les cytokines présentes dans le milieu. Les interactions entre CD et cellules T se font par contact cellulaire soit à travers des interactions de type récepteur/ligand soit par l'intermédiaire de cytokines et de chimiokines. Les DCs produisent de l'IL-12 et de l'IL-23 qui orientent la réponse immunitaire vers les types Th1 et Th17 (figure 09) (Khan *et al.*, 2009).

Dans la synoviale rhumatoïde, les Cellules dendritiques sont trouvées principalement dans les agrégats lymphocytaires et en périphérie des vaisseaux, suggérant que les Cellules dendritiques proviennent du sang périphérique. Les Cellules dendritiques présentes dans la synoviale rhumatoïde expriment des marqueurs de différenciation qui témoignent d'un contact préalable avec les lymphocytes T (Lebba *et al.*, 2011) (figure 09).



**Figure 09** : Rôle des Cellules dendritiques dans la réponse inflammatoire au cours de la PR (Khan *et al.*, 2009).

### 5.3.1.2. Lymphocytes T

Les lymphocytes T autoréactifs sont capables de réagir avec des peptides du soi présentés dans un contexte HLA donné. Chez les patients atteints de l'AR, la proportion de ces lymphocytes T autoréactifs serait plus élevée que chez les sujets normaux, leur production serait due à une anomalie de la sélection thymique (Schmidt *et al.*, 1996).

Au départ de l'inflammation, il y a l'activation des LT naïfs par la reconnaissance d'un antigène. On ne connaît pas l'antigène déclenchant, après cette reconnaissance, ils vont se différencier en lymphocytes T producteurs des cytokines pro-inflammatoires : Interféron  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), Tumor necrosing Factor alpha (TNF- $\alpha$ ) et IL-2. Cette réponse est dite de type Th1 par opposition à une réponse de type Th2 qui se traduit plutôt par une production d'IL-4 et d'IL-10 (Lutzky *et al.*, 2007).

Ces lymphocytes T sont recrutés à partir du sang périphérique et s'organisent en agrégats qui ressemblent par leur morphologie à l'architecture folliculaire des ganglions lymphoïdes, avec également la présence de veinules postcapillaires (high endothelial venules) (Quirke *et al.*, 2011). Ce recrutement des LT est favorisé par une angiogénèse exacerbée notamment par l'intermédiaire du VEGF (vascular endothelial growth factor) (Szekanecz *et al.*, 2009).

Dans la synoviale rhumatoïde, les lymphocytes Th1 sont particulièrement abondants. En 2007, un autre type de LT, sécrétant de l'IL-17 est identifié et nommé Th17. Les Th 17 ont un rôle pro-inflammatoire dans l'AR (Bettelli *et al.*, 2007). Ils sécrètent aussi de l'IL-6, de l'IL-21, de l'IL-22 et du TNF- $\alpha$ . Les Th 17 sont stimulés par l'IL-6 et l'IL-23 (Miossec *et al.*, 2009). Ces lymphocytes T peuvent être à nouveau activés par les CPA par engagement des molécules du TCR, des molécules HLA-DR, mais aussi de molécules de costimulation comme CD28 et B7. L'activation des lymphocytes T est contrôlée par des lymphocytes T régulateurs CD4<sup>+</sup> et CD25<sup>+</sup> capables d'inhiber l'expansion clonale des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. La molécule CTLA-4 (CD152) exprimée sur les lymphocytes T régulateurs 1 interagit avec la protéine CD28 exprimée sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et induit un message inhibiteur. Chez les patients atteints de l'AR, il existe un déficit quantitatif et fonctionnel de ces LT que ce soit dans le sang ou l'articulation (Ghozlani *et al.*, 2012) (figure 10).

Lors de l'angiogénèse, les lymphocytes T activés interagissent avec les cellules endothéliales qui composent l'endothélium des veinules post-capillaires. Ces cellules endothéliales sont activées par des cytokines produites et secrétées par les monocytes ou les lymphocytes T activés. Les cellules endothéliales et les lymphocytes T ainsi activés expriment alors des molécules d'adhésion, d'abord des sélectines (E-sélectine, L-sélectine) puis des intégrines ( $\alpha$ E $\beta$ 7,  $\alpha$ 4 $\beta$ 7,  $\alpha$ 4 $\beta$ 1) qui interagissent entre elles. Cette interaction favorise la diapédèse des lymphocytes T circulants vers la membrane synoviale. Les lymphocytes T migrent ensuite dans la synoviale en exprimant à leur surface membranaire des récepteurs aux chimiokines comme CCR5 qui reconnaissent des chimiokines telles que RANTES (regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted), produites dans la synoviale. Ces lymphocytes T, nouvellement arrivés dans la synoviale, produisent des cytokines proinflammatoires de type Th1 (Dolhain *et al.*, 1996) qui vont activer les cellules synoviales résidentes (LB, macrophages résidents, cellules endothéliales et fibroblastes). L'activation de ces cellules résidentes va permettre la sécrétion des cytokines, chemokines et métallo-protéases et l'expression des molécules d'adhésion qui favorisent encore le recrutement de monocytes et de polynucléaires neutrophiles circulants afin d'amplifier la réponse (Ghozlani *et al.*, 2012).

De plus, les synoviocytes en contact direct avec des lymphocytes T produisent de nombreux médiateurs de l'inflammation mais aussi ceux de la destruction ostéocartilagineuse tels que la prostaglandine E2, la métalloprotéinase MMP-1 et l'IL-6 (Snir *et al.*, 2011 ; Beavis *et al.*, 2011).

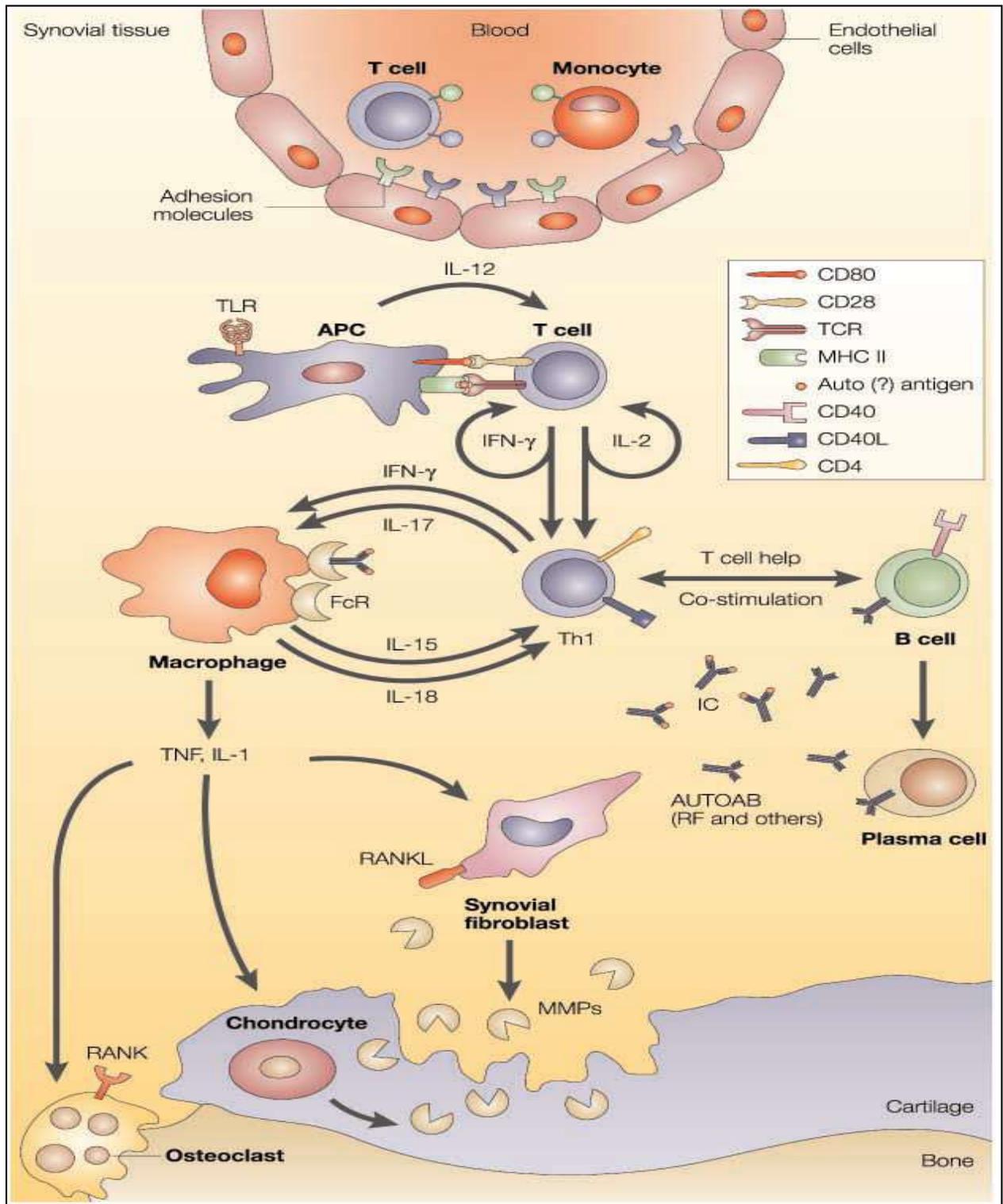
Par ailleurs, L'activation antigénique peut se faire différemment en impliquant les Toll Like Receptor (TLR) et le récepteur du lymphocyte B (BCR) (Shotorbani *et al.*, 2011).

### 5.3.1.3. Lymphocytes B

La théorie qui dit que le mécanisme physiopathologique de l'AR est basé sur le complexe tricellulaire (Cellules présentatrices d'antigène / lymphocytes T/ synoviocytes) minimise le rôle tenu par les lymphocytes B. L'importance des LB est montrée en utilisant du rituximab, un anticorps dirigé contre le marqueur CD20 de la lignée B. Cet anticorps est responsable de la déplétion des lymphocytes B chez les patients atteints de l'AR. La contribution des LB dans la pathogénie de l'AR se manifeste à plusieurs niveaux. D'abord, les lymphocytes B peuvent se comporter comme de véritables CPA car ils sont capables de présenter des antigènes aux lymphocytes TCD4+. Ils sont capables de reconnaître des autoantigènes par le biais de leurs récepteurs (BCR), La prolifération clonale de ces lymphocytes B autoréactifs pourrait être favorisée par la cytokine BAFF (B-cell activating factor) qui fait partie de la grande famille des TNF. En fin, les LB produisent également certains autoanticorps détectés dans l'AR tels que les facteurs rhumatoïdes (FR) qui sont des auto-anticorps souvent de type IgM (mais pouvant être aussi de type IgA ou IgG) produits par les plasmocytes et dirigés contre les IgG. D'autres anticorps sont également détectés dans l'AR, soit les anticorps anti-peptides citrullinés, des auto-anticorps dirigés contre des antigènes du cartilage comme le collagène de type II et les anticarbamyl peptides récemment découverts (Di *et al.*, 2011 ; Ghozlan *et al.*, 2012 ; Dekkers *et al.*, 2017) (figure 10).

### 5.3.1.4. Synoviocytes

Les synoviocytes constituent le principal composant cellulaire de la couche entourant la membrane synoviale. On distingue deux types : Les synoviocytes A et les synoviocytes B. Les synoviocytes A stimulés par l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  produisent des cytokines pro-inflammatoires (Kinne *et al.*, 2000), des facteurs de croissance, des prostaglandines, des leucotriènes, des radicaux libres et des protéases qui participent à la destruction tissulaire. Les synoviocytes B ont un pouvoir prolifératif ressemble à celui des cellules cancéreuses ce qui leur permet de la formation du pannus synovial (You *et al.*, 2006).



**Figure 10 :** Rôle des LT dans la pathogénie de la PR (Adaptée de Smolen et Steiner, 2003).

### 5.3.2. Acteurs intercellulaires

Les cellules communiquent entre elles par contact de cellule à cellule ou en utilisant des messagers intercellulaires appelés cytokines. Dans l'AR, il existe un déséquilibre entre les cytokines pro et anti-inflammatoires. Les cytokines pro-inflammatoires produites par les

monocytes/macrophages (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6) sont amplifiées dans les articulations rhumatoïdes (Ghozlani *et al.*, 2012).

Le TNF- $\alpha$  est principalement produit par les macrophages (Park *et al.*, 2007). Il joue un rôle capital dans l'inflammation articulaire (Keffer *et al.*, 1991). Il existe sous 2 formes : le TNF soluble et membranaire. Le TNF- $\alpha$  provoque la production d'IL-1 et d'IL-6, augmentant ainsi l'expression des molécules d'adhésion endothéliales et la production des métallo-protéases qui entraînent la destruction du cartilage articulaire (Clark, 2005).

L'IL-1 est produite dans l'articulation principalement par les macrophages. Elle a un effet pro-inflammatoire dans l'AR, en activant les LT, les LB et les macrophages, en stimulant la production de molécules d'adhésion, du TNF- $\alpha$  et des prostaglandines. Elle provoque également la production des métallo-protéases qui ont une activité destructrice dans l'articulation de manière plus importante que le TNF- $\alpha$  (Dayer, 2003).

L'IL-6 est sécrétée uniquement en situation pathologique. Elle est produite par plusieurs types de cellules (LT, LB, fibroblastes, cellules endothéliales et monocytes) en réponse aux différents stimuli (IL-1, TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$ ). Elle induit la production d'auto-anticorps par les plasmocytes mais n'a pas de rôle sur leur prolifération. Elle a un rôle dans la destruction osseuse en activant les ostéoclastes (Park *et al.*, 2007).

L'IL-17 est significativement produit par les Th17 dans l'AR (Lee et Bae, 2017). Elle stimule la production de métallo-protéases par les ostéoblastes et les chondrocytes. Elle augmente également l'expression du RANK-ligand (receptor activator of nuclear factor-kB) par les ostéoblastes. Le RANK-ligand active les ostéoclastes, ce qui entraîne la destruction osseuse (Miossec *et al.*, 2009).

L'IL-23 produite par les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules présentatrices d'antigènes. Elle contrôle la production d'IL-17 par les Th 17 (Aggarwal *et al.*, 2003).

### 5.3.3. Acteurs intracellulaires

La fixation d'une cytokine sur un récepteur membranaire provoque une modification de conformation du récepteur qui aboutit à la phosphorylation du récepteur lui-même ou d'une enzyme associée à ce récepteur. Cette première phosphorylation entraîne l'activation en cascade d'autres enzymes appelées les protéines kinases qui activent à leur tour les facteurs de transcription. Ces facteurs de transcription régulent la synthèse de protéines en agissant directement sur le promoteur des gènes. L'activation des facteurs de transcription est induite par des protéines kinases qui ont une activité phosphorylante. Cette phosphorylation du facteur de

transcription permet sa translocation du cytoplasme vers le noyau ou encore augmente son affinité pour l'ADN par changement conformationnel. Ces voies de phosphorylation contribuent en fin à la synthèse des cytokines pro-inflammatoires et des métallo-protéinases responsables de la destruction cartilagineuse (Saber *et al.*, 2011 ; Ghozlani *et al.*, 2012).

### 5.4. Destruction articulaire

Ces dernières années, des progrès considérables sont réalisés dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la destruction ostéoarticulaire. La destruction ostéoarticulaire est la conséquence de la prolifération pseudotumorale de la synoviale et de l'action des cytokines. Les cytokines proinflammatoires participent à cette destruction articulaire en induisant non seulement la synthèse de facteurs de croissance nécessaires à la prolifération de la synoviale, mais aussi la production des metalloproteinases par les synoviocytes, de cathepsines et de collagénases responsables de la dégradation des principaux composants du cartilage (Ghozlani *et al.*, 2012).

Depuis 1998, de nombreuses études ont identifié les ostéoclastes comme des cellules effectrices de la perte osseuse périarticulaire. Ces ostéoclastes proviennent de précurseurs monocytaires ou de cellules dendritiques recrutées localement et qui peuvent se trans-différencier en ostéoclastes (Rivollier *et al.*, 2004). Dans les deux cas, le RANK-L (receptor activator of NFκB ligand) est la cytokine indispensable à l'acquisition du phénotype ostéoclastique. Elle est sécrétée par les lymphocytes activés et les synoviocytes du pannus synovial dans l'environnement articulaire (Cohen-Solal et de Vernejoul, 2005).

En outre, l'IL-1, TNF-α, l'IL-6 ainsi que l'IL17 produits par le pannus enflammé peuvent d'une part jouer un rôle propre sur l'ostéoclastogenèse et d'autre part, augmenter la sécrétion de RANK-L (Pour revue voir Cohen-Solal et de Vernejoul, 2005). La liaison de RANKL à son récepteur membranaire RANK, présent sur les préostéoclastes, favorise la différenciation et l'activation des ostéoclastes. RANKL est trouvé à des concentrations élevées dans le sérum et le liquide synovial des patients atteints de l'AR (Yeo *et al.*, 2011 ; Ghozlani *et al.*, 2012).

### 5.5. Immuno-pathologie des manifestations extra-articulaires

Différents mécanismes sont impliqués dans l'atteinte systémique au cours de l'AR. Les complexes immuns contenant souvent du facteur rhumatoïde chez des sujets prédisposés génétiquement contribuent à cette atteinte. De même, plusieurs travaux ont démontré le rôle de certaines cellules inflammatoires (macrophages, lymphocyte CD8) et leurs produits sécrétés dans

la genèse de toutes manifestations cardiaques, pulmonaire, oculaire, rénales et cutané observées au cours de l'AR (Prete *et al.*, 2011 ; Ghazlani *et al.*, 2012 ).

### **5.6. Rôle des ERO dans la physiopathologie de l'AR**

Les ERO sont caractérisés par leur courte demi-vie qui est de l'ordre de la milliseconde et par leur haute réactivité. Ce sont les raisons pour lesquelles la démonstration directe de leur implication dans la physiopathologie de l'AR est difficile. De nombreux arguments suggèrent leur rôle central dans l'initiation et l'évolution de cette pathologie (Marklund, 1982).

Plusieurs recherches ont rapporté qu'il existe un déséquilibre de la balance entre les antioxydants et les oxydants dans le cas de l'AR, en faveur de ces derniers. En 2000, Sung et ses collaborateurs ont démontré que l'IL-6 exprimé dans le pannus rhumatoïde induit une augmentation de la production des ERO par les synoviocytes fibroblastiques. Puis en 2006, Dang et ses collaborateurs ont suggéré que le TNF- $\alpha$  amplifié également dans le pannus rhumatoïde est un puissant agent pré-activant de la NADPH oxydase (NOX2) des phagocytes. Dans la même année, Chenevier- Gobeaux et ses collaborateurs (2006) ont révélé que le TNF- $\alpha$  et l'IL-1b augmentent l'activité NADPH oxydase des synoviocytes rhumatoïdes de manière concomitante à la stimulation des systèmes producteurs des ERO.

Dans une autre étude, Pacher et ses collaborateurs (2006) ont montré l'augmentation de l'activité xanthine oxydase, une enzyme génératrice des ERO, dans les maladies auto-immunes telles que l'arthrite rhumatoïde. De même, Miesel et Zuber (1993) ont démontré précédemment qu'une élévation de 50 fois de l'activité xanthine oxydase a été constatée dans les sérums des patients atteints de l'AR en comparaison avec des donneurs sains.

En effet, la présence des ERO dans le pannus rhumatoïde a pu être révélée par une augmentation des lésions qu'elles engendrent sur la matrice extra-cellulaire, les lipides et les protéines. L'examen du liquide articulaire et du tissu synovial de l'AR montre une dépolymérisation de l'acide hyaluronique (Grootveld *et al.*, 1991). L'augmentation des résidus carbonyles traduit l'attaque radicalaire des protéines de liquide synovial de l'AR (Dalle-Donne *et al.*, 2003). De même, des taux élevés de protéines oxydées sont observés dans le liquide synovial et le plasma des patients souffrants de l'arthrite rhumatoïde (Lemarechal *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'augmentation de la 8-oxo-7-déoxyguanosine dans les noyaux des lymphocytes et des PNNs circulants de l'AR est un signe de l'oxydation de l'ADN par les ERO. Il existe également des traces d'une peroxydation lipidique dans cette pathologie (Dai *et al.*, 2000). L'oxydation des LDL entraîne une accumulation de ces lipides proinflammatoires sous l'intima vasculaire où ils sont ensuite phagocytés par les macrophages. Par ce mécanisme, les ERO participent à

l'accélération de l'athérosclérose qui constitue la première cause de la mortalité dans l'AR (Avina-Zubieta *et al.*, 2008).

Des études épidémiologiques indiquent que la consommation de molécules antioxydantes réduit le risque de développer l'AR. La consommation de la vitamine C ou la vitamine E diminue de 30% l'incidence d'une AR (Cerhan *et al.*, 2003). Ces résultats sont confortés par une étude finlandaise qui a montré que la probabilité de survenue d'une AR était inversement proportionnelle à la concentration plasmatique des antioxydants dosés ( $\alpha$ -tocophérol,  $\beta$ -carotène et sélénium). De plus, l'activité de la glutathion réductase est augmentée chez les patients atteints de l'AR (Mulherin *et al.*, 1996).

### 5.7. Modèles murins d'arthrite

Les modèles animaux d'arthrite, essentiellement les modèles murins, sont utilisés soit pour déterminer les mécanismes physiologiques impliqués dans la pathogénie de l'AR, soit pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et valider des traitements potentiels (Bendele, 2001). Parmi les modèles murins les plus utilisés, on retrouve des modèles d'arthrite induite par transfert passif d'anticorps comme les anticorps anti-Collagène de type II (anti-CII) ou du sérum arthritogène, le modèle d'arthrite induite par des antigènes (AIA) (BSA, protéoglycane et adjuvant complet de Freund) et le modèle d'arthrite induite par le collagène (CIA) (Bendele, 2001).

le CII est l'un des auto-antigènes majeurs impliqués dans l'initiation de l'inflammation articulaire (Kim *et al.*, 2004). Il est exclusivement exprimé au niveau du cartilage articulaire. L'immunité développée conduit à la production des anticorps anti-CII et par conséquent à la dégradation du cartilage. Ce concept est largement approuvé dans plusieurs études réalisées sur différentes espèces (rat, souris et singe) (Holmdahl *et al.*, 1989 ; Durie *et al.*, 1994).

Il est actuellement établi que l'arthrite induite par le collagène est un modèle valide et vigoureux pour l'étude des mécanismes impliqués dans la pathogénie de l'AR. En effet, ce modèle a permis de démontrer que l'auto-immunité au CII permet de développer une arthrite auto-immune caractérisée par une inflammation de la membrane synoviale, une destruction du cartilage articulaire et une érosion osseuse, analogues à l'AR humaine (Cho *et al.*, 2007).

## ***Matériel et Méthodes***

## 1. Matériel

### 1.1. Animaux

Des rats *Albinos wistar* mâles (200-250g) ont été recueillis à partir de l'institut pasteur – Alger. Après une période d'adaptation, les animaux sont répartis selon l'homogénéité du poids et âges en plusieurs lots expérimentaux de sept rats chacun. Les traitements sont administrés par voie orale à l'aide d'une sonde spécifique. Pendant la période de l'adaptation et celle de l'expérience, les animaux ont un accès libre à la nourriture standard produite par l'ONAB de Béjaïa et à l'eau et sont maintenus dans une animalerie à température constante ( $22 \pm 2$  °C), soumis à un cycle naturel de lumière/obscurité. Ils sont traités conformément aux principes et directives énoncés dans le manuel sur les soins et l'utilisation des animaux d'expérimentation.

### 1.2. Réactifs

Les réactifs chimiques utilisés dans la présente étude sont tous de grade analytique et sont achetés chez Sigma Aldrich. Nous citons le 2-Isopropyl-5-méthyle-1,4-benzoquinone (thymoquinone), le 2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl (DPPH), le 2, 6 di-tert-butyle-4-méthyle phénol (BHT), le sulfate ferreux ( $\text{FeSO}_4$ ), le sodium salicylate, le diméthyle sulfoxyde (DMSO), le tween 40, le tween 80, l'acide linoléique, le dichlorure ferreux ( $\text{FeCl}_2$ ), le ferricyanide de potassium ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ), le thiocyanate de potassium (KCN), le trichlorure de fer ( $\text{FeCl}_3$ ), le tétrachlorure de carbone ( $\text{CCl}_4$ ), l'adjuvant complet de Freund (ACF), l'adjuvant incomplet de Freund (AIF), l'acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA), le trisma base, l'acide 5, 5-dithiobis 2- nitrobenzoïque (DTNB), le pyrogallol, le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), le 4-nitro-bleu tétrazoluim (NBT), l'acide trichloroacétique (TCA), l'acide thiobarbiturique (TBA), la xanthine oxydase et la xanthine.

## 2. Méthodes

### 2.1. Etude de l'activité antioxydante *in vitro* de la thymoquinone

#### 2.1.1. Evaluation de l'effet scavenger

##### 1. Evaluation de l'effet sur le radical hydroxyle

La capacité de la TQ de piéger le radical hydroxyle ( $\text{OH}^\bullet$ ) est estimée selon la méthode décrite par Smirnoff et Cumbes (1989). Le principe de cette technique est basé sur la production du radical hydroxyle dans le milieu réactionnel à travers la réaction de Fenton. Le radical  $\text{OH}^\bullet$  ainsi produit réagit avec le sodium salicylate pour produire le salicylate hydroxylé. La réaction est initiée par l'addition de 01 ml de 1.5 mM  $\text{FeSO}_4$  à 0.7 ml de 6 mM peroxyde d'hydrogène, puis

0.3 ml de 20 mM sodium salicylate sont ajoutés. Finalement 01 ml des différentes concentrations de la TQ ou du standard est ajouté pour avoir un volume final de 03 ml. Après une incubation de 1h à 37°C, l'absorbance du complexe salicylate hydroxylé est mesurée à 562 nm. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [1 - (\text{Abs}_1 - \text{Abs}_2) / \text{Abs}_0] * 100$$

**Abs<sub>0</sub>** : l'absorbance du témoin (sans échantillon)

**Abs<sub>1</sub>** : l'absorbance en présence de la TQ ou du standard

**Abs<sub>2</sub>** : l'absorbance sans sodium salicylate.

### 2. Evaluation de l'effet sur l'anion superoxyde

Le principe de ce test est basé sur la production de l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) qui va réduire le NBT<sup>+2</sup> ayant une coloration jaune en diformazan ayant une coloration bleu foncé, ce dernier absorbe la lumière à 560 nm. En présence des antioxydants doués d'un effet piègeur vis-à-vis de l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ , la formation de diformazan est inhibée, ce qui se traduit par la diminution de l'absorbance. L'effet scavenger de la TQ vis-à-vis de l' $\text{O}_2^{\cdot-}$  est déterminé selon la méthode décrite par Elizabeth et Rao (1990). Brièvement, 0.1 ml du 4-Nitro-Bleu Tétrazolium (NBT) dissoutes dans le DMSO à une concentration de 1 mg/ml et 0.3 ml des différentes concentrations de la TQ ou du standard sont ajoutés à 1 ml du DMSO alcalin qui est préparé en ajoutant 1ml DMSO à 5mM NaOH. Les absorbances sont mesurées à 560 nm et le DMSO pure est utilisé comme blanc. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(\text{Abs}_c - \text{Abs}_e) / \text{A}_c] * 100$$

**Abs<sub>c</sub>** : absorbance du contrôle.

**Abs<sub>e</sub>** : absorbance d'une concentration donnée de substance à tester

### 3. Evaluation de l'effet sur le peroxyde d'hydrogène

Le principe de cette méthode est de neutraliser le  $\text{H}_2\text{O}_2$  par un antioxydant qui va faciliter sa décomposition en eau et oxygène selon la réaction suivante :  $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ . Le piégeage du  $\text{H}_2\text{O}_2$  est déterminé selon la méthode décrite par Ruch et ses collaborateurs (1989) avec quelques modifications. Une solution du  $\text{H}_2\text{O}_2$  (120 mM) est préparée dans un tampon phosphate (50 mM, pH 7.4), 150µl de cette solution sont ajoutés aux 850 µl des différentes concentrations de la TQ ou du standard. Après 10 min d'incubation, l'absorbance est mesurée à 230 nm et le pourcentage du piégeage du  $\text{H}_2\text{O}_2$  (ou % d'inhibition) est calculé en utilisant la formule suivante:

$$\% \text{ d'inhibition} = [(\text{Abs}_c - \text{Abs}_e) / \text{Abs}_c] * 100$$

**Abs<sub>c</sub>** : l'absorbance du contrôle (la solution du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

**Abs<sub>e</sub>** : l'absorbance du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence de la TQ ou du standard.

### 2.1.2. Evaluation de l'effet sur la peroxydation lipidique

#### 2.1.2.1. Blanchissement du β-carotène / acide linoléique

Cette méthode est basée sur l'oxydation de l'acide linoléique par les espèces réactives de l'oxygène produites par l'eau saturée en oxygène. Le produit généré induit l'oxydation du β-carotène qui conduit à sa décoloration (Alam *et al.*, 2012).

La capacité de la TQ d'inhiber la peroxydation lipidique et de prévenir le blanchissement du β-carotène est déterminée selon la méthode de Kabouche et ses collaborateurs (2007). Brièvement, une solution du β-carotène / acide linoléique est préparée par l'addition de 25 µl d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40 à 0.5 mg de β-carotène dissoute dans 01 ml de chloroforme. Le chloroforme est évaporé à 40 °C à l'aide d'un rotavapeur. 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés au mélange suivi par une agitation vigoureuse. L'émulsion préparée est aliquotée (4ml) dans des tubes à essai et 200 µl de la TQ ou du standard (BHA) préparés à une concentration finale de 2 mg/ml dans le méthanol y sont ajoutés. L'absorbance est lue à 470 nm, à des intervalles de temps réguliers de 15 min pendant 120 min d'incubation à 50°C à l'obscurité. Le pourcentage de l'activité antioxydante (% AA) est calculé comme suit :

$$\% \text{ AA} = [1 - (A_{t0} - A_{t120}) / (A_{c0} - A_{c120})] * 100$$

A<sub>t0</sub> : l'absorbance initiale, A<sub>t120</sub> : l'absorbance finale de l'échantillon à 120 min, A<sub>c0</sub> : l'absorbance initiale du contrôle négatif, A<sub>c120</sub> : l'absorbance du contrôle négatif à 120 min.

#### 2.1.3. Pouvoir réducteur

Cette méthode consiste à évaluer la capacité de l'échantillon de donner un électron pour convertir le fer de la forme Fe<sup>3+</sup> à la forme Fe<sup>2+</sup>. Cette réaction se manifeste par un changement de la couleur du milieu réactionnel du jaune au vert bleuâtre du ferricyanide de potassium qui peut être quantifié à 700 nm (Barros *et al.*, 2007 ; Gholivand *et al.*, 2010). Une absorbance élevée indique que le composé possède un grand pouvoir réducteur.

Ce test est effectué selon la méthode de Prasad et ses collaborateurs (2009). Brièvement, 1,25 ml d'une solution du tampon phosphate (0.2M, pH=6.6) et 1,25 ml de 1% de K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> sont ajoutés à 50 µl des différentes concentrations des échantillons. Après 20 min d'incubation à 50 °C, 1,25 ml d'une solution aqueuse de TCA à 10 % sont ajoutés au milieu réactionnel. Puis, une centrifugation à 3000 tpm pendant 10 min est réalisée. 1,25 ml d'eau distillée et 250µl de 0,1% FeCl<sub>3</sub> sont ajoutés à 1,25 ml du surnagent. L'absorbance est mesurée à 700 nm contre un blanc contenant tous les réactifs à l'exception de l'échantillon à tester. Les résultats sont exprimés en

concentration effective à 50 % (EC<sub>50</sub>) qui traduit la concentration d'antioxydant nécessaire pour l'obtention d'une absorbance de 0.5.

### 2.1.4. Chélation du fer ferreux

La capacité chélatrice de la thymoquinone est mesurée en utilisant la méthode de Le et ses collaborateurs (2007). Brièvement, 500µl des différentes concentrations de la thymoquinone sont initialement mélangés à 100 µl de FeCl<sub>2</sub> (0.6 mM dans l'eau distillée) et 900 µl de méthanol. Après 5 min d'incubation, 100 µl de la ferrozine (5 mM dans le méthanol) sont additionnés au milieu réactionnel. Le mélange est bien agité puis laissé réagir pendant 10 min à température ambiante permettant ainsi la complexation du fer résiduel et la formation d'un chromophore rouge (Fe(II)-Ferrozine) ayant une absorption maximale à 562 nm. Le contrôle négatif contient tous les réactifs à l'exception de l'échantillon à tester qui est remplacé par un volume égal du méthanol. L'EDTA est utilisé en tant que le chélateur de référence. Les lectures sont effectuées à 562 nm contre un blanc de méthanol. L'effet séquestrant de la thymoquinone vis-à-vis du fer est exprimé en pourcentage de chélation selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Chélation} = [(\text{Abs}_{\text{contrôle}} - \text{Abs}_{\text{test}}) / \text{Abs}_{\text{contrôle}}] * 100$$

## 2.2. Evaluation de l'effet anti-inflammatoire *in vitro*

L'effet anti-arthritique *in vitro* de la thymoquinone est déterminé en utilisant le test de l'inhibition de la dénaturation du BSA selon le protocole de Williams et ses collaborateurs (2008). Brièvement, 500 µl du 0.2 % du BSA préparé préalablement dans un tampon tris-HCl (20 mM, pH 6.8) sont ajoutés à 500 µl des différentes concentrations de la thymoquinone ou de l'acide diclofénac (250 µg/ml). Ce mélange est incubé à 37 °C pendant 20 min puis à 65 °C pendant 10 min. Après refroidissement, les absorbances sont mesurées à 660 nm et le pourcentage d'inhibition est calculé en utilisant l'équation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(\text{Abs}_{\text{contrôle}} - \text{Abs}_{\text{test}}) / \text{Abs}_{\text{contrôle}}] * 100$$

## 2.3. Evaluation de l'effet hépatoprotecteur et hépatocuratif de la thymoquinone

### 2.3.1. Induction de l'hépatotoxicité par CCl<sub>4</sub>

L'hépatotoxicité induite par l'injection intra-péritonéale du CCl<sub>4</sub> est le modèle le plus utilisé pour étudier la toxicité du foie chez le rat. L'induction de l'hépatotoxicité est effectuée selon le protocole de Wang et ses collaborateurs (2004). Les rats mâles sont répartis en sept groupes de sept rats comme suit :

**Groupe 01 (normaux)** : les rats de ce groupe sont traités par le gavage du NaCl 0.9 % en utilisant une sonde spécifique quotidiennement pendant 7 jours.

**Groupe 02 (Contrôle)** : les rats de ce groupe sont traités quotidiennement pendant 7 jours par le gavage du NaCl qui contient 0.1 % de tween 80. Le septième jour, 1.5 ml/kg d'huile d'olive sont injectés aux animaux.

**Groupe 03 (CCl<sub>4</sub>)** : les rats de ce groupe sont traités par le gavage du NaCl 0.9 % pendant 7 jours. Le septième jour, il leur est injecté 03 ml/kg de CCl<sub>4</sub> préalablement dilué dans de l'huile d'olive à 50 % (V/V).

### Les traitements prophylactiques

**Groupe 04 (Pro 2.5) et groupe 05 (Pro 5)** : Les rats de ces groupes sont traités par le gavage de 2.5 et 05 mg/kg de thymoquinone, respectivement, pendant 7 jours. Le 7<sup>ème</sup> jour, il leur est injecté 03 ml/kg de CCl<sub>4</sub>, 30 min après l'administration de la dernière dose de thymoquinone.

### Les traitements curatifs

**Groupe 06 (Cur 2.5) et groupe 07 (Cur 5)** : 03 ml/kg de CCl<sub>4</sub> sont injectés aux rats de ce groupe le 1<sup>er</sup> jour, 30 min avant l'administration de la première dose de thymoquinone administrée par gavage à une dose de 2.5 et 05 mg/kg/jour, respectivement, pendant 7 jours.

Le huitième jour, tous les rats des différents groupes sont sacrifiés sous anesthésie avec de l'éther di-éthylique. Le foie est immédiatement récupéré, nettoyé avec du NaCl 0.9 % stérile et froid.

### 2.3.2. Prélèvement sanguin

Des prélèvements sanguins sont réalisés sous anesthésie avec de l'éther di-éthylique, à partir du sinus rétro-orbital de l'œil. Le sang récupéré dans des tubes héparinés est immédiatement centrifugé à 4000 t/min pendant 10 minutes. Les sérums sont récupérés et conservés à -4 °C jusqu'à leur utilisation pour des dosages biochimiques.

### 2.3.3. Dosage des paramètres sanguin

Les dosages biochimiques concernant **les marqueurs hépatiques** : Aspartate Amino Transférase, Alanine Amino Transférase et Phosphatase Alcaline (ASAT, ALAT et ALP, respectivement), **rénaux** : urée et créatinine et **lipidiques** : triglycéride et cholestérol sont réalisés dans le laboratoire du centre d'attaque du cancer CAC-Sétif, Algérie en utilisant des kits de diagnostic Sprinreact (Espagne) avec un analyseur automatique (Bechman). Le pourcentage de l'activité hépato-protectrice de la TQ est calculé selon la formule de Singh et ses collaborateurs (1998).

$$\% \text{ Hépatoprotection} = (1 - [\text{TC} - \text{N}] / [\text{C} - \text{N}]) * 100$$

TC, C, et N sont les résultats de mesure des paramètres biochimiques chez les rats traités avec la TQ et CCl<sub>4</sub>, CCl<sub>4</sub> et les rats normaux, respectivement.

### 2.3.4. Prélèvement des organes et étude histopathologique

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

1. Déshydratation des prélèvements afin d'éliminer toute trace d'alcool,
2. Enrobage à la paraffine pour obtenir un bloc qui sera facilement coupé,
3. Confection des coupes au microtome avec une épaisseur est de 3-4µm. Les coupes obtenues sont placées sur des lames de verre préalablement recouvertes de gélatine,
4. Déparaffinage : les coupes montées sur lames et séchées sont déparaffinées dans du xylène, réhydratées dans des bains successifs d'éthanol.
5. Coloration avec la combinaison entre deux colorants hématoxyline et éosine (HE),
6. Montage permanent entre lame et lamelle permettant de conserver les coupes colorées.
7. Observation au microscope optique doté d'un appareil photographique.

### 2.3.5. Préparation de l'homogénat

Après la pesée de l'échantillon, l'homogénat du foie est préparé par homogénéisation de 500 mg du foie dans 5 ml du tampon KCl (0,15 M) à 4 ° C. Les homogénats sont centrifugés à 3000 tpm pendant 10 min et les surnageants sont aliquotés puis utilisés pour les dosages biochimiques.

### 2.3.6. Dosage des marqueurs du stress oxydant

#### 2.3.6.1. Dosage de l'activité de la catalase

La catalase est l'enzyme responsable de la décomposition du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'activité de cette enzyme est estimée en suivant la diminution de l'absorbance du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 240 nm, celui-ci est transformé en eau et oxygène moléculaire en présence d'une source enzymatique (homogénat du foie ou plasma). Brièvement, 983,5 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,091M, préparées dans le tampon KHPO<sub>4</sub> 01 M, pH 7.2) sont ajoutés à 16,5µL de l'homogénat et du plasma. La variation de l'absorbance est suivie pendant 30s à 240 nm. L'activité enzymatique en µmol du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> /min/mg de protéine au niveau tissulaire et en en µmol du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> /min/ml au niveau du plasma est calculée en utilisant le coefficient d'extinction molaire 43.6 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Aebi, 1984).

### 2.3.6.2. Dosage des protéines totales

Les protéines totales dans le plasma et l'homogénat du foie sont déterminées selon la méthode de Biuret en utilisant le Kit (Spinreact BSIS30-1). Le principe de ce test est basé sur la complexation entre les protéines et les sels de cuivre pour donner un complexe violet-bleu intense en milieu alcalin. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration en protéines totales dans l'échantillon qui est déterminée en mesurant l'absorbance à 540 nm contre une courbe d'étalonnage (koller, 1984). Brièvement, 1 ml du réactif est ajouté à 25 µL du modèle, homogénat ou plasma. Les absorbances sont mesurées à 540 nm, après 10 min d'incubation à température ambiante.

### 2.3.6.3. Dosage de la SOD

La superoxyde dismutase (SOD) est une métallo-enzyme qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et O<sub>2</sub>. Le dosage de l'activité enzymatique de la SOD au niveau de l'homogénat et du plasma est effectué selon la méthode de Nandy et ses collaborateurs (2012). Le principe de cette méthode est basé sur l'inhibition de l'auto-oxydation du pyrogallol par la SOD. Brièvement, 1000µL du tampon Tris-EDTA (pH 8.14) sont ajoutés à 36 µL du pyrogallol (100 mM dans 0.01N HCl) dans une cuve en quartz. L'absorbance est mesurée pendant 60s à 420 nm en présence ou en absence du 16 µL de l'échantillon. Une unité de la SOD est l'équivalent de la quantité d'enzyme nécessaire pour inhiber l'auto-oxydation du pyrogallol par 50 %. L'activité de la SOD exprimée en Unité/mg est calculée en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Vitesse (V)} = (\text{Abs}_{\text{finale}} - \text{Abs}_{\text{initiale}}) / (\text{t}_{\text{final}} - \text{t}_{\text{initial}})$$

Le pourcentage d'inhibition (I%) est calculé selon la formule suivante :

$$I \% = [(V_P - V_S) / V_P] * 100$$

L'activité enzymatique de la SOD en unité internationale est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{SOD (U)} = [(V_P - V_S) / (V_P * 0.5)]$$

V<sub>p</sub> = Vitesse de l'auto-oxydation du pyrogallol en absence de l'enzyme.

V<sub>s</sub> = Vitesse de l'auto-oxydation du pyrogallol en présence de l'enzyme.

0.5 = exprime 50 % d'inhibition.

### 2.3.6.4. Dosage du Glutathion réduit

Le principe de ce test consiste à fractionner la molécule du DTNB par le GSH dans un pH alcalin (8-9) libérant ainsi l'acide thionitrobenzoïque (TNB) qui présente une absorbance à 412 nm (Ellman, 1959). Le dosage du GSH réduit au niveau du plasma et de l'homogénat est

déterminé selon le protocole de Beutler et ses collaborateurs (1993). Brièvement, 25 µl de plasma ou d'homogénat du foie sont dilués dans 5 ml du tampon phosphate (0.1 M, pH 8). Puis, 3 ml de la solution de l'échantillon dilué sont mélangés avec 20 µl de DTNB (0.01 M). Le mélange est incubé à une température ambiante pendant 5 min. Puis l'absorbance est lue à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA 10 %. La concentration du GSH est déterminée en utilisant le coefficient d'extinction molaire  $14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  et les valeurs sont exprimées en nmol/ml dans le plasma ou nmol/mg de protéine dans l'homogénat.

### 2.3.6.5. Dosage du malondialdéhyde

Le dosage du malondialdéhyde (MDA) est utilisé pour estimer la peroxydation lipidique dans le plasma et l'homogénat spectrophotométriquement à 532 nm. Le MDA est l'un des produits terminaux de la décomposition des acides gras polyinsaturés sous l'effet des radicaux libérés au cours du stress oxydant. En milieu acide et à chaud (pH 2 à 3, 100 °C), une molécule de MDA est condensée avec deux molécules de TBA pour former un complexe coloré en rose.

Pour le dosage du MDA, 125 µl d'homogénat ou de plasma sont ajoutés à un mélange de 125 µl d'acide trichloracétique (20 %) et 250 µl d'acide thiobarbiturique (TBA à 0,67 %). Le mélange est chauffé à 100 °C pendant 15 minutes. Après refroidissement, 1 ml du n-butanol est ajouté puis suivi par une centrifugation à 3000 t/min pendant 15 minutes (Draper et Hardley, 1990). L'absorbance est mesurée à 532 nm. La quantité du MDA est calculée en utilisant le coefficient d'extinction molaire  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  et les valeurs sont exprimées en nmole de MDA formé par millilitre du plasma ou par gramme du tissu.

### 2.3.7. Dosage de la xanthine oxydase

Le dosage de la xanthine oxydase est effectué selon le protocole de Bergmeyer et ses collaborateurs (1974) en suivant l'augmentation de la production de l'acide urique à 290 nm formé suite à l'oxydation de la xanthine en présence d'une source enzymatique (plasma ou homogénat). Brièvement, 333 µl de la xanthine (0.15 mM) sont ajoutés à 666 µl de tampon potassium phosphate (50 mM, pH 7.5) et 33 µl de sérum ou d'homogénat dans une cuve en quartz. La production de l'acide urique est suivie en mesurant la variation de l'absorbance pendant 1 min contre un blanc qui contient tous les réactifs à l'exception de l'échantillon qui est remplacé par l'eau distillée. L'activité enzymatique de la xanthine oxydase est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{U/ml enzyme} = (d A_{290} \text{ nm/min échantillon} - d A_{290} \text{ nm/min Blanc}) (1) / (12.2) (0.033)$$

1 = le volume Total.

12.2 = coefficient d'extinction Milli-molaire de l'acide urique à 290 nm.

0.033 = le volume de l'échantillon.

### 2.4. Effet de la thymoquinone sur l'arthrite rhumatoïde

#### 2.4.1. Induction de l'arthrite rhumatoïde

L'induction de l'arthrite rhumatoïde est effectuée selon le protocole de Griffiths et ses collaborateurs (2007). Trente-cinq rats mâles (200- 250g) sont répartis en cinq groupes de sept rats selon l'homogénéité du poids comme suit :

**Groupe 01** : groupe contrôle normal non arthritique.

**Groupe 02** : groupe contrôle du véhicule.

**Groupe 03** : groupe arthritique.

**Groupe 04** : groupe arthritique traité avec la TQ à une dose de 5 mg/kg/jour.

**Groupe 05** : groupe arthritique traité avec la TQ à une dose de 10 mg/kg/jour.

La procédure par laquelle l'arthrite est induite est la suivante :

**Jour -1** : Une épilation du dos des rats à la base de la queue en utilisant un appareil dépilatoire et une lame gilette est effectuée. Après la pesée des tous les animaux, les rats sont séparés selon l'homogénéité du poids.

**Jour 0** : Une immunisation des rats (groupes 03, 04 et 05) est effectuée par une injection intradermique à la base de la queue dans quatre points de 03 mg/kg de collagène II purifié par Mr. Derradji Yacine, Université Mohammed Khider, Biskra, Algérie (Solution dans 0.1 M de l'acide acétique), émulsifié dans l'adjuvant complet de Freund V/V. Cette injection est réalisée sous anesthésie en utilisant l'uréthane à une dose de 01g/kg injectée par voie intra péritonéale. Une injection à l'uréthane est effectuée au groupe 02.

**Jour 1-40** : Le traitement des rats est effectué quotidiennement comme suit :

Les rats des groupes 4 et 5 sont traités par le gavage de la TQ (de 05 et 10 mg/kg/jour, respectivement). Les rats du groupe 1 et 3 sont laissés sans traitement. Cependant, Les rats du groupe 2 sont traités par le gavage du NaCl qui renferme 0.1 % du tween 80 (le véhicule dans lequel la TQ est dissoute). La pesée des rats est effectuée chaque deux jours pendant 40 jours.

**Jour 07** : Une immunisation de rappel des rats est effectuée par une injection intradermique à la base de la queue dans trois points de 1.5 mg/kg de collagène II purifié, émulsifié dans l'adjuvant incomplet de Freund V/V. Cette injection est réalisée dans les mêmes conditions que la première injection.

**Jour 40 :** Le sacrifice des rats est effectué sous anesthésie avec l'éther diéthylique. Le prélèvement du sang et des organes est réalisé afin d'effectuer les analyses biochimiques et histologiques nécessaires.

### 2.4.2. Evaluation de l'évolution de l'arthrite rhumatoïde

#### 1. Score de la maladie

Le score arthritique est déterminé de 0 à 4 en suivant l'évolution du gonflement des pattes antérieures au niveau du poignet et du milieu et également au niveau de la cheville et du milieu des pattes postérieures d'où : 0 = pas d'arthrite, 01 = extrême rougeur et / ou gonflement minime, 02 = gonflement moyen, 03 = gonflement sévère et 04 = gonflement sévère avec le gonflement du pouce de la patte qui n'arrive plus à supporter le poids de l'animale. Le score arthritique au niveau des articulations métacarpophalangiennes et interphalangiennes et métatarsophalangiennes des quatre premiers doigts de chaque patte est évalué comme suit : 0 = pas de gonflement, 01= gonflement. Le score total est la somme du score de toutes les articulations précédemment citées. Le score qui exprime la sévérité maximale de la maladie est de 20 /patte il s'agit de 40 /2 pattes et 80 / animal (Griffiths *et al.*, 2007).

#### 2. Epaisseur des pattes

L'épaisseur du poignet des pattes antérieures et de la cheville des pattes postérieures ainsi que le milieu des quatre pattes est mesurée en utilisant un pied à coulisse à affichage numérique le jour de l'induction de l'arthrite et à chaque quatre jours pendant 40 jours de l'expérimentation.

### 2.4.3. Prélèvement sanguin

Des prélèvements sanguins sont réalisés à partir du sinus rétro-orbital de l'œil. Le sang récupéré dans des tubes héparinés est immédiatement centrifugé à 4000 t/min pendant 10 minutes. Les sérums sont récupérés et conservés à -4°C jusqu'à leur utilisation pour des dosages biochimiques. Cependant le sang récupéré dans les tubes à EDTA est utilisé pour la détermination de la formule et numération sanguine (FNS).

### 2.4.4. Dosage des paramètres sanguins

Les dosages biochimiques concernent la FNS et les marqueurs hépatiques (ASAT, ALAT et ALP) et rénaux (urée et créatinine) sont réalisés dans le laboratoire du CAC-Sétif, Algérie en utilisant des kits de diagnostic Sprinreact (Espagne) avec un analyseur automatique (Bechman). Alors que, le bilan inflammatoire, y compris l'ASLO, la CRP et les facteurs rhumatoïdes (FR) est réalisé au niveau du laboratoire d'analyses médicales EL-RAZI, Dr. Y. Bouchelouche à El-Eulma.

### 2.4.5. Prélèvement des organes et étude radiologique et histopathologique

Les organes prélevés (foie, reins, rate et pattes) sont conservés dans le formol (10 %), une étude radiologique des pattes est effectuée en utilisant un mammographe (Senorgraphe, 600T-FD, Senix H.F) au niveau du centre d'imagerie médicale LABCIR. H à l'El-Eulma, Setif. Puis les pattes sont décalcifiées en utilisant 08 % de l'acide formique et transportées avec les autres organes (Foie, reins et rate) au service de l'anatomie pathologique du CHU- Sétif pour l'étude histopathologique. L'étude est effectuée selon le protocole expérimental du laboratoire expliqué dans la section 2.4.4.

### 2.4.6. Préparation de l'homogénat

Après la pesée de l'échantillon, l'homogénat du foie et de la rate est préparé en suivant les étapes expliquées dans la section 2.4.6.

### 2.4.7. Dosage des marqueurs du stress oxydant

Le dosage des marqueurs du stress oxydant (CAT, SOD, GSH et MDA) au niveau des homogénats du foie et de la rate et au niveau du plasma, dans le cas de l'arthrite rhumatoïde est effectué en suivant les protocoles expliqués dans la section 2.4.6.

### 2.4.8. Dosage de la xanthine oxydase

La détermination de l'activité xanthine oxydase au niveau des homogénats du foie et de la rate et du plasma, dans le cas d'arthrite rhumatoïde est effectuée en utilisant la méthode expliquée dans la section 2.4.7.

## 3. Analyses statistique

Les résultats des tests effectués *in vitro* et *in vivo* sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD et moyennes  $\pm$  SEM, respectivement. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> (concentration inhibitrice à 50 %) sont calculées par la méthode de la régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentrations)]. La comparaison entre le contrôle et les différents tests est effectuée par le test de Student pour les comparaisons simples ou ANOVA univariée suivie du test de Tukey pour les comparaisons multiples en utilisant le logiciel Graph Pad. Prism. V 5.00. Les valeurs de  $p \leq 0.05$  sont considérées statistiquement significatives.

## *Résultats et Discussion*

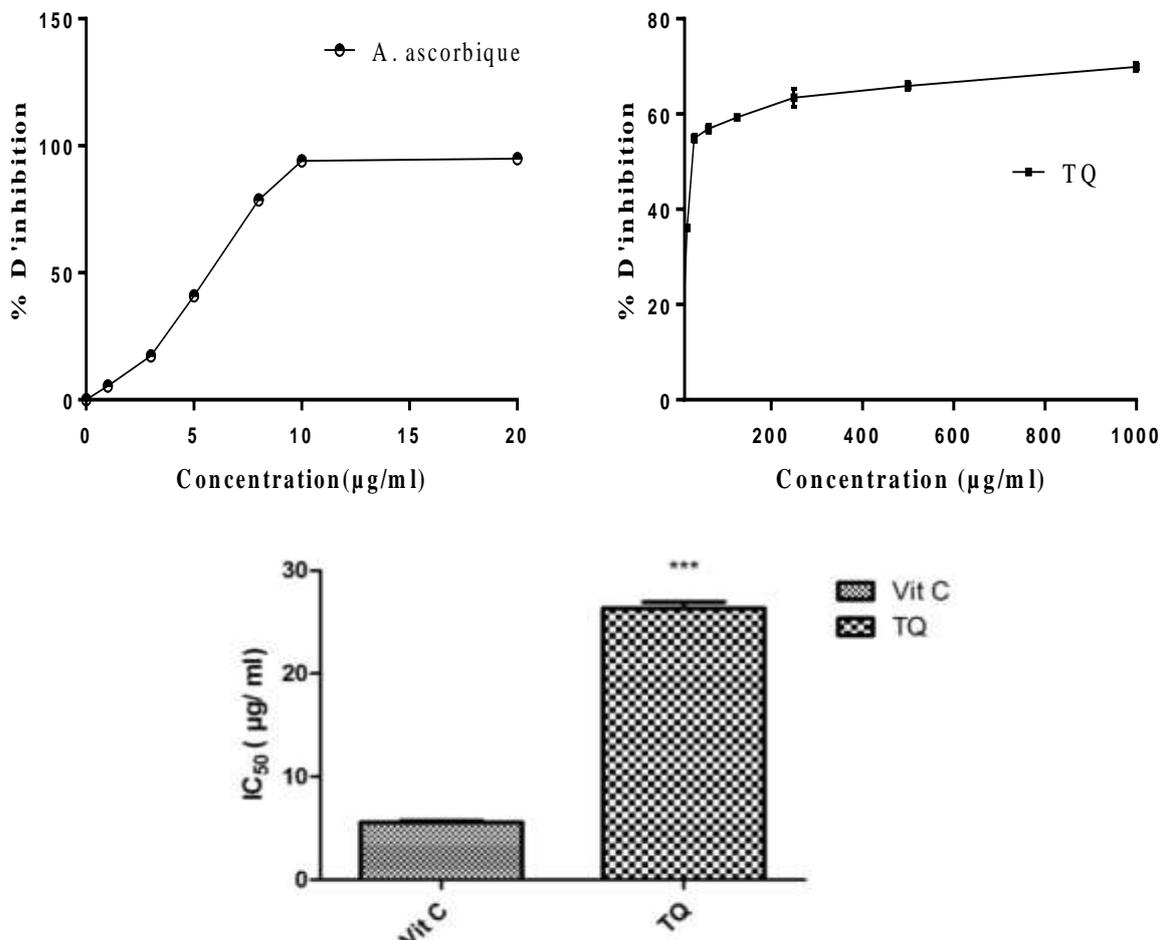
## 1. Etude de l'activité antioxydante *in vitro* de la thymoquinone

### 1.1. Evaluation de l'effet scavenger

Les résultats de l'effet scavenger de la TQ vis-à-vis aux espèces réactives de l'oxygène (ERO) : le radical hydroxyle ( $\text{OH}^\bullet$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) sont présentés sous-dessous.

#### 1.1.1. Effet scavenger du radical hydroxyle

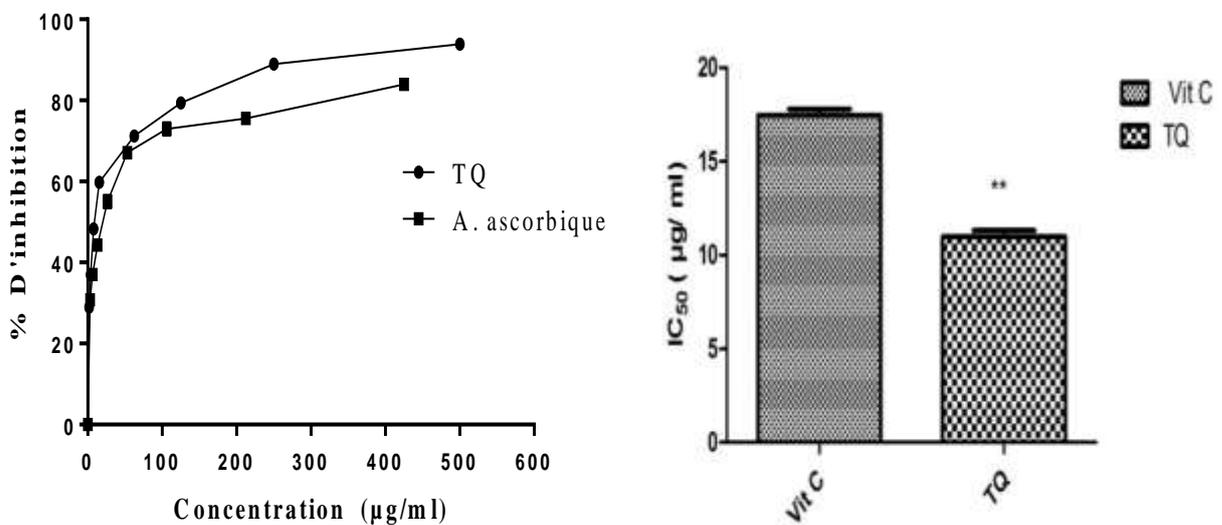
L'effet scavenger du radical  $\text{OH}^\bullet$  a été estimé en fonction de la concentration de la TQ. Les résultats obtenus montrent que la TQ est un excellent piègeur du radical  $\text{OH}^\bullet$  d'une manière dose-dépendante avec une  $\text{IC}_{50}$  de l'ordre de  $26.3 \pm 0.59 \mu\text{g/ml}$  (figure 11). Cette capacité anti-radicalaire reste 05 fois plus faible que celle de l'acide ascorbique qui possède le meilleur effet scavenger avec une  $\text{IC}_{50}$  de  $5.57 \pm 0.18 \mu\text{g/ml}$ .



**Figure 11** : Effet piègeur du radical  $\text{OH}^\bullet$  par la TQ et l'acide ascorbique. (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais  $\pm$  SD,  $***$  :  $p \leq 0.001$ ).

## 1.1.2. Effet scavenger du peroxyde d'hydrogène

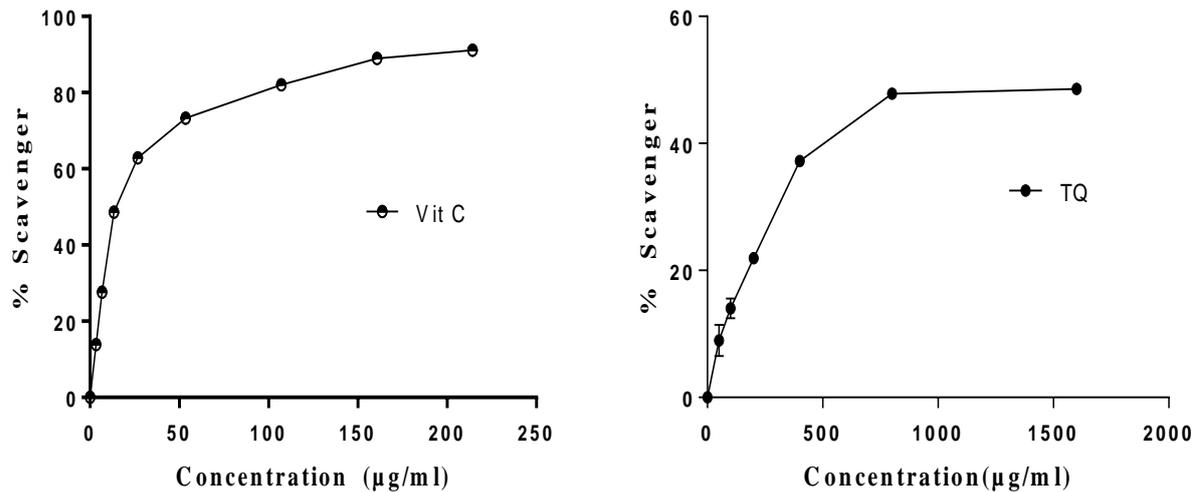
Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 12. Ils montrent que la TQ est un excellent piègeur du peroxyde d'hydrogène avec une  $IC_{50}$  de l'ordre de  $11.0 \pm 0.57 \mu\text{g/ml}$ . En effet, la TQ est significativement ( $p \leq 0.01$ ) plus efficace que l'acide ascorbique utilisé comme antioxydant de référence avec une  $IC_{50}$  de l'ordre de  $17.5 \pm 0.56 \mu\text{g/ml}$ .



**Figure 12 :** Effet scavenger du peroxyde d'hydrogène par la TQ et l'acide ascorbique. (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais  $\pm$  SD, \*\*:  $p \leq 0.01$ ).

## 1.1.3. Effet scavenger de l'anion superoxyde

Les résultats obtenus dans ce test montrent que la TQ possède un effet scavenger vis-à-vis de l'anion superoxyde relativement faible, pour lequel le pourcentage d'inhibition est inférieur à 50%. En effet, son meilleur pourcentage d'inhibition était de  $48,55 \pm 0,68 \%$ . Ce dernier est obtenu à une concentration de l'ordre de 1 mg/ml. Cependant, l'antioxydant standard utilisé (acide ascorbique) exerce un effet scavenger significatif avec une  $IC_{50}$  de l'ordre de  $54.27 \pm 11.23 \mu\text{g/ml}$  (figure 13 et tableau II).



**Figure 13 :** Effet piègeur de l’anion superoxyde par la TQ et l’acide ascorbique. (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais  $\pm$  SD).

**Tableau II :** Valeurs des IC<sub>50</sub> de la TQ et de l’acide ascorbique contre l’anion superoxyde.

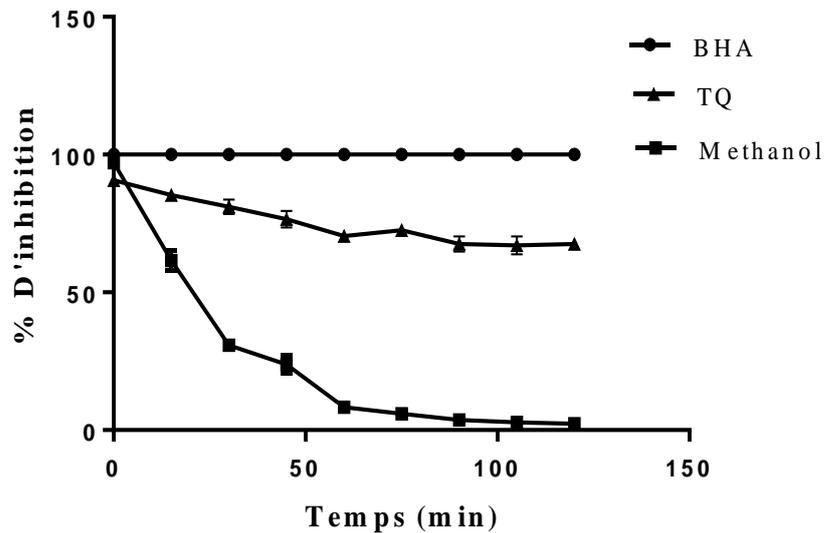
Echantillons	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> (µg/ml)
Thymoquinone	Inhibition inferieure à 50%
Acide Ascorbique	54.27 $\pm$ 11.23

Chaque valeur représente la moyenne de trois essais  $\pm$  SD.

## 1.2. Effet sur la peroxydation lipidique

### 1.2.1. Test de blanchissement de la $\beta$ -carotène

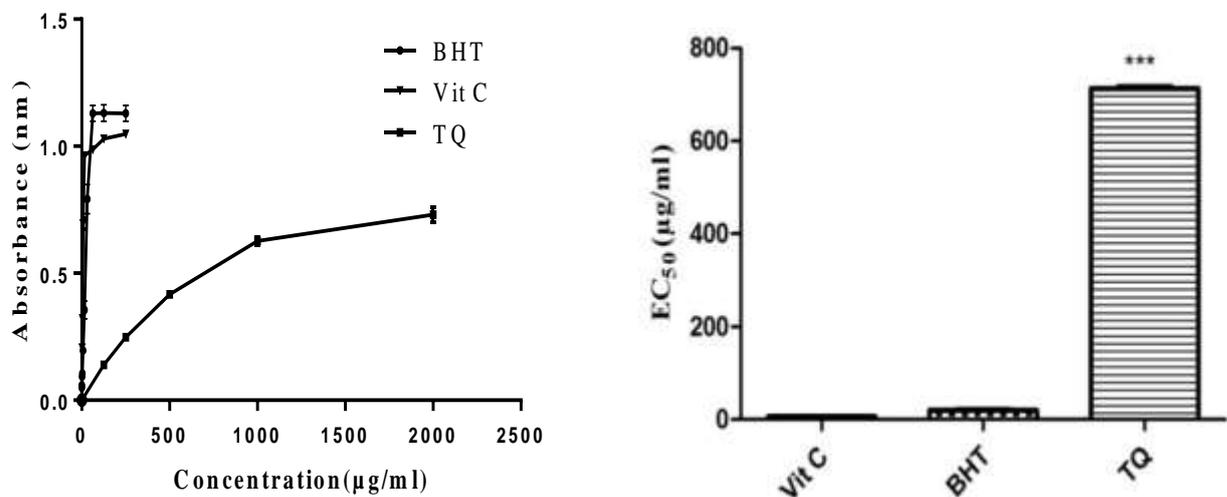
Le but de ce test est d'estimer la capacité de la TQ d'inhiber l'oxydation de la  $\beta$ -carotène provoquée par les radicaux libres générés suite à l'oxydation de l'acide linoléique dans l'émulsion. Les résultats indiquent que la TQ inhibe significativement la peroxydation du  $\beta$ -carotène. À la 120<sup>ème</sup> min, le pourcentage d'inhibition était de  $73.58 \pm 0.50$  %. Cette activité inhibitrice est significativement inférieure ( $p \leq 0.001$ ) à celle du BHA qui manifeste la meilleure activité avec un pourcentage d'inhibition de  $97.2 \pm 1.28$  % (figure 14).



**Figure14 :** Cinétique de blanchissement du  $\beta$ -carotène à 490 nm en absence et en présence de la TQ par rapport au contrôle positif (BHA) et le contrôle négatif (MeOH). Chaque valeur représente la moyenne de trois essais  $\pm$  SD, \*\*\* :  $p \leq 0.001$ .

### 1.3. Pouvoir réducteur

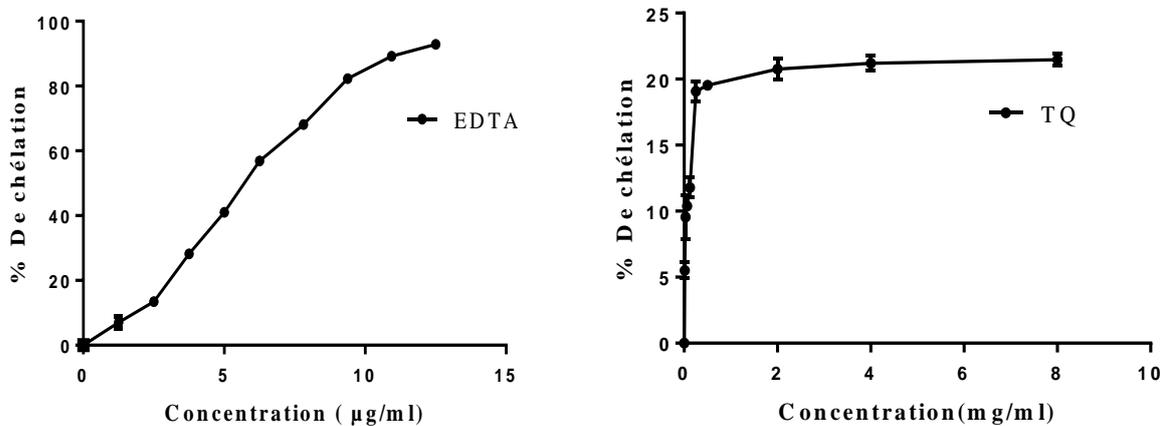
Dans le test du pouvoir réducteur, l'existence d'antioxydant donneur d'élection provoque la conversion des ions ferriques ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en ions ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) et conduit à la formation d'une coloration verte bleuâtre du ferricyanide de potassium. L'intensité de la couleur est directement proportionnelle à la capacité réductrice de l'extrait. Les résultats obtenus montrent que la TQ exprime un pouvoir réducteur dose dépendant (figure 15) avec une concentration effectrice à 50 % ( $\text{EC}_{50}$ ) de l'ordre de  $713.25 \pm 7.13 \mu\text{g/ml}$ . De ce fait, la TQ possède un pouvoir réducteur 109 et 35 fois plus faible que celui de l'acide ascorbique et du BHT qui possèdent respectivement des  $\text{EC}_{50}$  de  $6.55 \pm 0.09$  et  $20.41 \pm 1.89 \mu\text{g/ml}$ .



**Figure15 :** Pouvoir réducteur de la TQ et des standards (Vit C et BHT). Les résultats sont représentés sous forme des  $\text{EC}_{50}$ . Chaque valeur représente la moyenne de trois essais  $\pm$  SD, \*\*\* :  $p \leq 0.001$ .

## 1.4. Chélation du fer ferreux

Ce test permet de mettre en évidence la capacité chélatrice de la thymoquinone. Les résultats obtenus montrent que la TQ n'a pas la capacité de chélater les ions ferreux avant qu'ils soient complexés avec la ferrozine en comparaison avec l'EDTA (figure 16). La concentration de l'échantillon qui donne 50 % d'effet chélateur (EC<sub>50</sub>) est présentée dans le tableau III. Le meilleur pourcentage de chélation était de  $21.14 \pm 0.62$  %. Cette valeur est obtenue à une concentration très élevée de l'ordre de 4 mg/ml (figure 16).



**Figure 16 :** Effet chélateur du fer ferreux de la TQ et du standard (EDTA). Chaque valeur représente la Moyenne de trois essais  $\pm$  SD.

**Tableau III :** Les EC<sub>50</sub> de la TQ et de l'EDTA de la chélation du fer ferreux.

Echantillon	EC <sub>50</sub> (µg/ml)
Thymoquinone	21.14 $\pm$ 0.62 % de chélation maximale
EDTA	6.17 $\pm$ 0.01

Chaque valeur représente la moyenne de trois essais  $\pm$  SD.

Le stress oxydant est à l'origine de l'induction et /ou de l'amplification de plusieurs maladies chez l'homme telles que les atteintes hépatiques et l'arthrite rhumatoïde. Pour évaluer l'activité antioxydante de la thymoquinone *in vitro*, plusieurs tests ont été choisis.

Les résultats de l'effet scavenger de la TQ vis-à-vis des espèces réactives de l'oxygène comprenant le radical hydroxyle et le peroxyde d'hydrogène ont montré une activité significative. En effet, L'effet scavenger de la TQ contre le peroxyde d'hydrogène a montré que la TQ est plus efficace que l'acide ascorbique. Selon nos connaissances, l'effet scavenger de la TQ contre le peroxyde d'hydrogène est estimé pour la première fois dans le présent travail. En ce qui concerne l'effet scavenger du radical hydroxyle, les résultats sont en accord avec ceux de Staniek et Gille (2010) ainsi que ceux de Badary et ses collaborateurs (2003). Ces derniers ont trouvé une IC<sub>50</sub> de  $44.3 \pm$

4.5  $\mu\text{M}$  contre le radical hydroxyle, soit une valeur proche de celle trouvée dans cette étude qui est de l'ordre de  $26.3 \pm 0.59 \mu\text{g/ml}$ .

L'efficacité de la TQ en tant qu'antioxydant puissant contre le radical  $\text{OH}^\bullet$  lui confère une grande importance car le radical  $\text{OH}^\bullet$  est le radical le plus réactif dans le système biologique du fait qu'il est le responsable de l'oxydation des acides gras polyinsaturés des phospholipides des membranes cellulaires provoquant la peroxydation lipidique et les dommages cellulaires (Naidu *et al.*, 2008).

En revanche, les résultats de l'effet scavenger de l'anion superoxyde en utilisant un système chimique ont montré que la TQ révèle une activité relativement faible, dont le meilleur pourcentage d'inhibition était inférieur à 50 %. Les résultats concordent avec ceux de Boudiaf et ses collaborateurs (2016) qui ont montré que la TQ n'a pas un effet scavenger vis-à-vis de l'anion superoxyde alors qu'elle a fortement inhibé la production de l'anion superoxyde par le NADPH oxydase, dans les neutrophiles polynucléaires humains stimulés par le fMLF (N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine). De même, la TQ a inhibé significativement la production de  $\text{l'O}_2^{\bullet-}$  par la xanthine oxydase (Mansour *et al.*, 2002), dont l' $\text{IC}_{50}$  était de l'ordre de nanomolaire. Tandis que, Badary et ses collaborateurs (2003) ont montré que la TQ est un excellent scavenger de l'anion superoxyde produit lors de l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique catalysée par la xanthine oxydase avec une  $\text{IC}_{50}$  de  $3.35 \pm 0.25 \mu\text{M}$ . Ces résultats ont révélé que la TQ est un inhibiteur efficace de la production de l'anion superoxyde dans les systèmes enzymatiques, mais elle est moins efficace dans les systèmes chimiques en tant qu'agent piègeur.

D'autre part, les résultats de l'évaluation du pouvoir réducteur de la TQ révèlent qu'elle avait une faible activité en tant qu'agent réducteur des ions  $\text{Fe}^{+3}$  en  $\text{Fe}^{+2}$ . D'après nos connaissances, dans la littérature, il n'ya pas d'études qui ont évalué le pouvoir réducteur de la TQ. Les résultats obtenus pour l'évaluation de la capacité chélatrice du fer ferreux montrent que la TQ n'a pas cette capacité du fait que son meilleur pourcentage de chélation était de l'ordre de  $21.14 \pm 0.62 \%$ . Ceci pourrait être dû à la propriété d'hydrophobicité de la TQ. Sahreen et ses collaborateurs (2010) ont montré que les extraits ou les molécules induisent des effets chélateurs de manière proportionnelle à la polarité de leurs solvants. D'ailleurs, Ozen et ses collaborateurs (2011) ont montré que les groupements hydrosolubles possèdent un caractère nucléophile élevé qui leur confère la capacité chélatrice et que les constituants aqueux sont plus capables d'inhiber la formation du complexe  $\text{Fe}^{2+}$  - ferrozine, en séquestrant les ions ferreux avant la ferrozine.

Concernant, l'effet de la TQ sur la peroxydation lipidique induite par les radicaux libres, les résultats obtenus révèlent que la TQ inhibe significativement la peroxydation lipidique. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Badary et ses collaborateurs (2003) qui ont montré que la TQ est un inhibiteur efficace de la peroxydation lipidique avec une  $\text{IC}_{50}$  de  $16.8 \pm 1.1 \mu\text{M}$ . Ces

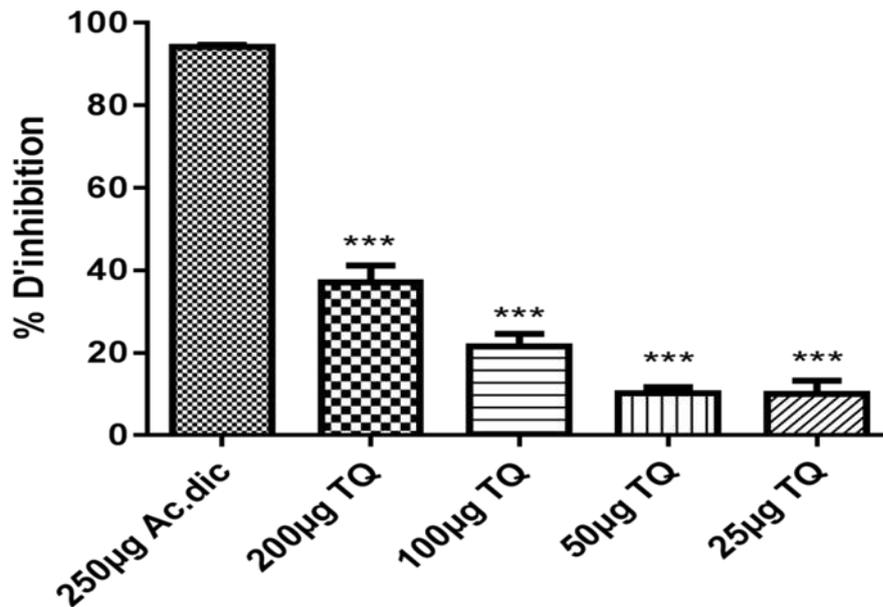
résultats pourraient s'expliquer par la capacité de la TQ d'inhiber la peroxydation de l'acide linoléique suite à son effet scavenger des radicaux libres ou par sa capacité de décomposer les radicaux hydroperoxydes formés durant l'oxydation de l'acide linoléique (Naidu *et al.*, 2008). En fait, Sandhar et ses collaborateurs (2011) ont montré que durant la peroxydation lipidique, les antioxydants agissent de différentes façons à savoir le piégeage des radicaux libres, la décomposition des peroxydes et la chélation des ions métalliques. De plus, il a été démontré que la structure et la lipophilie des antioxydants sont des facteurs favorisant de la propriété antioxydante, probablement en facilitant l'incorporation de ces composés dans la phase lipidique de la membrane (Djeridane *et al.*, 2010).

En plus du caractère lipophile de la TQ qui lui confère la capacité illimitée de franchir les barrières physiologiques et d'accéder facilement aux compartiments subcellulaires, la TQ est caractérisée par la présence d'un noyau quinone qui lui confère des propriétés redox. Ceci favorise ses effets de piégeage radicalaire (Daba *et al.*, 1998 ; Badary *et al.*, 2003).

En conclusion de cette première partie de l'étude et d'après les résultats obtenus, on peut déduire que l'activité antioxydante de TQ est principalement exercée par la capacité de piégeage des radicaux libres spécifiquement le radical hydroxyle et le peroxyde d'hydrogène et non pas par la chélation du fer ferreux (Badary *et al.*, 2003). Ce potentiel antioxydant de la TQ peut être lié aux propriétés redox de la structure quinone de la molécule (Badary *et al.*, 2003 ; Daba *et al.*, 1998).

## 2. Effet anti-inflammatoire *in vitro*

Pour évaluer l'effet anti-inflammatoire *in vitro* de la TQ, la capacité de la TQ d'inhiber la dénaturation induite de la BSA a été estimée. Les résultats obtenus montrent que la TQ possède un effet inhibiteur vis-à-vis la dénaturation de la BSA provoquée par l'incubation de la BSA à une température de 37 °C pendant 20 min puis à 65 °C pendant 10 min. Cet effet est significativement ( $p \leq 0.001$ ) plus faible que celui du contrôle positif l'acide diclofénacique (Ac.dic) qui exprime un pourcentage d'inhibition de  $94.14 \pm 0.92$  % à une concentration de 250 µg/ml. Cependant, les pourcentages d'inhibition obtenus avec la TQ sont de  $37.09 \pm 4.07$ ,  $21.53 \pm 3.05$ ,  $10.21 \pm 1.5$  et  $10.05 \pm 3.26$  % à des concentrations de 200, 100, 50 et 25 µg/ml, respectivement (figure 17). Les concentrations de la TQ supérieures à 200 µg/ml exercent un effet dénaturant vis-à-vis le BSA (figure 17).



**Figure17** : Effet antiarthritique de la TQ et du standard (Acide diclofénac) *in vitro*. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais  $\pm$  SD, \*\*\* :  $p \leq 0.001$ .

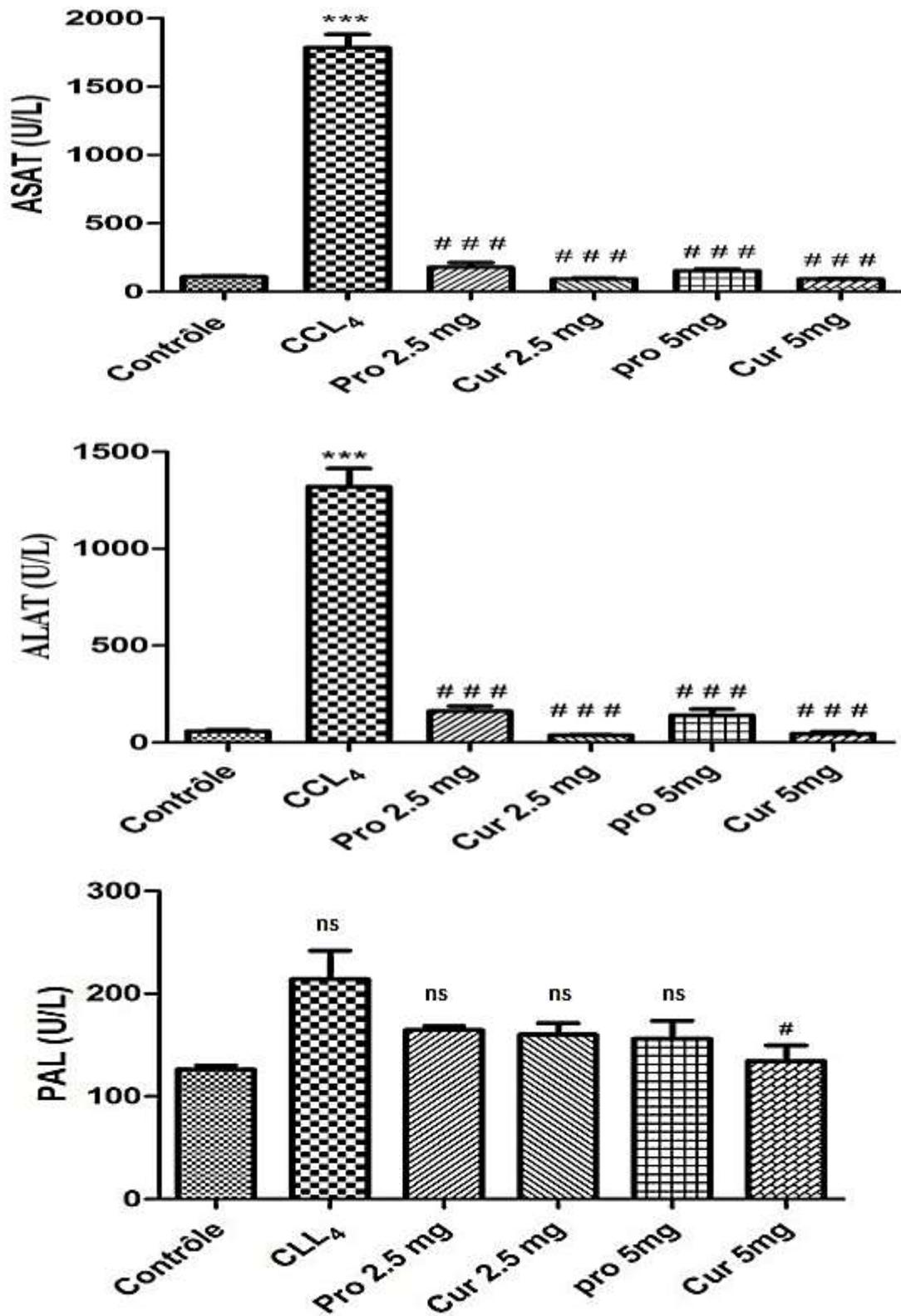
Les résultats de l'évaluation de l'effet hémolytique de la TQ montrent que les concentrations supérieures ou égales à 250  $\mu\text{g/ml}$  sont douées d'une activité cytotoxique vis-à-vis les hématies des rats. Cela pourrait être expliqué par l'effet pro-oxydant de la TQ. Cet effet est enregistré après 90 min d'incubation. Alors que la Vit C exerce un effet hémolytique au début de l'incubation à des concentrations supérieures ou égales à 500  $\mu\text{g/ml}$ . Les résultats de l'effet anti-inflammatoire *in vitro* de la TQ montrent une faible activité protectrice.

### 3. Effet hépatoprotecteur et hépatocuratif de la thymoquinone

#### 3.1. Effet sur les paramètres biochimiques hépatiques

Les résultats de dosage des paramètres biochimiques hépatiques ALAT, ASAT et PAL montrent que l'intoxication des rats mâles par l'injection intrapéritonéale du  $\text{CCl}_4$  induit une augmentation hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) de l'activité des enzymes hépatiques ASAT, ALAT et PAL par 16.42, 22.87 et 1.70 fois, respectivement par rapport au contrôle. Ces résultats expriment les dommages hépatocellulaires accrues dans le foie. Cependant, le prétraitement (le traitement prophylactique) des rats pendant 07 jours avec la TQ protège les rats contre l'hépatotoxicité induite par  $\text{CCl}_4$ . Cette protection est traduite par une diminution significative de l'activité des enzymes hépatiques. Le prétraitement avec 2.5 mg/kg/jour a diminué l'activité ASAT, ALAT et PAL par 89.94 %, 87.80 % et 23.08 %, respectivement. De même, le prétraitement des rats avec 05 mg/kg/jour a diminué l'activité de ces enzymes par 91.39 %, 89.31 % et 27.06 %, respectivement par rapport au groupe  $\text{CCl}_4$  (figure 18 et tableau IV).

Par ailleurs, le traitement curatif des rats pendant 7 jours avec la TQ en utilisant 2.5 et 05 mg/kg /jour indique un pouvoir thérapeutique important contre l'hépatotoxicité induite par CCl<sub>4</sub>. Ce pouvoir thérapeutique est traduit par une diminution significative de l'activité des enzymes hépatiques dans le sérum. Le traitement avec 2.5 mg/kg/jour a diminué ASAT, ALAT et PAL par 94.77 %, 97.19 % et 25.23 %, respectivement. Tandis que, le traitement des rats avec 05 mg / kg/ jour a diminué l'activité de ces enzymes par 94.86 %, 98.27 % et 37.38 %, respectivement par rapport au groupe CCl<sub>4</sub> (figure 18 et tableau IV).



**Figure 18** : Statut des enzymes hépatiques des rats traités avec le CCl<sub>4</sub> en présence et en absence de la TQ (2.5 et 05 mg/kg) pendant 7 jours. Les valeurs sont exprimées en tant que moyennes  $\pm$  SEM (n = 7). \*\*\* :  $p \leq 0,001$  une différence significative par rapport au groupe contrôle, # :  $p \leq 0,05$ , ### :  $p \leq 0,001$  une différence significative par rapport aux rats traités avec CCl<sub>4</sub>.

**Tableau IV** : Effet de la thymoquinone sur le statut des enzymes hépatiques.

Traitement (mg/kg)	ASAT (U/L)	ALAT (U/L)	PAL (U/L)
<b>Contrôle</b>	109.00 ± 7.94	57.7 ± 6.12	126 ± 4.00
<b>Pro 2.5 mg</b>	180,00 ± 33.4 <sup>###</sup>	161 ± 25.3 <sup>###</sup>	164.6 ± 3.70 <sup>ns</sup>
<b>Pro 5 mg</b>	154,00 ± 13.1 <sup>###</sup>	141 ± 31.3 <sup>###</sup>	156.1 ± 17.50 <sup>ns</sup>
<b>Cur 2.5 mg</b>	93.60 ± 7.30 <sup>###</sup>	37.1 ± 2.84 <sup>###</sup>	160 ± 11.3 <sup>ns</sup>
<b>Cur 5 mg</b>	92.00 ± 5.04 <sup>###</sup>	22.9 ± 9.34 <sup>###</sup>	134 ± 15.1 <sup>#</sup>
<b>CCl<sub>4</sub> seul</b>	1790 ± 97.1 <sup>***</sup>	1320 ± 93.7 <sup>***</sup>	214 ± 27.7 <sup>ns</sup>

Les valeurs sont exprimées en tant que moyennes ± SEM (n = 7). \*\*\* : p ≤ 0,001 une différence significative par rapport au groupe contrôle, # : p ≤ 0,05, ### : p ≤ 0,001 une différence significative par rapport aux rats traités avec CCl<sub>4</sub>.

**Tableau V** : Pourcentage de l'activité hépatoprotectrice et hépatocurative de la TQ contre la toxicité induite par CCl<sub>4</sub>.

% de l'activité	Traitement	ASAT	ALAT	PAL
<b>Hépatocurative</b>	<b>Cur 2.5 mg</b>	<b>100.92</b>	<b>101.63</b>	<b>61.36</b>
	<b>Cur 5 mg</b>	<b>101.01</b>	<b>102.76</b>	<b>90.91</b>
<b>Hépatoprotectrice</b>	<b>Pro 2.5 mg</b>	<b>95.78</b>	<b>91.82</b>	<b>56.14</b>
	<b>Pro 5 mg</b>	<b>97.32</b>	<b>93.40</b>	<b>65.80</b>

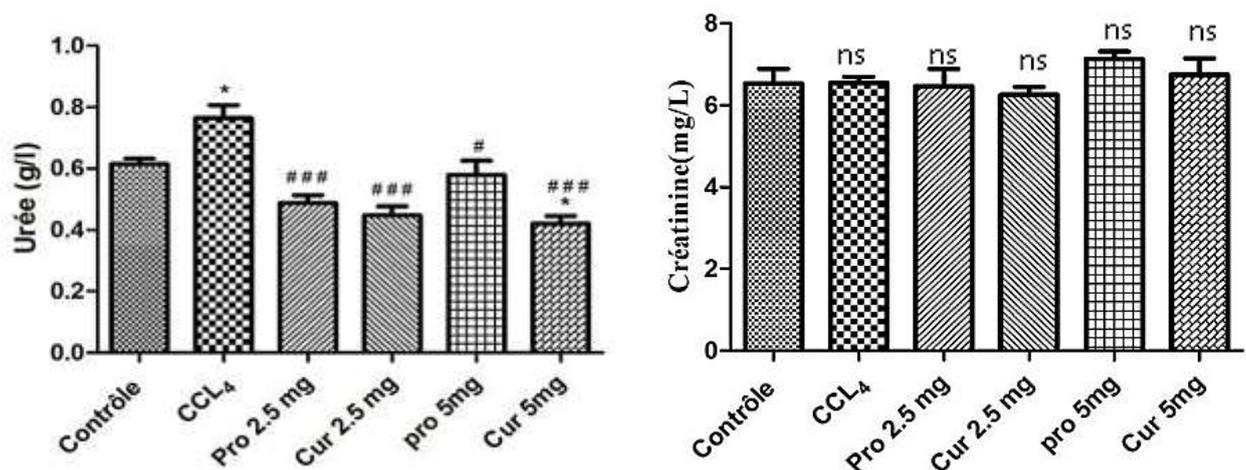
### 3.2. Effet sur les paramètres biochimiques rénaux et lipidiques

Les résultats de dosage des paramètres rénaux montrent une augmentation significative ( $p \leq 0.05$ ) du taux plasmatique de l'urée, chez les rats traités avec le CCl<sub>4</sub> par rapport aux rats du groupe contrôle. Cependant, Le traitement et le prétraitement avec la TQ ont montré une diminution hautement significative ( $p \leq 0,001$ ) à l'exception du prétraitement avec 05 mg/kg/jour. A cette dose, on note une diminution moins significative ( $p \leq 0.05$ ), en comparaison avec le groupe des rats traités avec le CCl<sub>4</sub>. Alors que, le taux plasmatique de la créatinine ne présente aucune différence significative entre les différents groupes d'animaux traités par rapport au groupe contrôle (figure 19 et tableau VI).

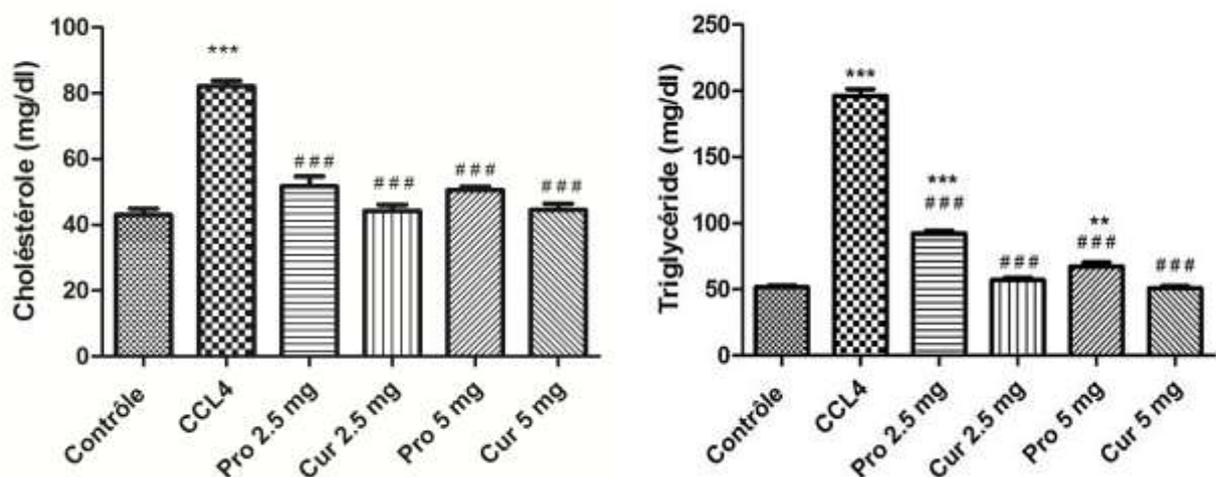
En ce qui concerne le bilan lipidique, une augmentation hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) est enregistrée chez les rats traités avec le CCl<sub>4</sub>, dont les taux des triglycérides et du cholestérol sont respectivement 3.80 fois 1.91 fois plus élevés que celui enregistré chez les rats du groupe contrôle normal. Cependant, le prétraitement des rats avec la TQ a permis de diminuer significativement ( $p$

$\leq 0.001$ ) le taux sérique des triglycérides et du cholestérol d'une manière dose-dépendante (figure 20 et tableau VII). En effet, le prétraitement des rats en utilisant 2.5 et 05 mg /kg/jour a diminué les triglycérides par 52.95 % et 65.71 %, respectivement. De même, il a diminué le cholestérol par 37.10 et 38.56 %, respectivement.

Le traitement des rats avec la TQ a permis de restaurer et de maintenir le taux des paramètres du bilan lipidique à des valeurs très proches à ceux enregistrées chez le groupe contrôle (figure 20 et tableau VII). Le traitement des rats en utilisant 2.5 et 05 mg /kg/jour a diminué les triglycérides par 70.91 et 74.08 %, respectivement. De même, il a diminué le cholestérol par 46.11 et 45.86 %, respectivement.



**Figure19 :** Bilan rénal des groupes des rats traités avec le CCl<sub>4</sub> en présence et en absence de la TQ (2.5 et 5 mg/kg) pendant 7 jours. Chaque valeur est représentée en tant que moyen  $\pm$  SEM. \* :  $p \leq 0.05$ , \*\*\* :  $p \leq 0.001$  une différence significative par rapport au groupe contrôle, # :  $p \leq 0.05$ , ## :  $p \leq 0.01$ , ### :  $p \leq 0.001$  une différence significative par rapport au groupe traité avec le CCl<sub>4</sub>.



**Figure20 :** Bilan lipidique des groupes des rats traités avec le CCl<sub>4</sub> en présence et en absence de la TQ (2.5 et 5 mg/kg) pendant 7 jours. Chaque valeur est représentée en tant que moyen  $\pm$  SEM. \* :  $p \leq 0.05$ , \*\*\* :  $p \leq 0.001$  une différence significative par rapport au groupe contrôle, # :  $p \leq 0.05$ , ## :  $p \leq 0.01$ , ### :  $p \leq 0.001$  une différence significative par rapport au groupe traité avec le CCl<sub>4</sub>.

**Tableau VI :** Effet de la TQ sur les paramètres biochimiques rénaux chez les différents groupes expérimentaux.

Traitement (mg/kg)	Urée (g/L)	Créatinine (mg/L)
Contrôle	0.61 ± 0.02	6.53 ± 0.35
Pro 2.5 mg	0.50 ± 0.03 ###	6.47 ± 0.41 <sup>ns</sup>
Pro 5 mg	0.58 ± 0.05 <sup>#</sup>	7.14 ± 0.17 <sup>ns</sup>
Cur 2.5 mg	0.45 ± 0.04 ###	6.26 ± 0.18 <sup>ns</sup>
Cur 5 mg	0.42 ± 0.02 <sup>*,###</sup>	6.75 ± 0.40 <sup>ns</sup>
CCl <sub>4</sub> seul	0.76 ± 0.04 <sup>*</sup>	6.55 ± 0.14 <sup>ns</sup>

Chaque valeur est représentée en tant que moyen ± SEM. \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*\*:  $p \leq 0.001$  une différence significative par rapport au groupe contrôle. #:  $p \leq 0.05$ , ###:  $p \leq 0.001$  une différence significative par rapport au groupe traité avec CCl<sub>4</sub>.

**Tableau VII :** Effet de la TQ sur les paramètres biochimiques lipidiques chez les différents groupes expérimentaux.

Traitement (mg/kg)	Cholestérol (mg/dl)	Triglycéride (mg/dl)
Contrôle	43.0 ± 1.95	51.5 ± 1.43
Pro 2.5 mg	51.7 ± 3.06 ###	92.2 ± 2.22 <sup>***,###</sup>
Pro 5 mg	50.5 ± 1.15 ###	67.2 ± 3.18 <sup>**,###</sup>
Cur 2.5 mg	44.3 ± 1.82 ###	57.0 ± 1.86 ###
Cur 5 mg	44.5 ± 1.98 ###	50.8 ± 1.56 ###
CCl <sub>4</sub> seul	82.2 ± 1.66 <sup>***</sup>	196 ± 5.08 <sup>***</sup>

Chaque valeur est représentée en tant que moyen ± SEM. \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*\*:  $p \leq 0.001$  une différence significative par rapport au groupe contrôle. #:  $p \leq 0.05$ , ###:  $p \leq 0.001$  une différence significative par rapport au groupe traité avec CCl<sub>4</sub>.

### 3.3. Effet de la thymoquinone sur l'histologie du foie

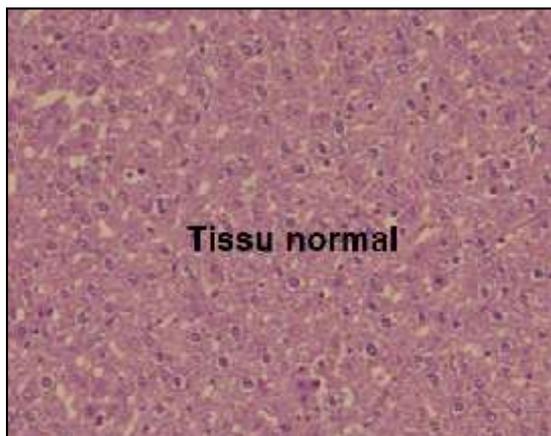
Les photomicrographies obtenues à partir de l'examen histopathologique sont représentées dans la figure 21. Les coupes histologiques du foie des rats normaux ont révélé une architecture normale (figure 21 G). Tandis que ceux du foie des rats traités avec le CCl<sub>4</sub> présentent un aspect significativement différent à celui des rats du groupe contrôle, avec une congestion sévère, une nécrose étendue des hépatocytes, un œdème, des zones de stéatose et une infiltration des cellules inflammatoires diffuses comprenant des mononucléaires, des polynucléaires et des histiocytes (figure 21 A et B).

## Résultats et Discussion

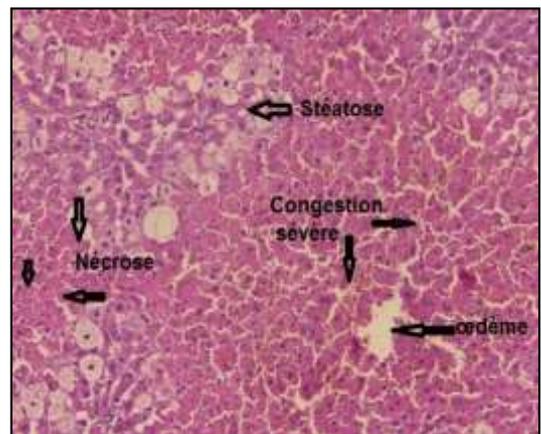
En revanche, le prétraitement avec 2.5 et 05 mg/kg/jour a révélé une protection significative de l'architecture hépatique traduite par une diminution de l'infiltration des cellules inflammatoires avec une persistance de discrètes nécrose et infiltration, respectivement (figure 21 C et D). En outre, les animaux traités avec 2.5 et 05 mg/kg/jour présentent une architecture hépatique similaire à celle des animaux normaux. On note clairement la disparition de toutes les lésions hépatiques, à l'exception d'une discrète congestion observée avec la dose 2.5 mg/kg/jour (figure 21 E et F).

Les coupes histologiques des reins n'expriment aucune lésion tissulaire à l'exception de la présence de discrètes congestions chez tous les groupes de rats traités avec le CCl<sub>4</sub> en présence ou en absence du prétraitement et du traitement avec 2.5 et 05 mg/kg de la thymoquinone (figure 22).

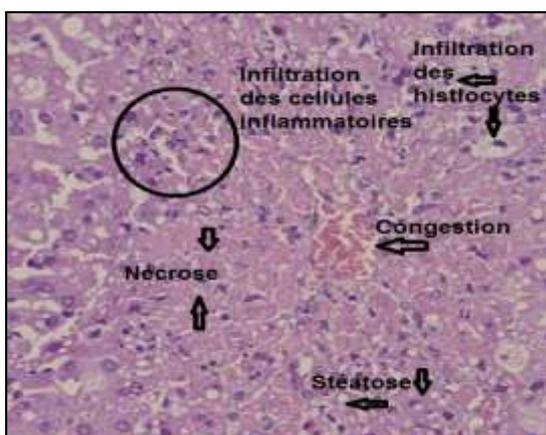
Le groupe contrôle des rats normaux présente une architecture normale des reins (figure 22 B).



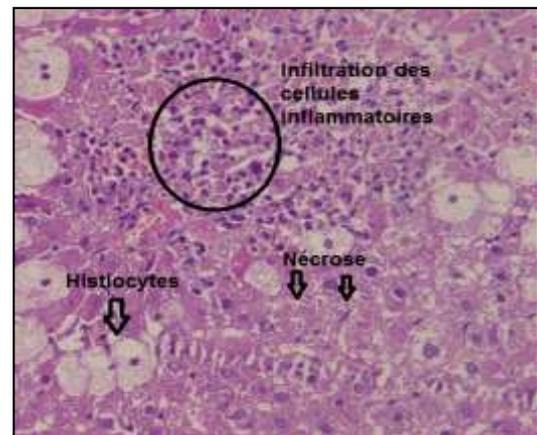
(A)



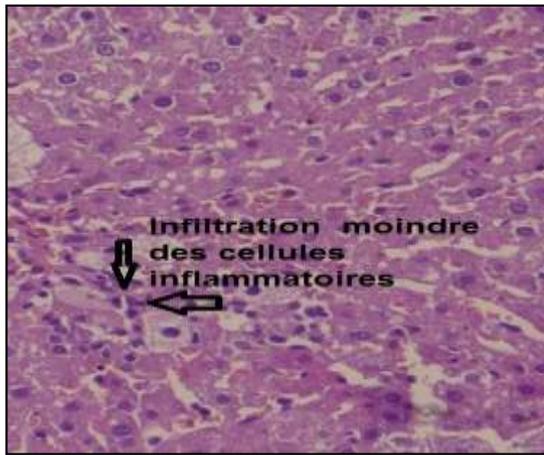
(B)



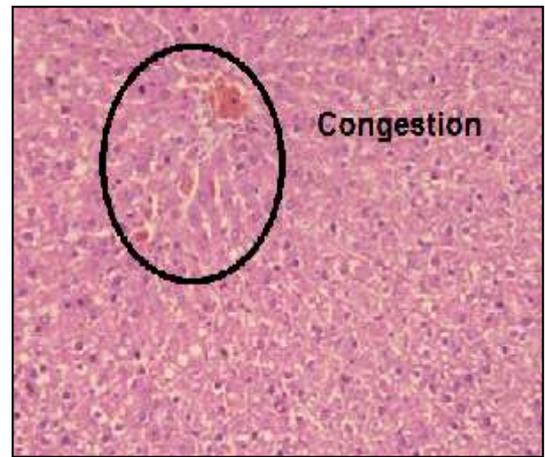
(C)



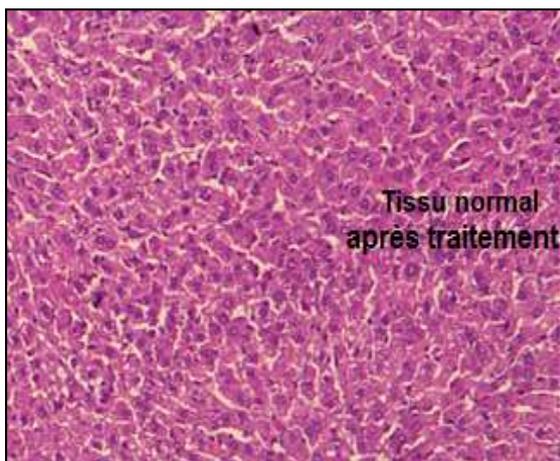
(D)



(E)



(F)



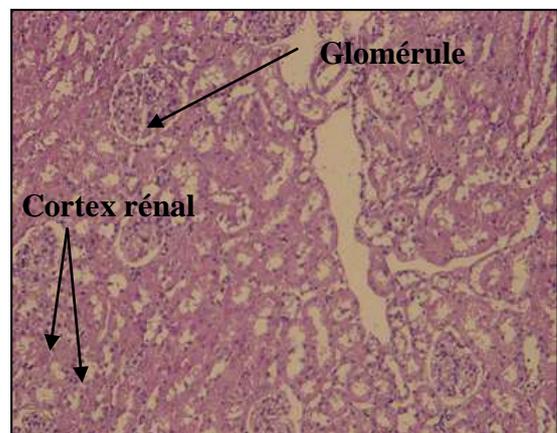
(G)

A : (Contrôle) : Architecture tissulaire normale. B : (CCl<sub>4</sub> seul) : congestion sévère, nécrose, œdème et stéatose, C : (CCl<sub>4</sub> seul) : Infiltration des cellules inflammatoires et des histiocytes. D : (Pro 2.5 mg) : Nécrose et infiltration des cellules inflammatoires. E : (Pro 5 mg) : Infiltration des cellules inflammatoires moindre. F : (Cur 2.5 mg) : congestion moindre. G : (Cur 5 mg) : Restauration de l'architecture tissulaire normale.

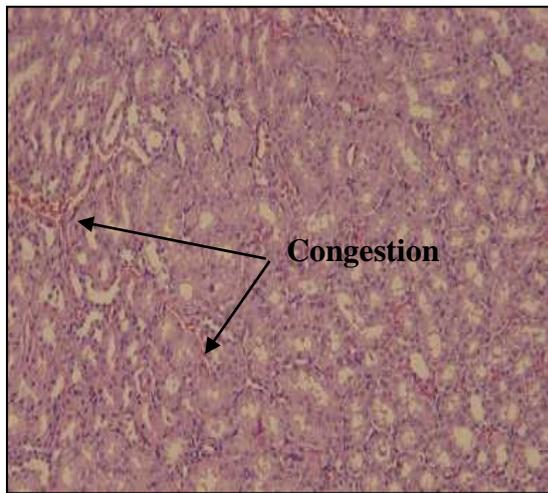
**Figure 21** : Coupes histologiques du foie des groupes des rats traités avec le CCl<sub>4</sub> en présence et en absence de la TQ (2.5 et 05 mg/kg) pendant 7 jours. X100.



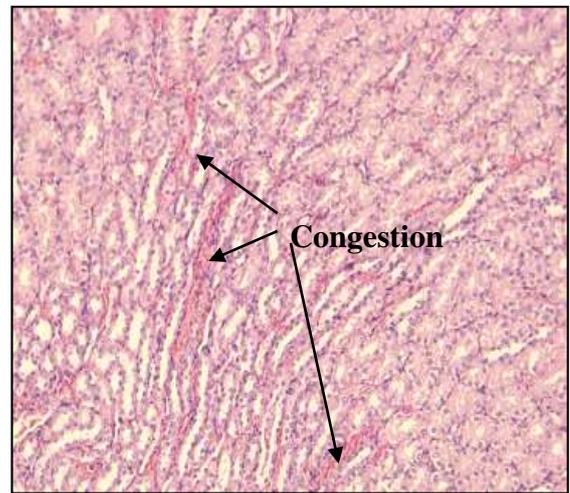
A: CCl<sub>4</sub>



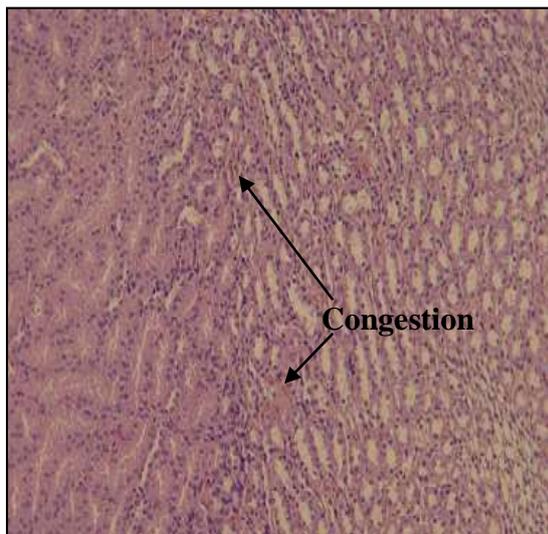
B: Contrôle



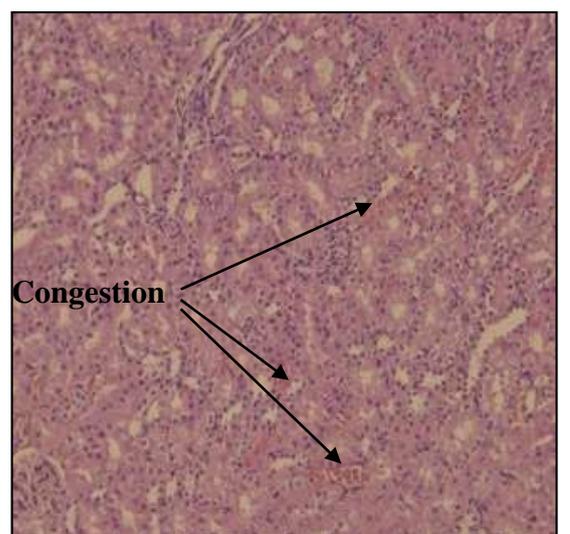
**C: Cur 2.5 mg**



**D: Pro 2.5 mg**



**E: Pro 5 mg**



**F: Cur 5 mg**

**Figure 22 :** Coupes histologiques des reins des rats traités avec le  $\text{CCl}_4$  en présence et en absence de la TQ par rapport ceux normaux. X 100.

### 3.4. Effet de la thymoquinone sur le statut des marqueurs du stress oxydant

Les marqueurs du stress oxydant évalués dans ce travail sont la CAT et la SOD en tant que marqueurs enzymatiques et le GSH et le MDA en tant que marqueurs non enzymatiques. Le statut des différents marqueurs est évalué dans le cas de l'hépatotoxicité induite par  $\text{CCl}_4$  au niveau de l'homogénat du foie et au niveau du plasma.

#### 3.4.1. Statut des marqueurs du stress oxydant au niveau de l'homogénat du foie

Le statut des marqueurs du stress oxydant dans le cas de l'hépatotoxicité chez les rats traités avec le  $\text{CCl}_4$  en présence et en absence de la TQ est évalué par dosage colorimétrique. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 23 et le tableau VIII.

L'hépatotoxicité induite par CCl<sub>4</sub> est accompagnée par une augmentation hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) du MDA ( $174 \pm 3$  nmol/g tissu par rapport à  $76.9 \pm 15.3$  nmol/g tissu du groupe contrôle) et une diminution du taux de GSH ( $50.2 \pm 8.78$   $\mu$ mol/mg par rapport à  $56.3 \pm 5.58$   $\mu$ mol/mg du groupe contrôle). Par ailleurs, une diminution de l'activité des enzymes (CAT et SOD) est constatée chez les rats du groupe intoxiqués par CCl<sub>4</sub>, en comparaison avec le groupe contrôle ( $4.25 \pm 0.49$  par rapport à  $7.09 \pm 0.75$  U/mg protéine et  $42.0 \pm 05.56$  par rapport à  $79.9 \pm 08.31$  U/mg protéine, respectivement).

Les résultats du prétraitement prophylactique et du traitement curatif des rats avec la TQ en utilisant 2.5 et 05 mg/kg/jour pendant 7 jours ont montré que la TQ a diminué significativement ( $p \leq 0.001$ ) le taux du MDA par rapport au groupe traité avec le CCl<sub>4</sub>. La diminution la plus importante est observée avec le traitement curatif que ce soit pour la dose de 2.5 ou celle de 05 mg/kg/ml.

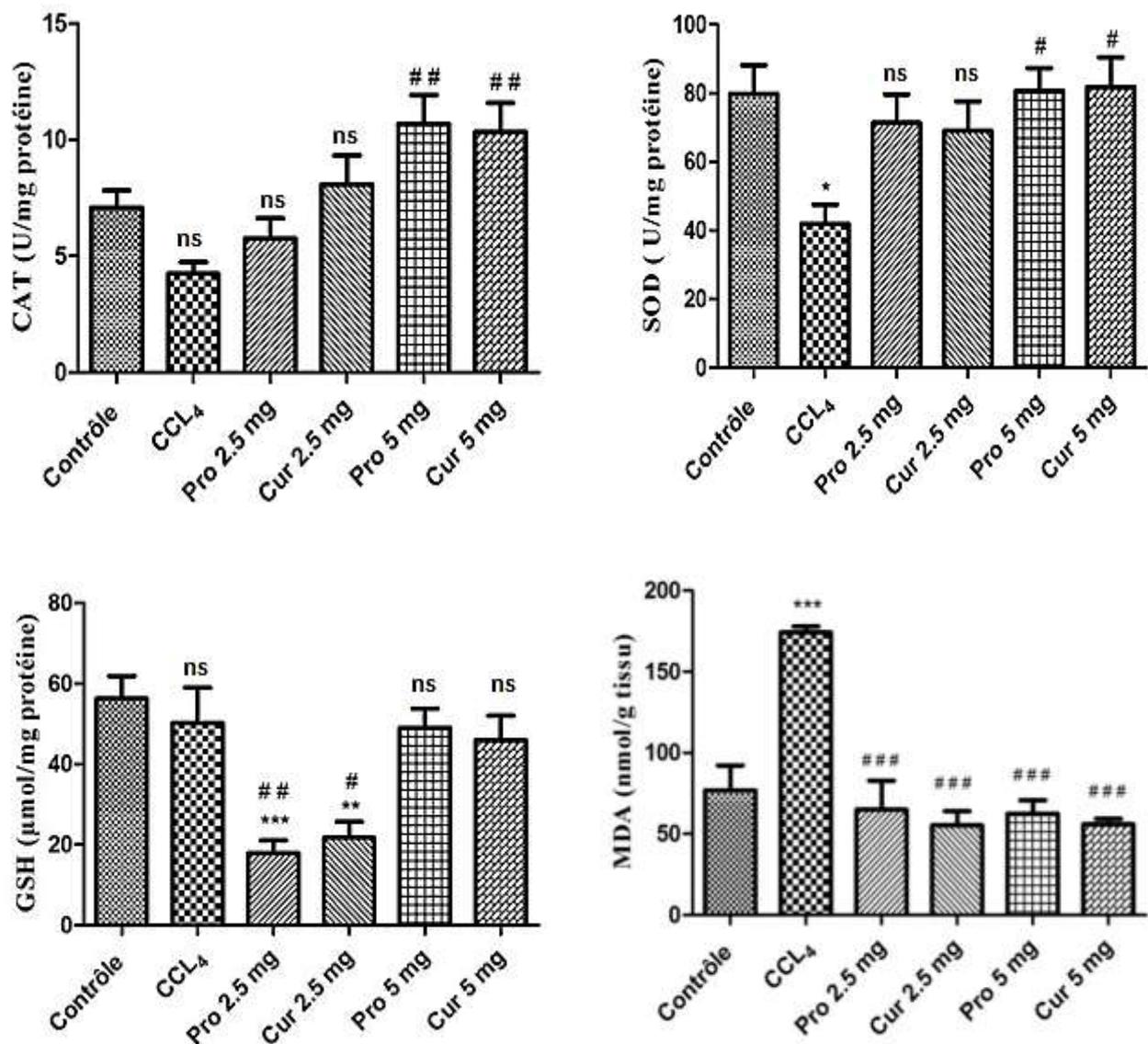
Concernant l'activité des enzymes antioxydantes (CAT et SOD), le traitement avec la TQ, que ce soit pour visée prophylactique ou curative, a conduit à une augmentation significative avec la dose de 05 mg/kg/jour ( $p \leq 0.01$ ,  $p \leq 0.05$ , respectivement) par rapport au groupe traité avec le CCl<sub>4</sub>. L'augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes la plus importante est enregistrée avec la dose de 05 mg/kg/jour. L'activité de la CAT étaient de  $10.7 \pm 1.25$  U/mg protéine et  $10.3 \pm 1.25$  U/mg protéine, alors que celle de la SOD étaient de  $80.7 \pm 16.65$  U/mg protéine et  $81.9 \pm 08.59$  U/mg protéine, respectivement.

Les traitements prophylactique et curatif avec la TQ n'a pas permis le rétablissement du taux du GSH. Les deux traitements appliqués avec la dose de 2.5 mg/kg/jour ont montré une diminution significative ( $p \leq 0.01$ ,  $p \leq 0.05$ , respectivement) par rapport aux rats traités avec le CCl<sub>4</sub>. La dose de 05 mg/kg/jour a permis d'observer une augmentation significative du taux du GSH par rapport celui obtenu avec 2.5 mg/kg/jour. Les résultats semblent suggérer que la TQ induit une augmentation du GSH d'une manière dose-dépendante.

**Tableau VIII :** Effet de la thymoquinone sur le statut hépatique des marqueurs du stress oxydant.

Traitement (mg/kg)	Homogénat du foie			
	Catalase (U/mg protéine)	SOD (U/mg protéine)	GSH ( $\mu\text{mol/mg}$ protéine)	MDA (nmol/g Tissu)
Contrôle	7.09 $\pm$ 0.75	79.9 $\pm$ 08.31	56.3 $\pm$ 5.58	76.9 $\pm$ 15.3
Pro 2.5 mg	5.76 $\pm$ 0.87 <sup>ns</sup>	71.4 $\pm$ 08.29 <sup>ns</sup>	17.9 $\pm$ 3.20 <sup>***,##</sup>	64.9 $\pm$ 18.1 <sup>###</sup>
Pro 5 mg	10.7 $\pm$ 1.25 <sup>##</sup>	80.7 $\pm$ 16.65 <sup>#</sup>	49.1 $\pm$ 4.69 <sup>ns</sup>	62.3 $\pm$ 8.36 <sup>###</sup>
Cur 2.5 mg	8.09 $\pm$ 1.24 <sup>ns</sup>	69.0 $\pm$ 08.55 <sup>ns</sup>	21.7 $\pm$ 4.02 <sup>**,#</sup>	55.2 $\pm$ 8.81 <sup>###</sup>
Cur 5 mg	10.3 $\pm$ 1.25 <sup>##</sup>	81.9 $\pm$ 08.59 <sup>#</sup>	46.0 $\pm$ 6.10 <sup>ns</sup>	55.9 $\pm$ 3.43 <sup>###</sup>
CCL <sub>4</sub>	4.25 $\pm$ 0.49 <sup>ns</sup>	42.0 $\pm$ 05.56 <sup>*</sup>	50.2 $\pm$ 8.78 <sup>ns</sup>	174 $\pm$ 3.71 <sup>***</sup>

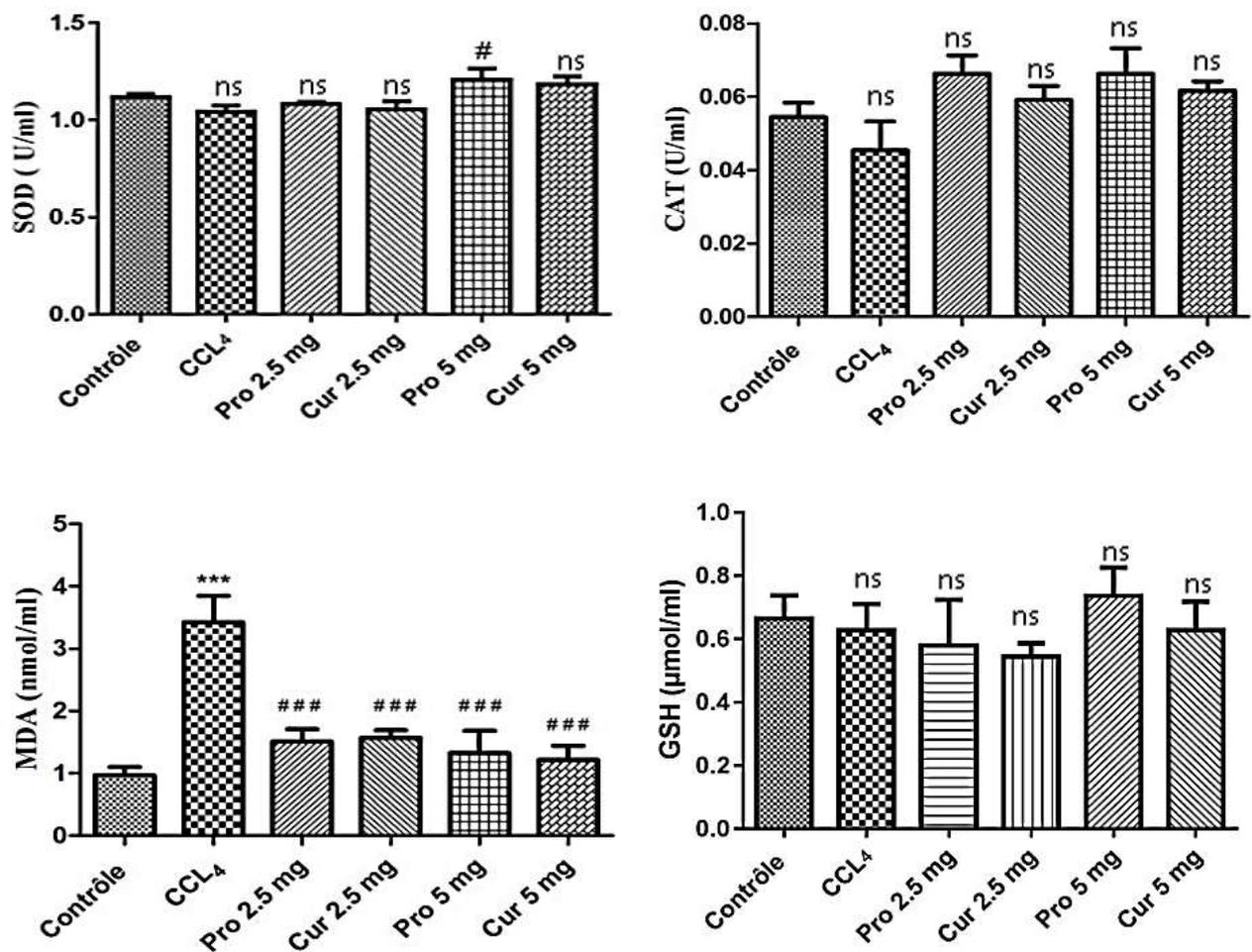
Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM, (n = 7) ; \* : p  $\leq$  0.05, \*\* : p  $\leq$  0.01, \*\*\* : p  $\leq$  0.001 une différence significative par rapport le groupe de rats contrôle, # : p  $\leq$  0.05, ## : p  $\leq$  0.01, ### : p  $\leq$  0.001 une différence significative par rapport le groupe traité avec CCL<sub>4</sub>.



**Figure 23 :** Effet de la thymoquinone sur le statut hépatique des marqueurs du stress oxydant. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM, (n = 7) ; \*\* : p  $\leq$  0.01, \*\*\* : p  $\leq$  0.001 une différence significative par rapport au groupe contrôle des rats, ### : p  $\leq$  0.001 une différence significative par rapport au groupe traité avec le CCL<sub>4</sub>.

## 3.4.2. Statut des marqueurs du stress oxydant au niveau du plasma

Les résultats de dosage des marqueurs du stress oxydant au niveau du plasma ont montré une légère diminution de l'activité des enzymes antioxydantes (CAT et SOD) et du taux de GSH. Par contre, une augmentation significative ( $p \leq 0.001$ ) du MDA est observée chez les rats traités avec le  $\text{CCl}_4$  ( $3.42 \pm 0.43$  nmol/ml par rapport à  $0.97 \pm 0.13$  nmol/ml du groupe contrôle). En revanche, le traitement et le prétraitement avec la TQ des rats intoxiqués par  $\text{CCl}_4$  ont permis de restaurer et de maintenir les activités des enzymes antioxydantes et le taux plasmatique du GSH et du MDA ( $p \leq 0.001$ ) à des valeurs très proches de celles observées chez le groupe contrôle. Cette restauration était dose-dépendante (figure 24 et tableau IX).



**Figure 24 :** Effet de la Thyymoquinone sur le statut des marqueurs du stress oxydatif au niveau du plasma. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM, ( $n = 7$ ) ; \*\*\* :  $p \leq 0.001$  une différence significative par rapport le groupe de rats contrôle, ### :  $p \leq 0.001$  une différence significative par rapport le groupe traité avec  $\text{CCl}_4$ .

**Tableau IX :** Effet de la thymoquinone sur le statut plasmatique des marqueurs du stress oxydant.

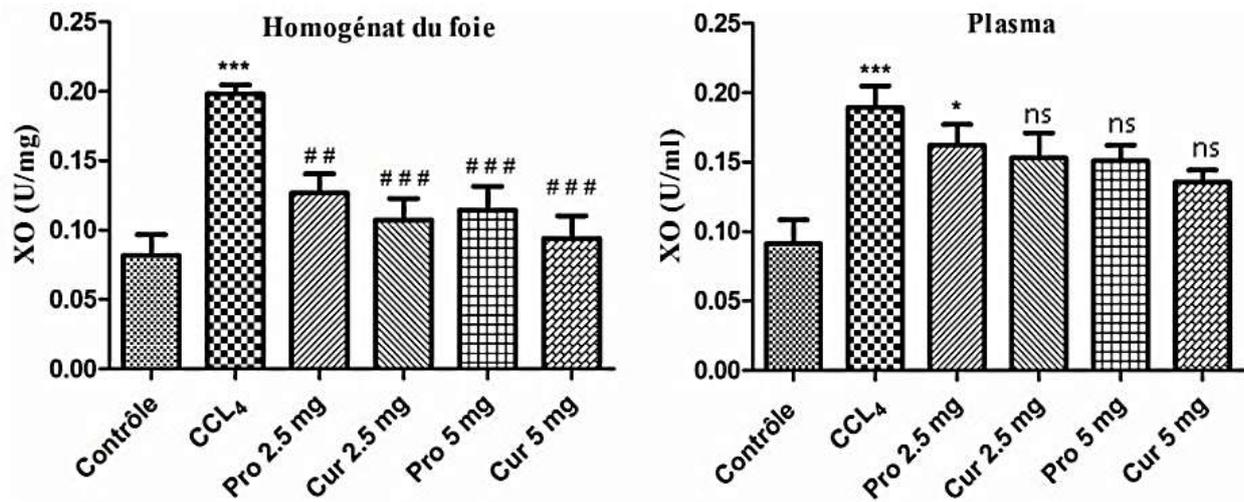
Traitement (mg/kg)	Plasma			
	Catalase (U/ml)	SOD (U/ml)	GSH ( $\mu\text{mol/ml}$ )	MDA (nmol/ml)
Contrôle	0.054 $\pm$ 0.004	1.12 $\pm$ 0.03	0.66 $\pm$ 0.07	0.97 $\pm$ 0.13
Pro 2.5 mg	0.066 $\pm$ 0.005 <sup>ns</sup>	1.08 $\pm$ 0.01 <sup>ns</sup>	0.58 $\pm$ 0.15 <sup>ns</sup>	1.51 $\pm$ 0.20 <sup>###</sup>
Pro 5 mg	0.066 $\pm$ 0.006 <sup>ns</sup>	1.21 $\pm$ 0.06 <sup>#</sup>	0.73 $\pm$ 0.09 <sup>ns</sup>	1.32 $\pm$ 0.36 <sup>###</sup>
Cur 2.5 mg	0.059 $\pm$ 0.004 <sup>ns</sup>	1.05 $\pm$ 0.04 <sup>ns</sup>	0.54 $\pm$ 0.04 <sup>ns</sup>	1.57 $\pm$ 0.12 <sup>###</sup>
Cur 5 mg	0.061 $\pm$ 0.002 <sup>ns</sup>	1.18 $\pm$ 0.04 <sup>ns</sup>	0.63 $\pm$ 0.09 <sup>ns</sup>	1.22 $\pm$ 0.23 <sup>###</sup>
CCl <sub>4</sub>	0.045 $\pm$ 0.008 <sup>ns</sup>	1.04 $\pm$ 0.02 <sup>ns</sup>	0.62 $\pm$ 0.08 <sup>ns</sup>	3.42 $\pm$ 0.43 <sup>***</sup>

Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM, (n = 7) ; \* :  $p \leq 0.05$ , \*\* :  $p \leq 0.01$ , \*\*\* :  $p \leq 0.001$  une différence significative par rapport au groupe contrôle des rats, ### :  $p \leq 0.001$  une différence significative par rapport au groupe traité avec le CCl<sub>4</sub>.

### 3.5. Effet de la thymoquinone sur l'activité xanthine oxydase

L'activité de la xanthine oxydase (XO) dans le cas de l'hépatotoxicité induite par CCl<sub>4</sub> est évaluée dans l'homogénat du foie et le plasma. Les résultats obtenus présentés dans la figure 25 et le tableau X montrent que l'hépatotoxicité est accompagnée par une augmentation significative de l'activité de la XO ( $p \leq 0.001$ ) par rapport à celle du groupe contrôle. Dans l'homogénat du foie, l'activité XO mesurée chez le groupe des rats traités avec le CCl<sub>4</sub> était de  $0.198 \pm 0.006$  U/mg de protéine, alors que celle du groupe contrôle était de  $0.082 \pm 0.015$  U/mg de protéine. De même, l'activité XO dans le plasma des rats traités avec le CCl<sub>4</sub> était de  $0.189 \pm 0.016$  U/ml par rapport à  $0.091 \pm 0.017$  U/ml du groupe contrôle.

Par ailleurs, les traitements prophylactique et curatif avec 2.5 et 05 mg/kg/jour de la TQ des rats intoxiqués par CCl<sub>4</sub> provoquent une diminution dose-dépendante de l'activité XO. Au niveau de l'homogénat du foie, le traitement curatif avec 05 mg/kg/jour a permis de maintenir l'activité de la XO à une valeur comparable à celle enregistrée chez le groupe contrôle ( $0.094 \pm 0.016$  U/mg de protéine par rapport à  $0.082 \pm 0.015$  U/mg de protéine). De même, les traitements prophylactique et curatif ont conduit à une diminution dose-dépendante de l'activité XO dans le plasma, mais elle reste supérieure à celle enregistrée chez le groupe contrôle. La meilleure diminution de l'activité XO est enregistrée avec le traitement curatif en utilisant 05 mg/kg/jour de la TQ qui a donné une activité de  $0.136 \pm 0.008$  U/ml par rapport à  $0.091 \pm 0.017$  U/ml du groupe contrôle.



**Figure 25 :** Effet de la TQ sur l'activité xanthine oxydase dans le cas de l'hépatotoxicité induite par CCl<sub>4</sub>. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM, (n = 7) ; \* : p ≤ 0.05, \*\*\* : p ≤ 0.001 une différence significative par rapport au groupe contrôle des rats, ## : p ≤ 0.01, ### : p ≤ 0.001 une différence significative par rapport au groupe traité avec le CCl<sub>4</sub>.

**Tableau X :** Effet de la TQ sur l'activité xanthine oxydase dans le cas de l'hépatotoxicité induite par CCl<sub>4</sub>.

Traitement	Homogénat	Plasma
	XO (U/mg de protéine)	XO (U/ml)
<b>Contrôle</b>	0.082 ± 0.015	0.091 ± 0.017
<b>Pro 2.5 mg</b>	0.127 ± 0.014 ##	0.162 ± 0.015 *
<b>Pro 5 mg</b>	0.114 ± 0.017 ###	0.151 ± 0.011 ns
<b>Cur 2.5 mg</b>	0.107 ± 0.016 ###	0.153 ± 0.018 ns
<b>Cur 5 mg</b>	0.094 ± 0.016 ###	0.136 ± 0.008 ns
<b>CCl<sub>4</sub> seul</b>	0.198 ± 0.006 ***	0.189 ± 0.016 ***

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM, (n = 7) ; \* : p ≤ 0.05, \*\*\* : p ≤ 0.001 une différence significative par rapport au groupe contrôle des rats, ## : p ≤ 0.01, ### : p ≤ 0.001 une différence significative par rapport au groupe traité avec le CCl<sub>4</sub>.

L'hépatotoxicité induite par CCl<sub>4</sub> est largement utilisée comme modèle d'étude des lésions hépatiques expérimentales chez le rat (Chopra *et al.*, 1972), du fait que le foie est le principal site de sa biotransformation. Ce modèle d'hépatotoxicité est le résultat de la déshalogénéation réductrice dépendante du cytochrome P<sub>450</sub> (McCay *et al.*, 1984), pendant lequel le CCl<sub>4</sub> induit des lésions hépatiques chez le rat suite à sa biotransformation par le système du cytochrome P<sub>450</sub> en trichlorométhyl (CCl<sub>3</sub>•). C'est un radical libre hautement réactif, qui réagit rapidement avec l'oxygène moléculaire pour produire le trichlorométhylperoxyl (CCl<sub>3</sub>O<sub>2</sub>•). Ces radicaux hautement toxiques peuvent réagir avec les macromolécules cellulaires ; protéines, ADN et lipides membranaires puis induire l'oxydation des acides gras insaturés des phospholipides présents dans la membrane cellulaire, entraînant une peroxydation lipidique au niveau des membranes des

hépatocytes (Recknagel *et al.*, 1989 ; Weber *et al.*, 2003), perturbant ainsi l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  qui provoquent la destruction des cellules hépatiques (Jaeschke, 2011).

Cette étude est la première à déterminer l'effet hépatoprotecteur associé à l'effet hépatocuratif de la TQ contre la toxicité induite par  $\text{CCl}_4$ . La toxicité induite par  $\text{CCl}_4$  est estimée par l'évaluation des paramètres biochimiques (hépatiques, rénaux et lipidiques), des études histologiques du foie et des reins, des marqueurs du stress oxydant (SOD, CAT, GSH et MDA) et par l'évaluation de l'activité xanthine oxydase.

Les résultats obtenus montrent que l'hépatotoxicité induite par  $\text{CCl}_4$  a permis d'enregistrer une augmentation significative des taux sériques des paramètres biochimiques hépatiques : ASAT, ALAT et PAL de 16.42, 22.87 et 1.70 fois, respectivement. Cette augmentation des transaminases intracellulaires est un indicateur de la fragilité de la membrane plasmique des hépatocytes responsable de l'élévation de leur taux plasmatique (Lin *et al.*, 2008 ; Kumawat *et al.*, 2012 ; Hurkadale *et al.*, 2012) En outre, l'augmentation significative de l'ALAT constitue le meilleur paramètre pour détecter les lésions hépatiques lors des atteintes aiguës (Fiedman et Keefe, 2004 ; Nkosi *et al.*, 2005). L'augmentation du taux sérique de la PAL qui est normalement libérée dans la bile peut être expliquée par l'obstruction des voies biliaires (Girish et Pradhan, 2012) ou également par les lésions tissulaires (Farida *et al.*, 2012). En effet, l'augmentation de l'activité des enzymes hépatiques peut être expliquée par une perturbation accrue des fonctions hépatiques associées aux détériorations tissulaires (Abirami *et al.*, 2015).

Une augmentation significative du taux plasmatique des triglycérides et du cholestérol est observée chez les rats traités avec le  $\text{CCl}_4$ . Elle pourrait être expliquée par la présence de perturbations des mécanismes d'association des triglycérides avec l'apoprotéine appropriée pour former la molécule porteuse (lipoprotéine) (Tiwari *et al.*, 2014 ; Shanmugam *et al.*, 2016). De même, le taux d'urée augmenté sous l'effet de  $\text{CCl}_4$  explique un catabolisme accru des protéines et/ou un problème de sécrétion au niveau des hépatocytes (de Andrade Belo *et al.*, 2012 ; Shakya *et al.*, 2012). En effet, Saba et ses collaborateurs (2010) ont démontré que l'augmentation du taux de l'urée et de la créatinine est due à l'activation du catabolisme des protéines au cours de l'hépatotoxicité.

Les résultats de la présente étude (Bilan hépatique, rénal et lipidique) sont en accord avec d'autres études précédentes qui ont montré que l'intoxication hépatique avec le  $\text{CCl}_4$  induit une augmentation des taux sériques des transaminases hépatiques (ASAT et ALAT) et de la phosphatase alcaline (PAL) (Naziroglu *et al.*, 1999 ; AL-Shabanah *et al.*, 2000 ; Teocharis *et al.*, 2001 ; Brai *et al.*, 2014).

Le traitement prophylactique ou curatif des rats avec la TQ montre une diminution significative des enzymes hépatiques, dont l'effet hépatocuratif est le plus efficace car il a diminué le taux des enzymes hépatiques à des niveaux comparables aux valeurs normales. Ceci est une indication de l'intégrité de la membrane plasmique et de la réparation des lésions tissulaires hépatiques causées par CCl<sub>4</sub>. Les résultats obtenus sont concordés avec ceux de Manssour et ses collaborateurs (2001), qui ont montré que le prétraitement avec la TQ (12.5 mg/kg) des souris intoxiquées par CCl<sub>4</sub> a diminué significativement l'activité des enzymes hépatiques. De même, Nagi et ses collaborateurs ont démontré en 1999 que l'administration de 100 mg/kg immédiatement avant l'administration du CCl<sub>4</sub> a protégé les hépatocytes. Daba et Abdel-Rahman (1998) ont montré également que le traitement des hépatocytes isolés intoxiqués par TBHP a diminué significativement l'activité des enzymes hépatiques.

De même, le traitement prophylactique et curatif avec la TQ a permis de restaurer le taux plasmatique des triglycérides, du cholestérol et de l'urée. Dans la littérature il n'ya pas des études menées sur l'effet de la TQ sur ces paramètres à l'exception de celle de Aycan et ses collaborateurs (2015) qui ont montré que la TQ induit la diminution du taux plasmatique de l'urée dans un modèle de néphrotoxicité induite par l'acétaminophène.

L'évaluation histopathologique a révélé des lésions histologiques significatives dans le tissu hépatique des rats traités avec le CCl<sub>4</sub> telles que la stéatose, qui est expliquée par l'accumulation des triglycérides dans les hépatocytes, le stress oxydant et les anomalies du métabolisme des acides gras peuvent également participer à cette pathologie (Pol, 2009 ; Upadhyay *et al.*, 2010). Deux formes de stéatoses hépatiques peuvent être distinguées ; la stéatose microvésiculaire et la stéatose macrovésiculaire. La stéatose microvésiculaire caractérisée par la présence de nombreuses microvésicules lipidiques dans le cytoplasme des hépatocytes. Ces gouttelettes sont de taille inférieure à celle du noyau. La stéatose macrovésiculaire, lorsque les gouttelettes lipidiques à l'intérieur des hépatocytes grandissent. La stéatose microvésiculaire est le résultat de l'inhibition importante de la dégradation des lipides par la  $\beta$ -oxydation mitochondriale (El-Badry *et al.*, 2007 ; Yerian, 2012). Par contre la stéatose macrovésiculaire est le résultat de l'inhibition modérée de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale et de l'augmentation de la synthèse *de novo* de lipides et une diminution de l'export des triglycérides par une altération de la sécrétion de VLDL (Fromenty *et al.*, 2003).

La nécrose hépatocytaire est expliquée par la cytolysse des hépatocytes et la destruction membranaire. En effet, Ward et Daly (1999) ont montré que l'augmentation importante (10 fois par rapport aux valeurs normales) des transaminases reflète une cytolysse hépatique.

Les résultats de l'étude histologique du foie obtenus dans le présent travail sont concordés avec les rapports précédents sur l'hépatotoxicité induite par CCl<sub>4</sub> (Boll *et al.*, 2001 ; Brai *et al.*, 2014). Le prétraitement par la TQ améliore significativement l'architecture du foie. Les animaux traités avec la TQ selon un procédé curatif présentent une structure du tissu hépatique similaire à celle des rats normaux. Ces résultats sont en faveur d'effet hépatocuratif significatif. Cependant, Une amélioration moins significative des lésions hépatiques provoquées par le CCl<sub>4</sub> est observée suite au traitement prophylactique. Ces résultats suggèrent un effet hépatoprotecteur modéré de la TQ.

L'évaluation quantitative des taux plasmatiques des enzymes hépatiques, associée à l'examen histologique des hépatocytes fournissent une bonne évaluation des lésions hépatiques provoquées par CCl<sub>4</sub> ou de la régénération fournit par le traitement avec la TQ. On suppose que l'activité antioxydante de la TQ a bloquée l'effet des radicaux libres libérés suite à la biotransformation du CCl<sub>4</sub> provoquant la peroxydation lipidique et donc la fragilité membranaire des hépatocytes (Aycan *et al.*, 2014). L'effet scavenger des radicaux libres et l'inhibition de la peroxydation lipidique (Houghton *et al.*, 1995 ; Nagi et Mansour, 2000 ; Manssour *et al.*, 2001), l'effet anti-inflammatoire de la TQ via la prévention de la génération des eicosanoïdes, tels que le thromboxane B2 et le leucotriène B4 (Houghton *et al.*, 1995 ; Nagi *et al.*, 1999) pourraient être des facteurs contribuant à ses effets hépatoprotecteurs et hépatocuratifs possibles. L'effet hépatoprotecteur de la TQ peut être également expliqué par son effet inhibiteur vis-à-vis du cytochrome P<sub>450</sub>, comme il pourrait être rendu à sa transformation en thymohydroquinone et glutathionyl-hydrothymoquinone dans le foie. Ces derniers sont connus par leur pouvoir antioxydant et anti-inflammatoire (Khalife et Lupidi, 2007).

Les résultats de l'évaluation des marqueurs du stress oxydant montrent que l'intoxication des rats avec le CCl<sub>4</sub> a conduit à une diminution de la CAT, la SOD et le GSH, alors qu'une augmentation hautement significative du taux de MDA est enregistrée au niveau de l'homogénat et du plasma. L'augmentation du MDA reflète un puissant stress oxydant qui conduit à des lésions tissulaires et une défaillance des mécanismes de défense antioxydante. Le MDA est considéré comme un marqueur de la peroxydation des lipides. De plus la diminution de l'activité de ces enzymes est à l'origine de l'augmentation de la lipoperoxydation dont le produit final est le MDA. Ce dernier provoque la perte de la fluidité et de l'intégrité membranaire et finalement la perte des fonctions des hépatocytes (Halliwell, 2001).

Les résultats de la présente étude montrent que le taux du MDA hépatique et plasmatique a diminué de façon significative suite au traitement curatif et prophylactique avec la TQ. Ces résultats révèlent que la TQ peut protéger le foie contre la toxicité du CCl<sub>4</sub>. Cette protection pourrait être due à l'inhibition de la peroxydation lipidique (Goel *et al.*, 2005). Les résultats

concordent avec ceux de Nagi et ses collaborateurs (1999) et Nili-Ahmadabadi et ses collaborateurs (2011) qui ont montré une diminution significative du MDA suite au traitement avec la TQ dans le cas de l'hépatotoxicité induite par CCl<sub>4</sub> chez le rat.

L'activité de la catalase et celle de la SOD sont diminuées après l'intoxication des rats par CCl<sub>4</sub>. Les radicaux libres produits au cours de la biotransformation du CCl<sub>4</sub> inactivent l'expression des enzymes antioxydantes, en réduisant les taux d'enzymes antioxydantes conduisant à un stress oxydant, responsable de la totalité des lésions hépatiques (Singh *et al.*, 2015). Cette diminution de l'activité des enzymes antioxydantes est à l'origine de l'augmentation de la peroxydation lipidique traduite par l'augmentation du MDA. Le taux du GSH est diminué suite à l'intoxication des rats par CCl<sub>4</sub>. Cette diminution peut être expliquée par son oxydation par les radicaux libres libérés lors de la biotransformation du CCl<sub>4</sub> et la peroxydation lipidique (Jackson *et al.*, 2004).

Le traitement curatif et prophylactique des rats a permis de restaurer l'activité de la CAT et de la SOD. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés auparavant par Manssour et ses collaborateurs (2001) et EL-Tawil et Moussa (2006) qui ont montré que le CCl<sub>4</sub> induit une diminution du GSH avec une augmentation du MDA, alors que le traitement avec la TQ a permis de restaurer le taux du GSH et du MDA à des valeurs similaires à celles du groupe contrôle. Les résultats sont également en accord avec ceux de Zafeer et ses collaborateurs (2012) et Al-Malki et Sayed (2014) qui ont montré que la TQ restaure l'activité de la CAT, de la SOD et du GSH dans le cas de l'hépatotoxicité induite par le cadmium et le Cisplatine, respectivement. De même Fouda et ses collaborateurs (2008) ont montré que la TQ exerce un effet hépatoprotecteur contre la toxicité induite par la cyclophosphamide. Suddek (2014) a montré l'efficacité de la TQ contre l'hépatotoxicité induite par le tamoxifen chez les rats femelles.

L'évaluation de l'activité Xanthine oxydase dans le cas de l'hépatotoxicité est effectuée pour la première fois dans le présent travail. Les résultats obtenus que ce soit dans l'homogénat ou dans le plasma révèlent une augmentation significative de la XO suite à l'intoxication des rats par le CCl<sub>4</sub>. Cela peut être expliqué par la transformation du XOR en XO. Une fois la XOR est libérée dans le plasma, elle est rapidement convertie en forme oxydase XO génératrice potentielle des espèces réactives de l'oxygène (Martín *et al.*, 2004)

Au cours de l'inflammation, la XOR est activée par différents médiateurs inflammatoires, tels que le TNF- $\alpha$  et l'IL-1, qui provoquent la conversion de la XDH en XO (Harrison, 2002 ; Meneshian et Bulkley, 2002 ; Batteli *et al.*, 2014b). Les neutrophiles activés causent également une conversion irréversible de la forme XDH en forme XO dans les cellules endothéliales (Richard *et al.*, 2007).

Le traitement curatif et prophylactique a permis de diminuer significativement l'activité XO. Cet effet pourrait être expliqué par l'effet antioxydant et anti-inflammatoire de la TQ. Ce dernier peut

être rendu à son effet sur les cytokines interviennent dans l'activation de la conversion de la XDH en XO. En effet, Al-Malki et Sayed (2014) ont montré que la TQ induit la réduction du TNF- $\alpha$ , l'IL-1 dans un modèle d'hépatotoxicité induite par le Cisplatine.

Finalement, on peut déduire que la TQ possède un effet hépatocuratif significatif, sans oublier son effet hépatoprotecteur important. Cela pourrait être rendu à son effet antioxydant, soit par son effet scavenger des radicaux libres, inhibiteur de la peroxydation lipidique et par sa capacité d'induire une régulation positive du système antioxydant (CAT, SOD et GSH) qui ont subi une défaillance suite au stress oxydant lors de l'hépatotoxicité induite par le CCl<sub>4</sub> chez le rat. Les effets hépatoprotecteur et hépatocuratif peuvent être rendus également à l'effet anti-inflammatoire de la TQ démontré dans plusieurs études. La régulation négative de l'activité xanthine oxydase peut être impliquée dans l'effet hépatoprotecteur et hépatocuratif le fait que la XO génère des ERO.

## **4. Effet de la thymoquinone sur l'arthrite rhumatoïde**

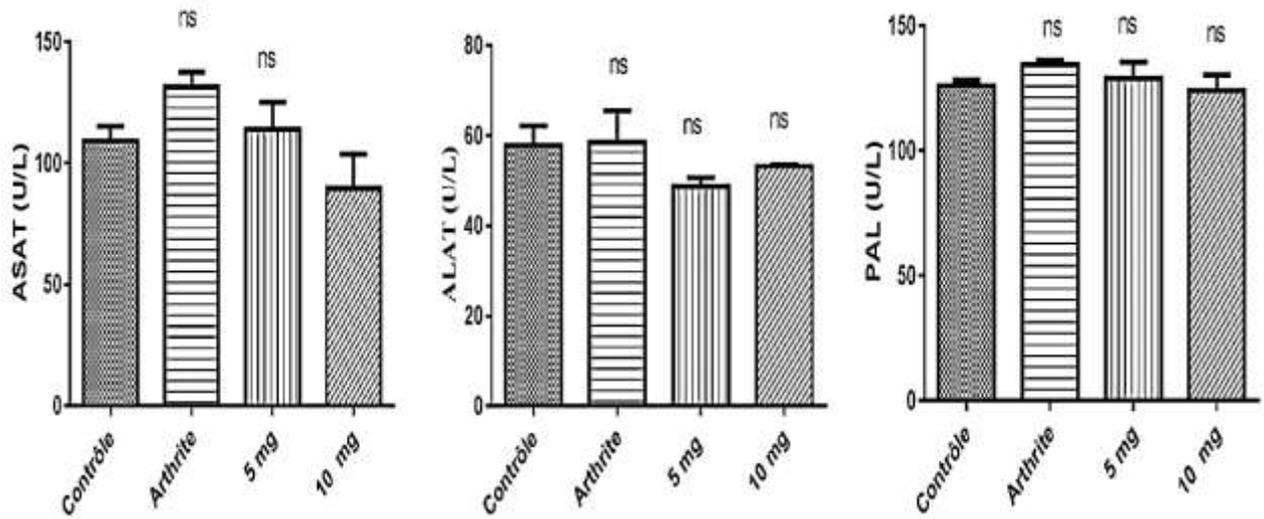
### **4.1. Etude de l'hépatotoxicité et la néphrotoxicité**

L'hépatotoxicité et la néphrotoxicité des doses testées sont évaluées par le dosage des marqueurs d'intégrité hépatique (ASAT, ALAT et PAL) et rénale (urée et créatinine) ainsi que par l'étude histologique du foie, des reins et de la rate.

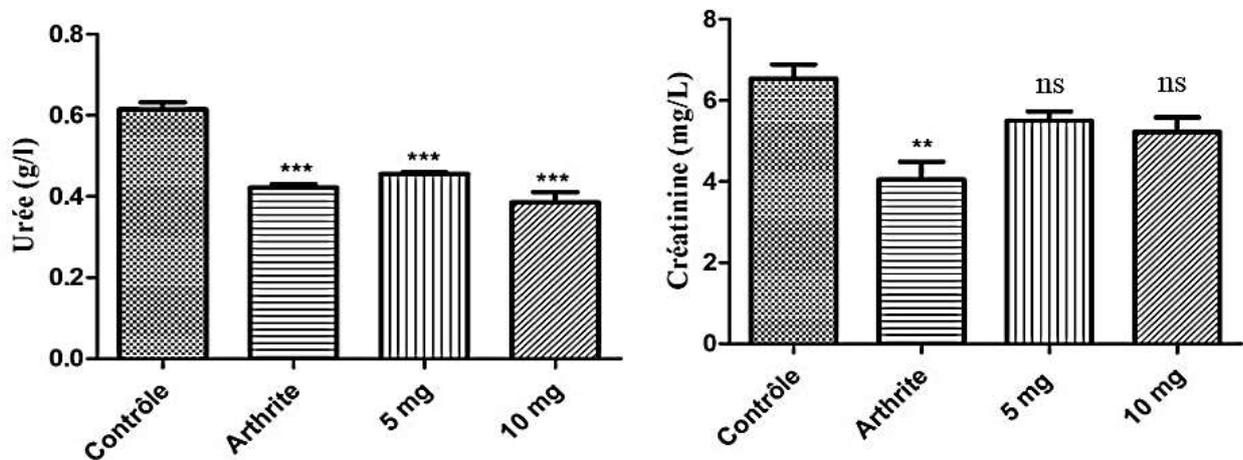
#### **4.1.1. Etude des paramètres biochimiques**

Le dosage des marqueurs d'intégrité hépatique et rénal montre que le bilan hépatique, soit le taux des marqueurs hépatiques ALAT, ASAT, et PAL révèlent l'absence de l'hépatotoxicité, du fait qu'il n'ya aucune variation significative observée chez les différents groupes expérimentaux (figure 26 et tableau XI).

Cependant, le bilan rénal, en termes du taux de l'urée et de la créatinine, présente une diminution significative chez les rats arthritiques ( $p \leq 0.001$  et  $p \leq 0.01$ , respectivement) par rapport au groupe contrôle. Le traitement avec la TQ en utilisant 05 et 10 mg/kg de la TQ pendant 40 jours a montré une augmentation dose-dépendante de la créatinine (Créat) alors que le taux plasmatique de l'urée n'a pas été amélioré par rapport au groupe des rats arthritiques (figure 27 et tableau XI).



**Figure 26 :** Bilan hépatique (ASAT, ALAT et PAL) des groupes des rats arthritiques en présence et en absence de la Thymoquinone par rapport au groupe contrôle. Chaque valeur est représentée en tant que moyen  $\pm$  SEM.



**Figure 27 :** Bilan rénal des groupes des rats arthritiques en présence et en absence de la Thymoquinone par rapport au groupe contrôle. Chaque valeur est représentée en tant que moyen  $\pm$  SEM. \*\*:  $p \leq 0.01$  et \*\*\*:  $p \leq 0.001$ .

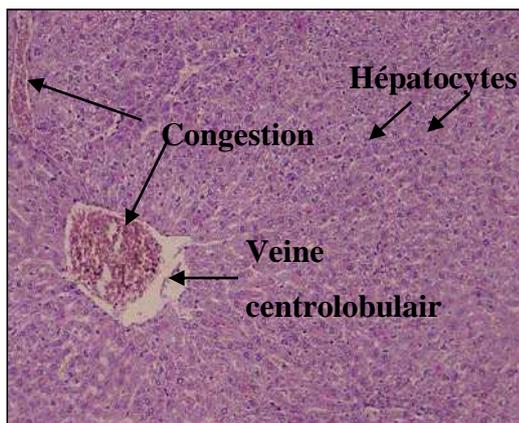
**Tableau XI :** Bilan hépatique et rénal des groupes des rats arthritique traités et non traités avec la Thymoquinone par rapport au groupe de rats normaux.

Traitement	ASAT (U/L)	ALAT (U/L)	PAL (U/L)	Urée (g/L)	Créat (mg/L)
<b>Contrôle</b>	109 $\pm$ 6.01	57.8 $\pm$ 4.39	126 $\pm$ 4.00	0.61 $\pm$ 0.02	6.53 $\pm$ 0.35
<b>Arthrite</b>	132 $\pm$ 5.87 <sup>ns</sup>	58.6 $\pm$ 7.00 <sup>ns</sup>	134.6 $\pm$ 2.70 <sup>ns</sup>	0.42 $\pm$ 0.01 <sup>***</sup>	4.05 $\pm$ 0.44 <sup>**</sup>
<b>TQ (5 mg/kg)</b>	114 $\pm$ 11.0 <sup>ns</sup>	48.8 $\pm$ 1.94 <sup>ns</sup>	129 $\pm$ 11.31 <sup>ns</sup>	0.46 $\pm$ 0.01 <sup>***</sup>	5.49 $\pm$ 0.24 <sup>ns</sup>
<b>TQ (10mg/kg)</b>	89.7 $\pm$ 14 <sup>ns</sup>	53.20 $\pm$ 0.40 <sup>ns</sup>	124 $\pm$ 11.19 <sup>ns</sup>	0.38 $\pm$ 0.03 <sup>***</sup>	5.22 $\pm$ 0.36 <sup>ns</sup>

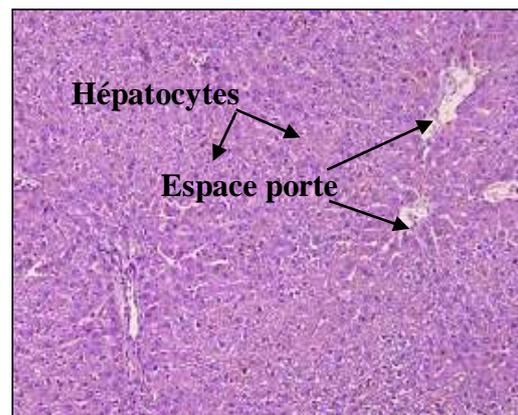
Chaque valeur est représentée en tant que moyen  $\pm$  SEM. \*\*  $p \leq 0.01$  et \*\*\*:  $p \leq 0.001$ .

### 4.1.2. Etude histologique

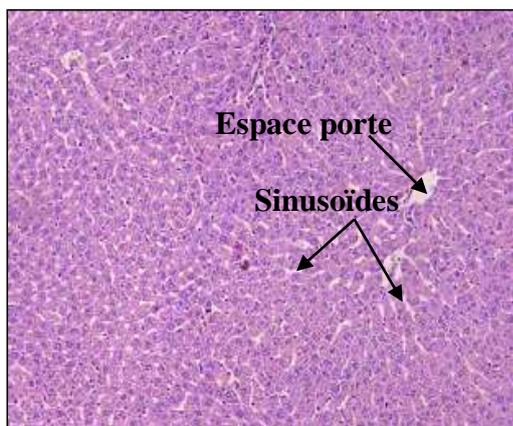
Sur le plan histologique, les doses utilisées de la TQ ne présentent aucun signe de toxicité, ni au niveau hépatique ni rénal ni splénique, ce qui se manifeste par l'absence de lésions tissulaires et de changement structurel par rapport au groupe contrôle, à l'exception d'une discrète congestion non pathologique enregistrée à la fois chez les rats arthritiques et traités avec la TQ. Ceci suggère qu'il n'y a pas d'altération fonctionnelle liée aux changements structuraux du tissu (figures 28, 29 et 30 respectivement). Concernant les coupes histologiques de la rate, les résultats montrent une hyperplasie folliculaire chez les rats du groupe arthritique, une hyperplasie moindre au niveau des follicules lymphoïdes est enregistrée chez les rats traités avec la TQ.



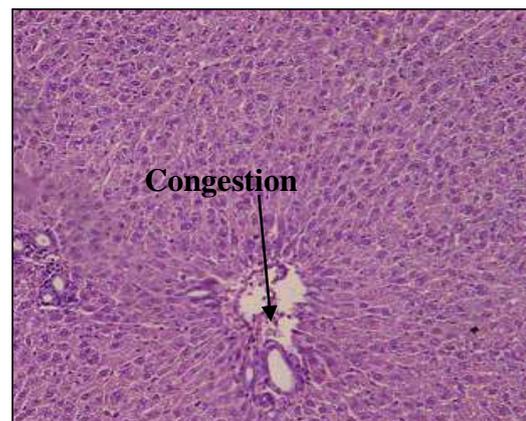
A : Arthritiques



B : Contrôle

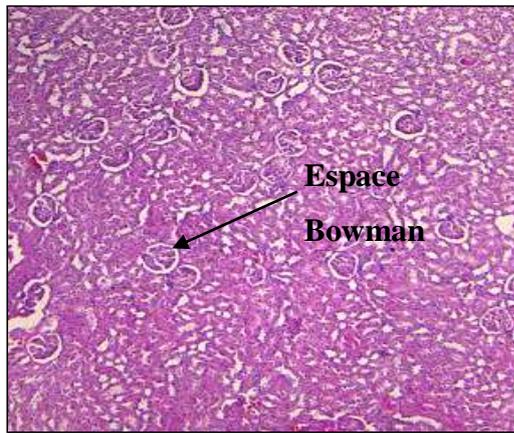


C : 05 mg/kg

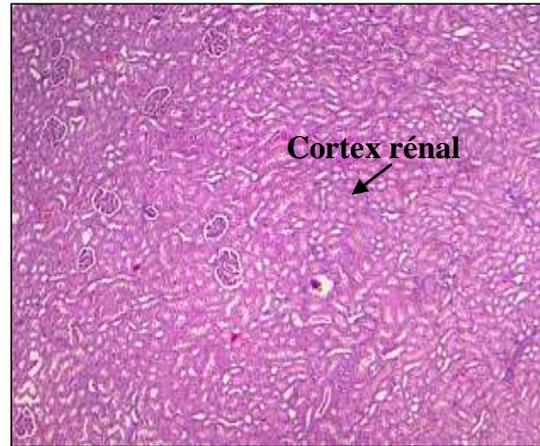


D : 10 mg/kg

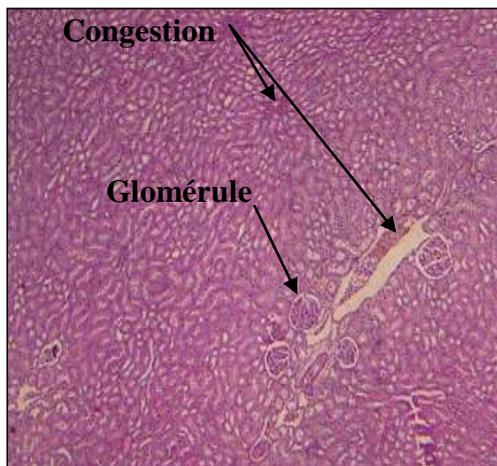
**Figure 28** : Coupes histologiques du foie des rats ; A : groupe arthritique, Congestion. B : rats normaux, tissu hépatique normal, C : Rats arthritiques traités avec 05 mg/kg/jour, tissu hépatique conservé. D : Rats arthritiques traités avec 10 mg/kg/jour, tissu hépatique conservé.



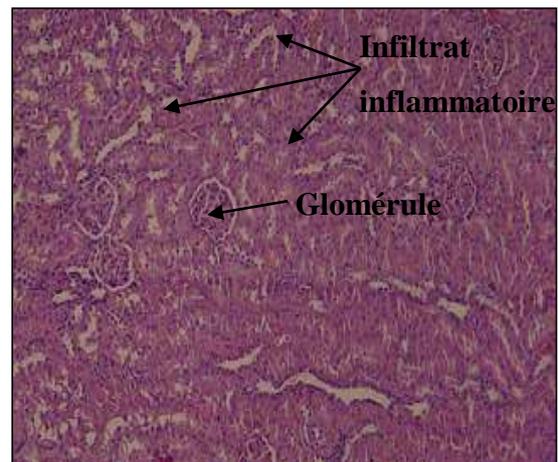
(A)



(B)

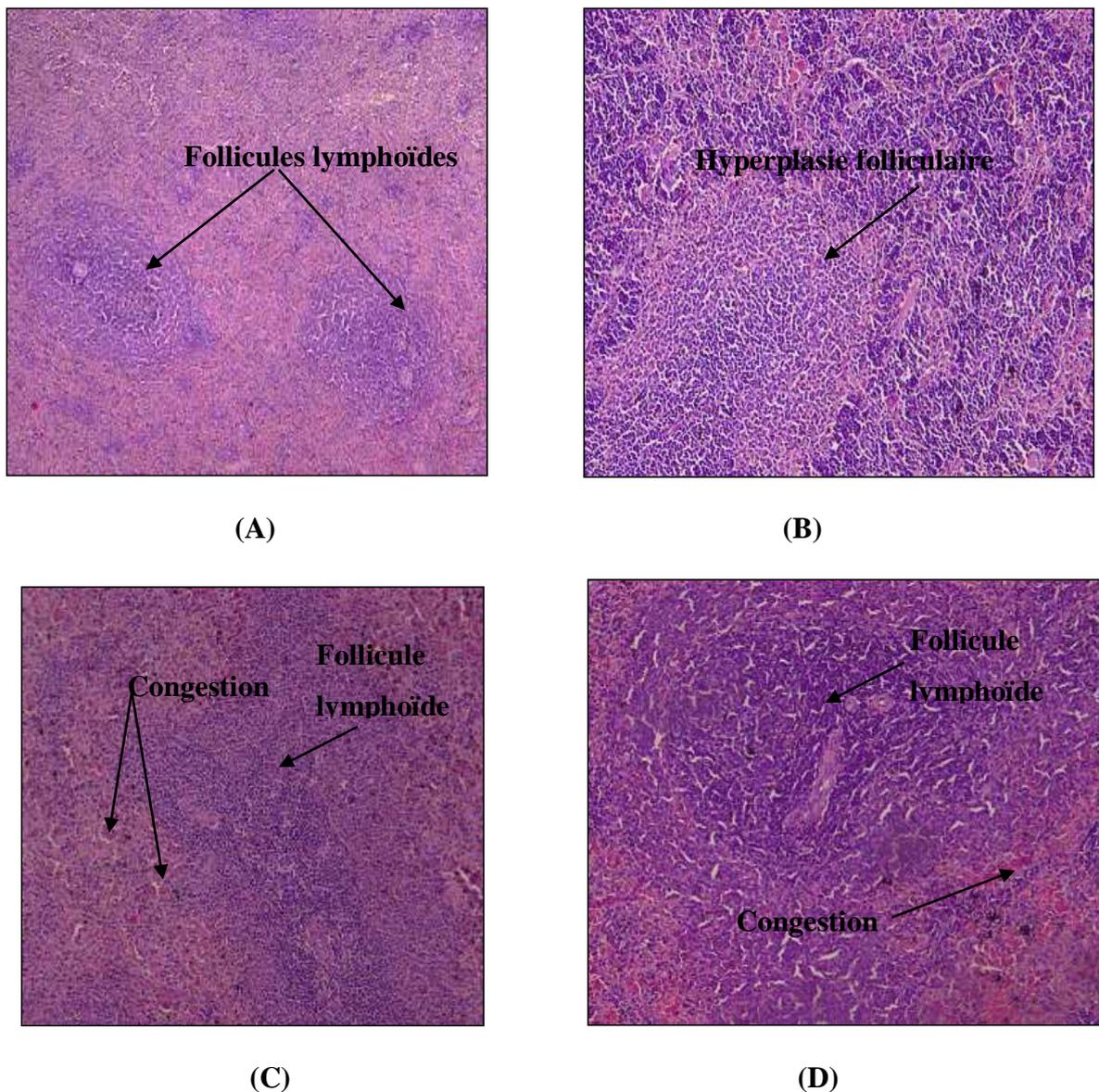


(C)



(D)

**Figure 29** : Coupes histologiques des reins des rats ; A : Rats arthritique, Congestion. B : Rats normaux tissu rénal normal. C : Rats arthritique traités avec 05 mg/kg/jour, Congestion. D : Rats arthritiques traités avec 10 mg/kg/jour, congestion et infiltrat inflammatoire.



**Figure 30** : Coupes histologiques de la rate des rats ; A : Normaux. B : arthritique, une hyperplasie splénique importante. C : Arthritique traités avec 05 mg/kg/jour, congestion et hyperplasie folliculaire modérée. D : Arthritique traités avec 10 mg/kg/jour, congestion et hyperplasie moindre.

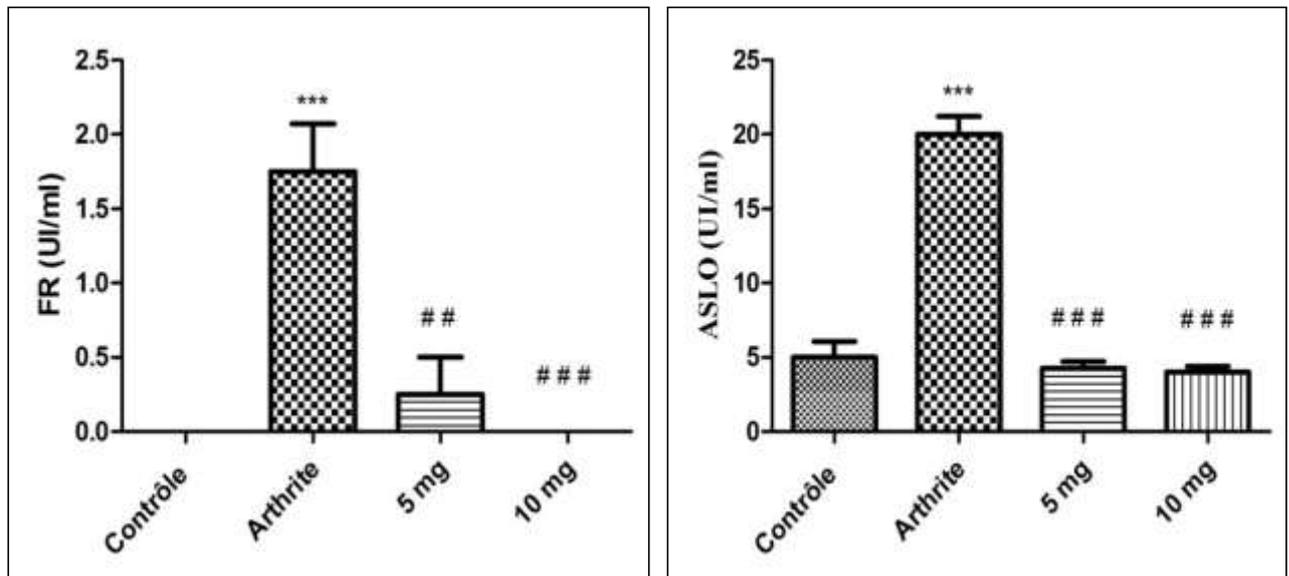
## 4.2. Evolution de l'arthrite induite chez le rat

### 4.2.1. Taux plasmatique des marqueurs de l'inflammation

Pour diagnostiquer l'inflammation au cours l'arthrite rhumatoïde, le taux plasmatique des facteurs rhumatoïdes et des ASLO a été déterminé. Le dosage qualitatif et quantitatif de la CRP et la détermination de la formule et numération sanguine (FNS) ont été également effectués. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 31.

L'arthrite rhumatoïde est accompagnée par une augmentation significative ( $p \leq 0.001$ ) des facteurs rhumatoïdes (FR) et des ASLO, en comparaison avec le groupe contrôle. Les résultats de dosage qualitatif et quantitatif de la CRP étaient négatifs. Le traitement des rats avec la TQ a permis de restaurer le taux de ces paramètres à un niveau similaire à celui enregistré chez les rats du groupe

contrôle. Les résultats de la formule et numération sanguine ont montré une augmentation significative ( $p \leq 0.05$ ) des globules blancs (GB), les plaquettes (PLT) et les lymphocytes (LYM). Une augmentation hautement significative ( $p \leq 0.01$ ) des granulocytes (GRAN), MID et MID% est enregistrée chez les rats arthritiques en comparaison avec les rats du groupe contrôle normal. Cependant, le traitement avec la TQ pendant 40 jours a diminué ces paramètres d'une manière dose-dépendante, dont le traitement avec 10 mg/kg/jour a permis de les restaurer et maintenir à des valeurs similaires aux celles du groupe contrôle (Tableau XII).



**Figure 31** : Taux plasmatique des facteurs rhumatoïdes (FR) et l'ASLO des rats arthritiques et traités. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM, (n = 7) ; \*\*\* :  $p \leq 0.001$  une différence significative par rapport le groupe de rats contrôle, ### :  $p \leq 0.001$  une différence significative par rapport le groupe des rats arthritiques.

**Tableau XII :** Effet de la thymoquinone sur la formule et numération sanguine (FNS).

Paramètres	Contrôle	Arthrite	5 mg	10 mg
<b>GR (1012/L)</b>	8.0 ± 0.28	7.12 ± 1.44	7.23 ± 0.70	7.71 ± 0.81
<b>VGM</b>	53.36 ± 2.07	51.54 ± 2.21	52.55 ± 1.77	52.56 ± 1.77
<b>IDR%</b>	15.04 ± 0.53	17.59 ± 1.50	16.28 ± 1.14	15.90 ± 0.5
<b>IDRa</b>	35.40 ± 1.76	37.13 ± 3.2	36.27 ± 2.6	35.68 ± 1.09
<b>HCT (%)</b>	42.62 ± 1.26	36.44 ± 6.48	37.97 ± 3.63	40.28 ± 2.78
<b>PLT (10<sup>9</sup>/L)</b>	524.60 ± 43.92	700 ± 39.8 *	675.7 ± 49.8	666.60 ± 102.60
<b>VPM</b>	6.30 ± 0.2	6.20 ± 0.23	6.02 ± 0.16	6.20 ± 0.13
<b>IDP</b>	9.14 ± 0.25	9.04 ± 0.29	8.83 ± 0.21	9.02 ± 0.19
<b>PTC (%)</b>	0.33 ± 0.03	0.43 ± 0.04	0.44 ± 0.13	0.41 ± 0.05
<b>LPCR (%)</b>	5.42 ± 0.54	4.70 ± 1.37	4.13 ± 0.67	4.56 ± 0.67
<b>GB (10<sup>9</sup>/L)</b>	7.30 ± 0.88	10.39 ± 1.59 *	9.30 ± 9.30	7.08 ± 1.21 ##
<b>HGB (g/dl)</b>	14.52 ± 0.38	12.2 ± 2.2	13.0 ± 1.2	14.0 ± 1.00
<b>TCMH (pg)</b>	18.2 ± 0.5	17.4 ± 0.6	17.9 ± 0.3	18.3 ± 0.6
<b>CCMH (g/dl)</b>	34.1 ± 0.4	33.8 ± 0.4	34.1 ± 0.8	34.8 ± 0.2
<b>LYM (10<sup>9</sup>/L)</b>	5.4 ± 0.7	6.5 ± 1.3 *	6.1 ± 1.2	5.2 ± 0.9 ##
<b>GRAN (10<sup>9</sup>/L)</b>	1.1 ± 0.2	2.4 ± 0.5 **	2.0 ± 0.5	1.1 ± 0.2 ##
<b>MID (10<sup>9</sup>/L)</b>	0.7 ± 0.1	1.4 ± 0.3 **	1.2 ± 0.3	0.8 ± 0.2 ##
<b>LYM%</b>	74.4 ± 3	62.7 ± 5.4	65.8 ± 8	73.5 ± 3.1
<b>GRA %</b>	16.6 ± 2.7	24.3 ± 5.2	22.2 ± 6.2	16.3 ± 2.4
<b>MID%</b>	9.0 ± 0.9	12.9 ± 1.5 *	12.0 ± 2.1	10.2 ± 0.9

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM, (n = 7) ; \* : p ≤ 0.05, \*\* : p ≤ 0.01 une différence significative par rapport aux rats du groupe contrôle, ## : p ≤ 0.01 une différence significative par rapport le groupe des rats arthritiques.

### 4.2.2. Evolution du score arthritique

Le score arthritique est utilisé pour suivre l'évolution du gonflement des pattes du rat. C'est un paramètre qui décrit l'inflammation des différentes articulations des pattes de l'animal, en fonction du temps mis pour développer les signes cliniques de l'inflammation (gonflement) au niveau des pattes postérieures et antérieures des différents groupes expérimentaux. C'est la manière élaborée

pour valider ce modèle de l'arthrite expérimentale chez le rat. La figure 32 présente l'évolution du score total, soit le score moyen des différents rats du groupe. Le score arthritique des pattes postérieures est présenté indépendamment de celui des pattes antérieures.

Concernant les pattes postérieures, les résultats montrent que les premiers signes de l'arthrite ont débuté le 14<sup>ème</sup> jour chez les rats du groupe arthritique (malades non traités) ( $n = 7$ ). Le meilleur score arthritique de ce groupe était de  $36 \pm 3$  articulations dans les deux pattes (on écrit  $36 \pm 3/2$  pattes). Ce score est enregistré le 28<sup>ème</sup> jour. Puis, il a diminué avec le temps jusqu'à avoir un score de  $21 \pm 3/2$  pattes au 40<sup>ème</sup> jour. Cette diminution est accompagnée par une augmentation de la rigidité et la déformation des pattes.

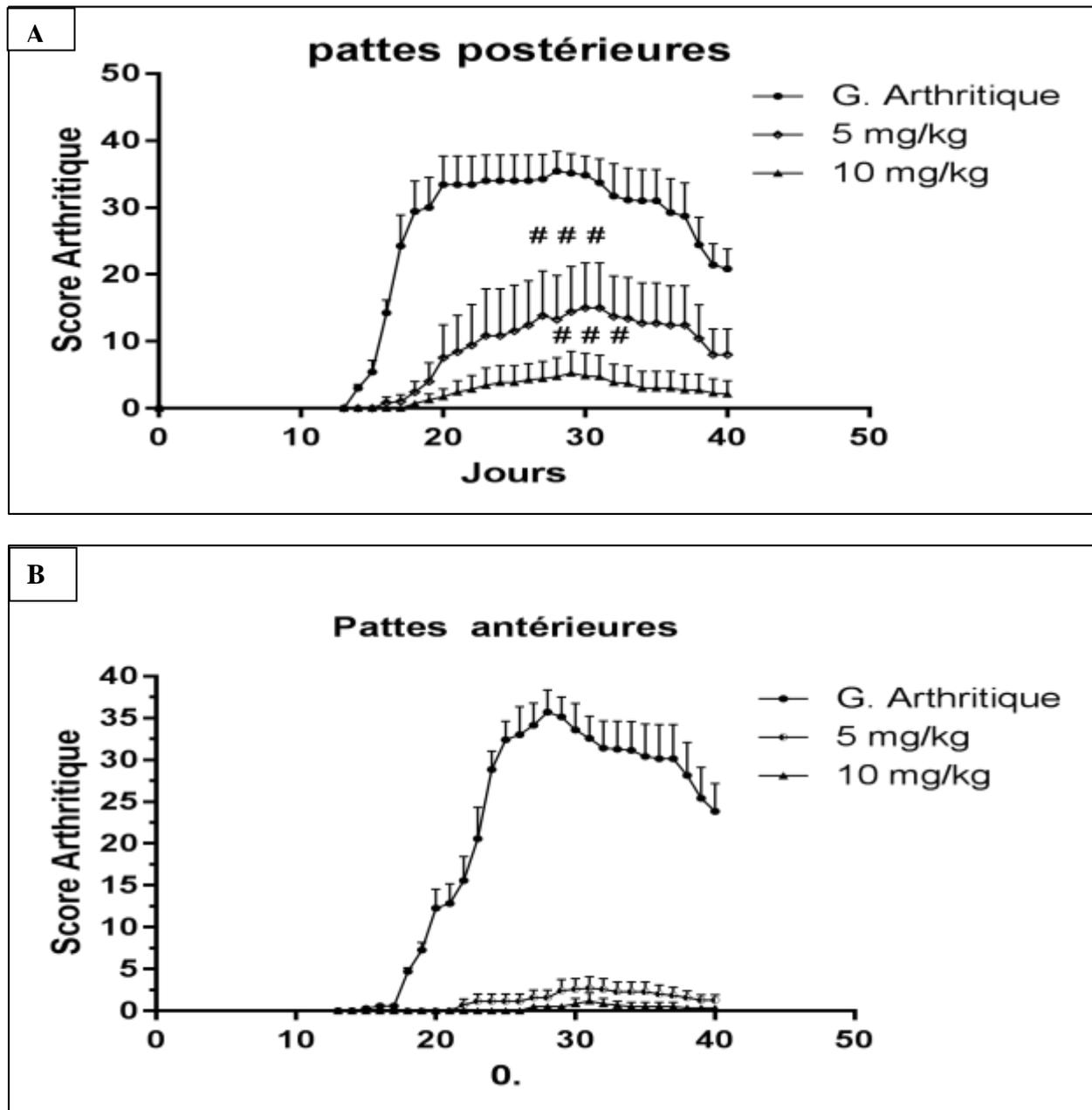
Le traitement des rats avec la TQ a permis de provoquer une diminution hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) du score arthritique, en comparaison avec celui du groupe arthritique, cette diminution était dose-dépendante. Les rats traités avec 05 mg/kg/jour ont manifesté un retard dans l'apparition des premiers signes de l'inflammation articulaire, ces signes ont été observés au 16<sup>ème</sup> jour. Le score arthritique a évolué avec le temps jusqu'à atteindre la valeur de  $15 \pm 7/2$  pattes au 30<sup>ème</sup> jour. Puis, ce score arthritique a diminué avec le temps jusqu'à avoir une valeur de  $8 \pm 4/2$  pattes, le 40<sup>ème</sup> jour.

De même, le traitement des rats avec 10 mg/kg/jour a permis d'enregistrer un retard dans l'apparition des premiers signes de l'inflammation articulaire, qui sont observés le 18<sup>ème</sup> jour. Par la suite, le score arthritique a évolué avec le temps jusqu'à atteindre la valeur de  $05 \pm 3/2$  pattes au 29<sup>ème</sup> jour. Ce score a diminué avec le temps jusqu'à avoir la valeur de  $02 \pm 2/2$  pattes, le 40<sup>ème</sup> jour (figure 32 A).

Pour les pattes antérieures, les résultats obtenus révèlent que les premiers signes de l'arthrite ont été observés le 15<sup>ème</sup> jour chez les rats du groupe arthritique ( $n = 7$ ), puis le score a évolué pour atteindre le meilleur score qui était également de  $36 \pm 3/2$  pattes. Ce score est enregistré le 28<sup>ème</sup> jour puis il a diminué avec le temps jusqu'à avoir un score de  $24 \pm 4/2$  pattes, le 40<sup>ème</sup> jour. Le traitement des rats avec la TQ a révélé une diminution hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) du score arthritique d'une manière dose-dépendante (figure 32 B). Les rats traités avec 05 mg/kg/jour ont manifesté un retard dans l'apparition des premiers signes de l'inflammation articulaire. Leurs signes d'inflammation articulaire ont été observés le 22<sup>ème</sup> jour. Le score arthritique avait évolué avec le temps jusqu'à atteindre le meilleur score, qui est de  $03 \pm 1/2$  pattes, enregistré le 31<sup>ème</sup> jour.

De même, le traitement des rats avec 10 mg/kg/jour a permis d'enregistrer un retard dans la manifestation des premiers signes de l'inflammation articulaire. Ces signes sont observés le 27<sup>ème</sup> jour. Puis, le score arthritique a évolué avec le temps jusqu'à atteindre la valeur de  $01 \pm 1/2$  pattes le 31<sup>ème</sup> jour (figure 32 B).

Ces résultats expriment l'efficacité de la TQ dans la protection et la thérapie du modèle de l'arthrite rhumatoïde induite par immunisation des rats avec le collagène II émulsifiée dans l'adjuvant de Freund.



**Figure 32 :** Effet de la TQ sur l'évolution du score arthritique des rats. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM, (n = 7) ; ###:  $p \leq 0.001$  une différence significative par rapport au groupe des rats arthritiques.

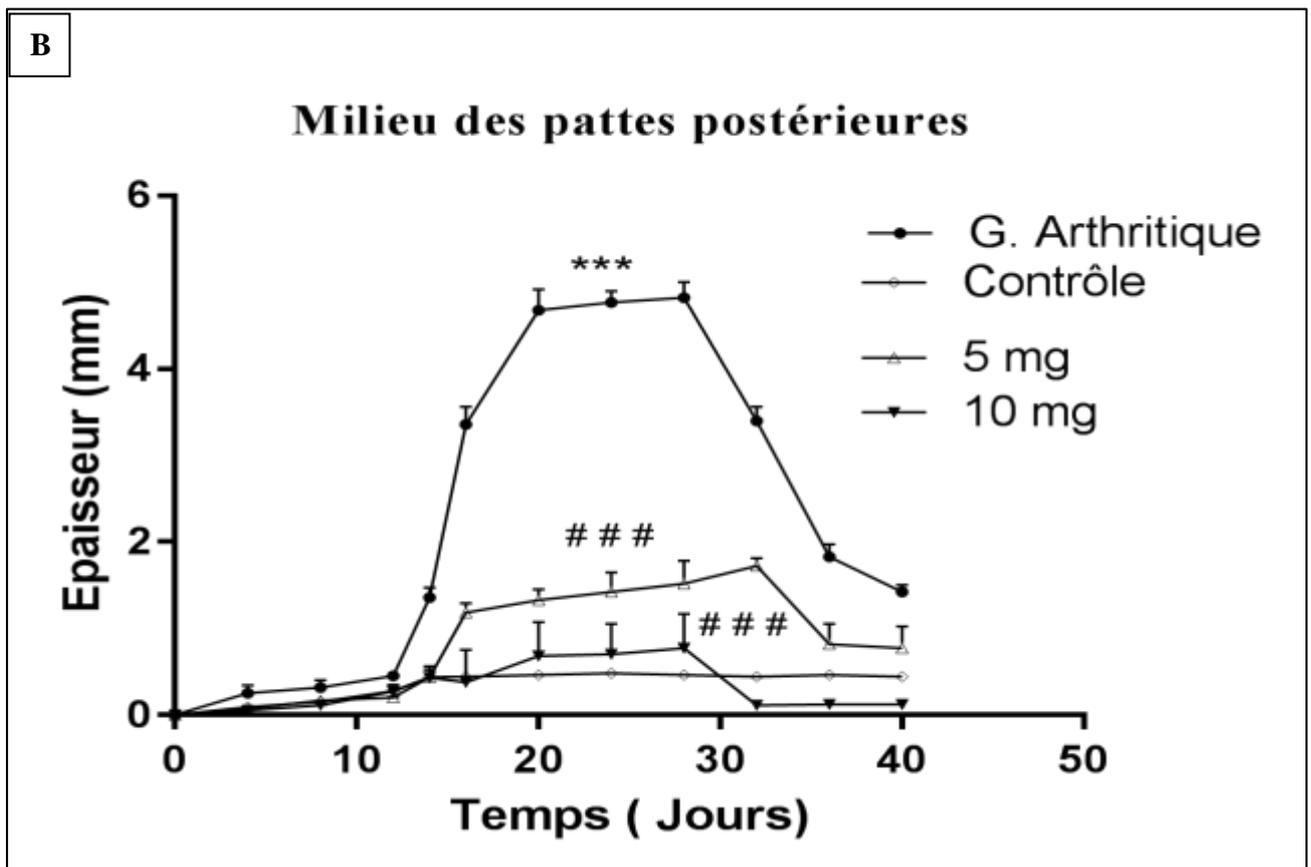
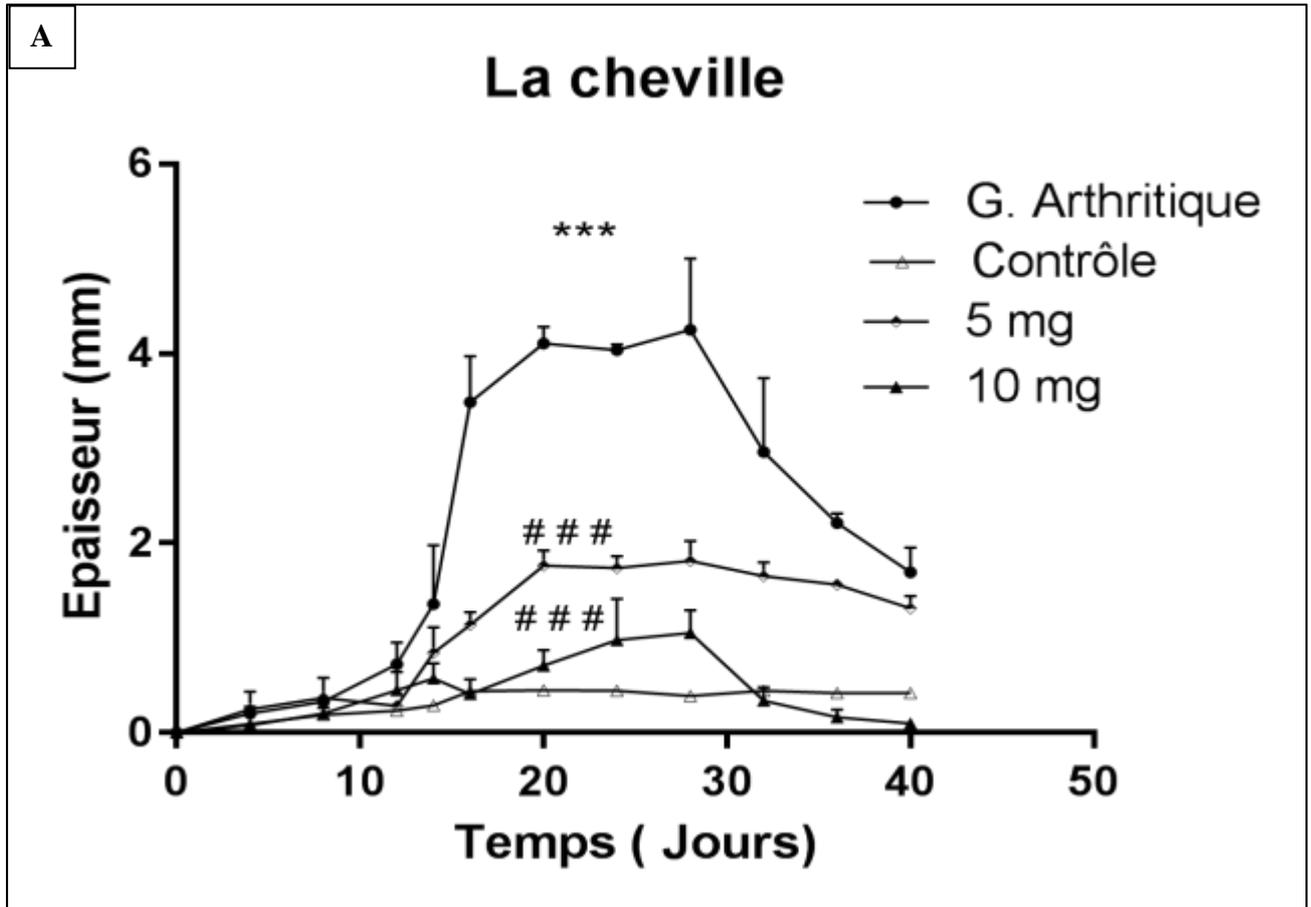
### 4.2.3. Evolution de l'épaisseur des pattes

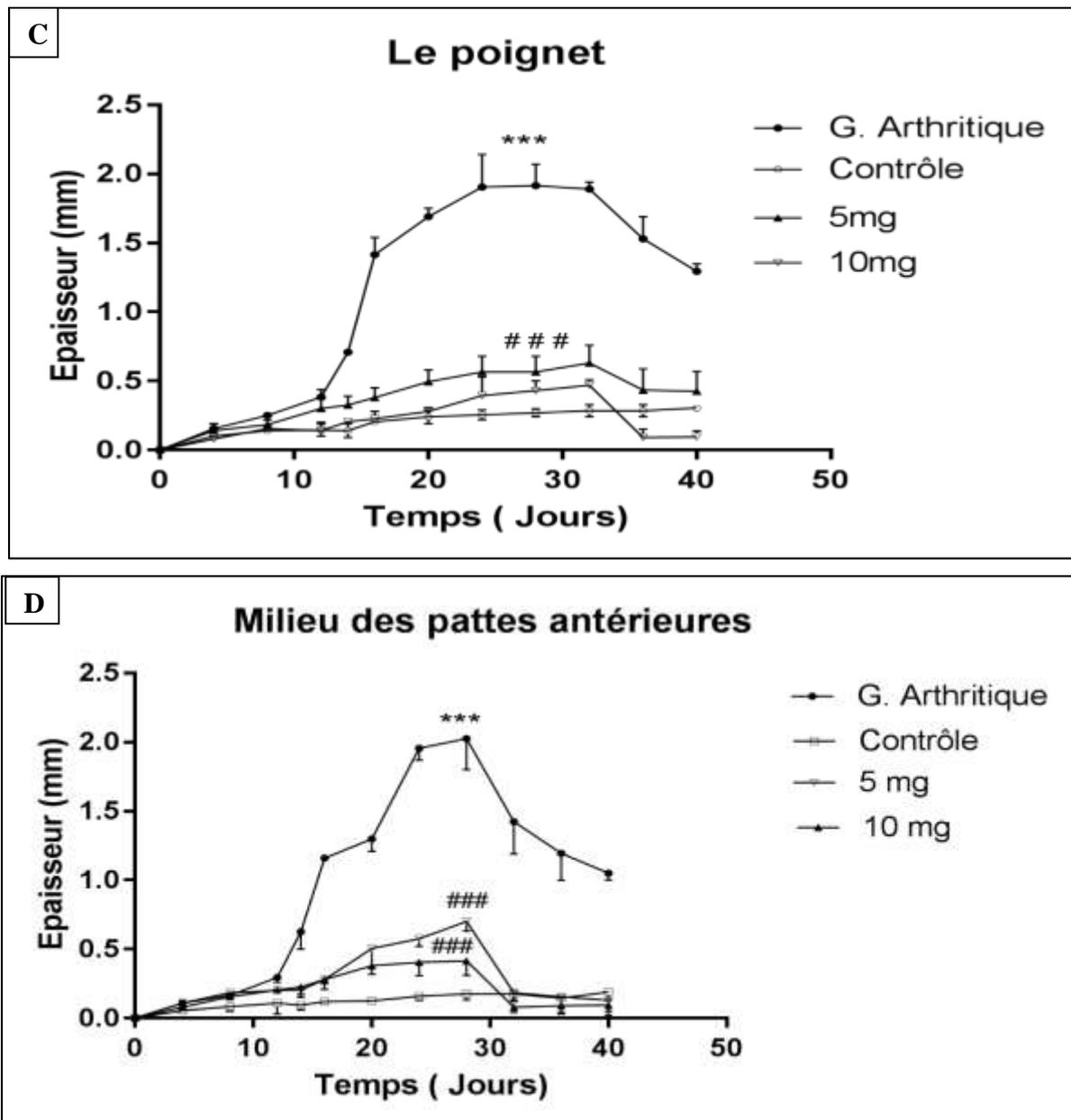
L'évolution de l'épaisseur des pattes de rats est évaluée en utilisant un pied à coulisse. La figure 33 montre l'évolution de l'épaisseur de pattes postérieures et antérieures. En ce qui concerne les pattes postérieures ; la variation de l'épaisseur de chaque patte a été estimée dans deux endroits : la cheville (figure 33 A) et le milieu de la patte (figure 33 B). Les résultats obtenus montrent qu'une évolution significative est enregistrée à partir du 14<sup>ème</sup> jour, chez le groupe arthritique. L'épaisseur

de la patte a évolué avec le temps pour atteindre une évolution maximale de  $4.82 \pm 0.18$  mm au niveau du milieu de la patte et de  $4.25 \pm 0.73$  mm au niveau de la cheville. Ces valeurs sont obtenues à partir du 28<sup>ème</sup> jour. Par la suite, l'épaisseur de pattes postérieures a diminué progressivement jusqu'à atteindre la valeur de  $1.42 \pm 0.1$  et  $1.69 \pm 0.26$  mm, respectivement. Le traitement des rats avec la TQ (05 et 10 mg/kg/jour) a permis une diminution significative ( $p \leq 0.001$ ) dont l'évolution maximale de la cheville est obtenue le 28<sup>ème</sup> jour, qui était respectivement de  $1.81 \pm 0.21$  mm et  $1.05 \pm 0.24$  mm avec 05 et 10 mg/kg/jour. L'évolution maximale du milieu de la patte était respectivement de  $1.72 \pm 0.1$  mm le 32<sup>ème</sup> jour et  $0.78 \pm 0.4$  mm le 28<sup>ème</sup> jour.

De même, l'évolution de l'épaisseur de pattes antérieures est suivie pour chaque patte dans deux endroits : le poignet (figure 33 C) et le milieu de la patte (figure 33 D). Les résultats obtenus révèlent une augmentation significative enregistrée à partir du 14<sup>ème</sup> jour chez le groupe arthritique. Cette augmentation évolue avec le temps jusqu'à atteindre sa valeur maximale de  $2.03 \pm 0.23$  mm au niveau du milieu de la patte et de  $1.92 \pm 0.17$  mm au niveau du poignet. Ces valeurs sont obtenues à partir du 28<sup>ème</sup> jour. L'épaisseur de pattes antérieures diminue avec le temps jusqu'à avoir respectivement la valeur de  $1.05 \pm 0.1$  et  $1.30 \pm 0.1$  mm, le 40<sup>ème</sup> jour.

Le traitement des rats avec la TQ (05 et 10 mg/kg/jour) a permis une diminution significative ( $p \leq 0.001$ ) dont l'évolution maximale du poignet est obtenue le 32<sup>ème</sup> jour, qui sont respectivement de  $0.63 \pm 0.13$  mm et  $0.47 \pm 0.1$  mm avec 05 et 10 mg/kg/jour. L'évolution maximale du milieu de la patte est observée également au 28<sup>ème</sup> jour, elle était de  $0.7 \pm 0.1$  mm et  $0.42 \pm 0.11$  mm respectivement (figure 33 C et D).

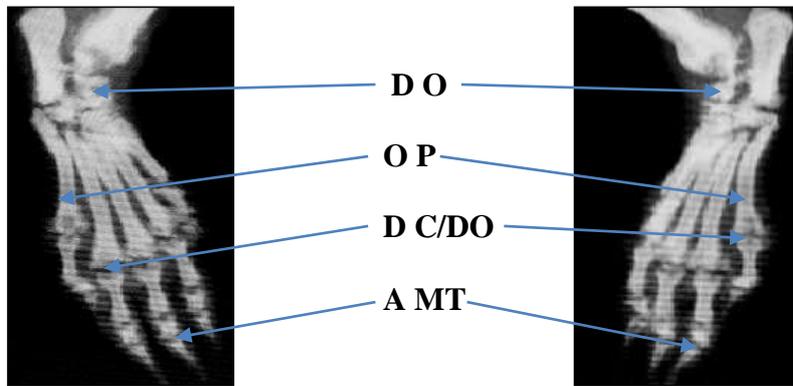




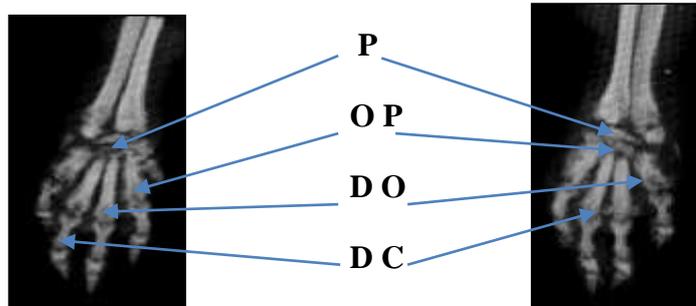
**Figure 33 :** Effet de la TQ sur l'évolution de l'épaisseur des pattes des rats. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM, (n = 7) ; \*\*\* :  $p \leq 0.001$  une différence significative par rapport au groupe contrôle. ### :  $p \leq 0.001$  une différence significative par rapport au groupe arthritique.

#### 4.2.4. Etude radiologique

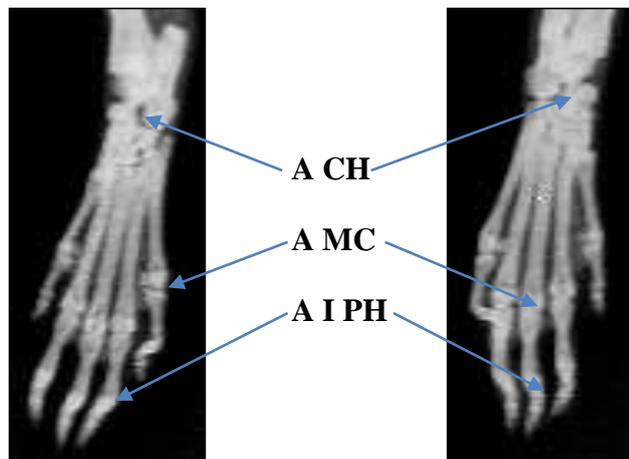
Les résultats de l'imagerie radiographique sont présentés dans la figure 34. Les radiographies de pattes des rats arthritiques montrent une diminution de la densité de l'os traduite par une ostéoporose sévère avec une destruction significative du cartilage et de l'os. Les articulations des rats arthritiques sont sévèrement déformées, par rapport aux rats normaux, alors que celle des rats traités avec 05 mg/kg/jour montre une diminution significative de l'ostéoporose et de la destruction de l'os. De même, le traitement des rats avec 10 mg/kg/jour révèle une disparition de l'ostéoporose et de la destruction de l'os, en comparaison avec les rats arthritiques.



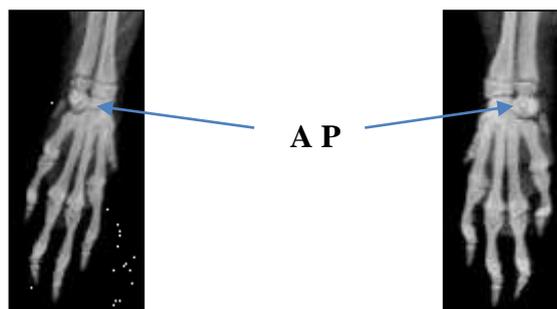
**A : Pattes postérieures (PP) Arthritiques**



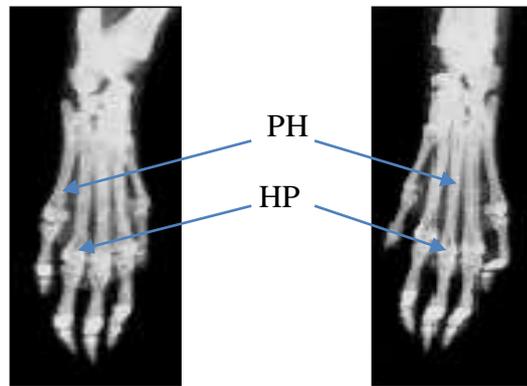
**B : Pattes antérieures (PA) Arthritiques**



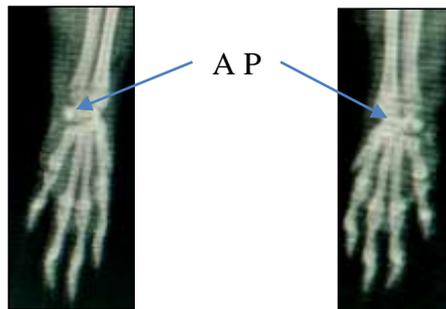
**C : Pattes Postérieures des rats normaux**



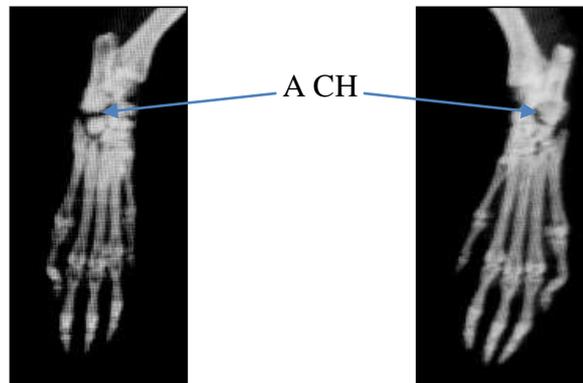
**D : Pattes Antérieures des rats normaux**



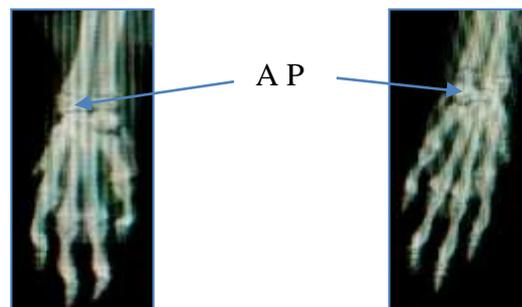
**E : Pattes Postérieures 05 mg**



**F : Pattes Antérieures 05 mg**



**G : Pattes Postérieures 10 mg**

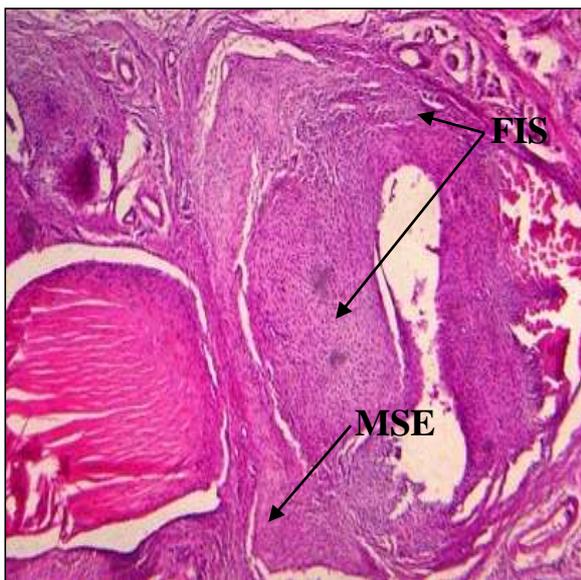


**H : Pattes Antérieures 10 mg**

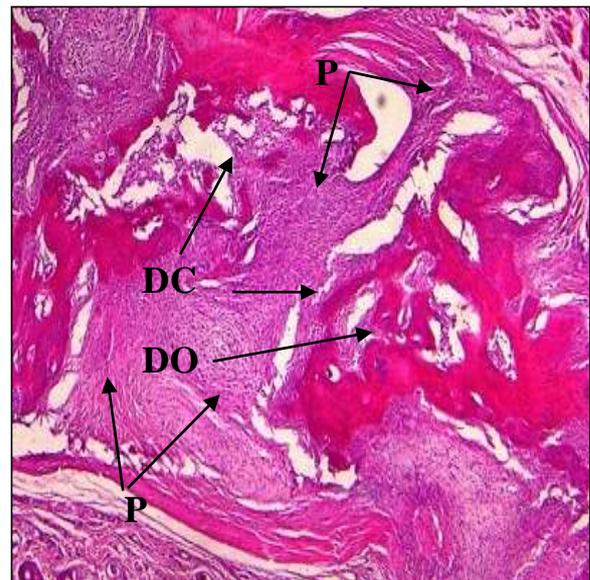
**Figure 34** : Radiographies des pattes postérieures et antérieures des rats. DO : Destruction de l'Os, DC : Destruction du Cartilage, OP : Ostéoporose, AMT : Articulations métatarsophalangiennes. PH : Phalanges, HP : Hyperplasie, ACH : Articulations de la cheville, AMC : Articulations Méta-carpophalangiennes, AIPH : Articulations Inter-phalangiennes, AP : Articulations du poigne

### 4.2.5. Etude histologique des pattes

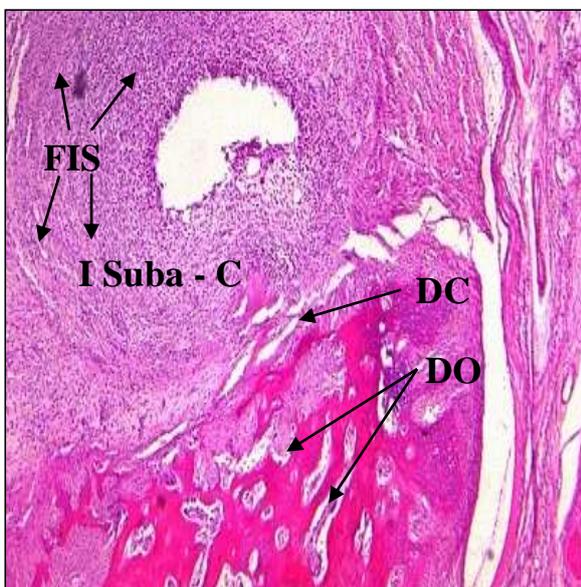
Les coupes histologiques de pattes des rats sont présentées dans la figure 35. Les résultats obtenus montrent une déformation sévère des articulations de rats arthritiques, qui ont subi une destruction sévère du cartilage et de l'os. La membrane synoviale est enflammée conduisant ainsi à la formation du pannus avec une infiltration des cellules inflammatoires et des lymphocytes conduisant à la formation de la fibrose inflammatoire. Le traitement des rats avec la TQ montre une amélioration dose dépendante de l'architecture des articulations. Cette amélioration traduite par une diminution de la sévérité de la destruction de l'os et du cartilage avec une diminution de l'infiltration inflammatoire. Les articulations des rats traités avec 10 mg/kg/jour révèlent une architecture proche à celle des articulations des rats normaux.



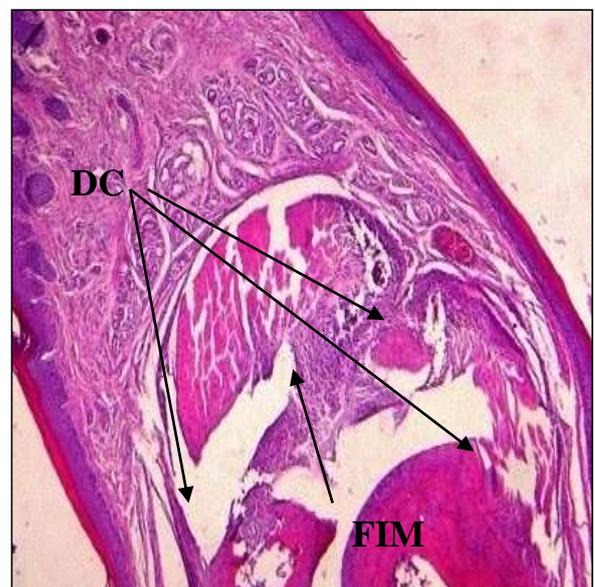
**A: Articulation Arthritique**



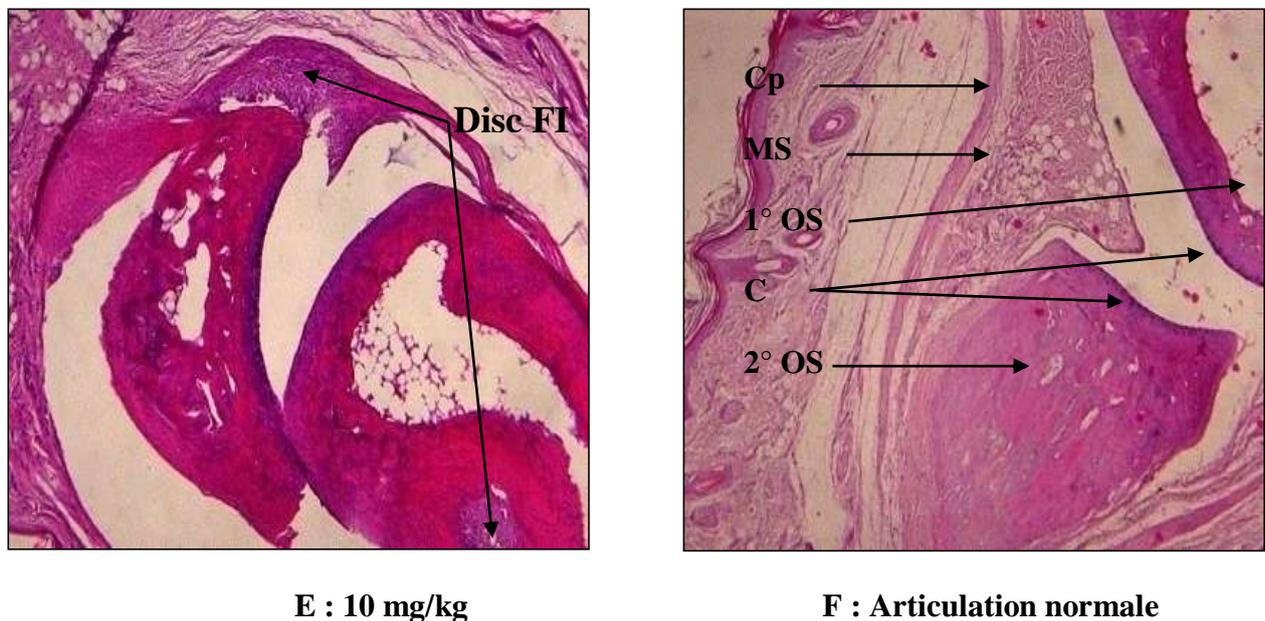
**B: Articulation Arthritique**



**C : Articulation Arthritique**



**D : 5 mg/kg**



**E : 10 mg/kg**

**F : Articulation normale**

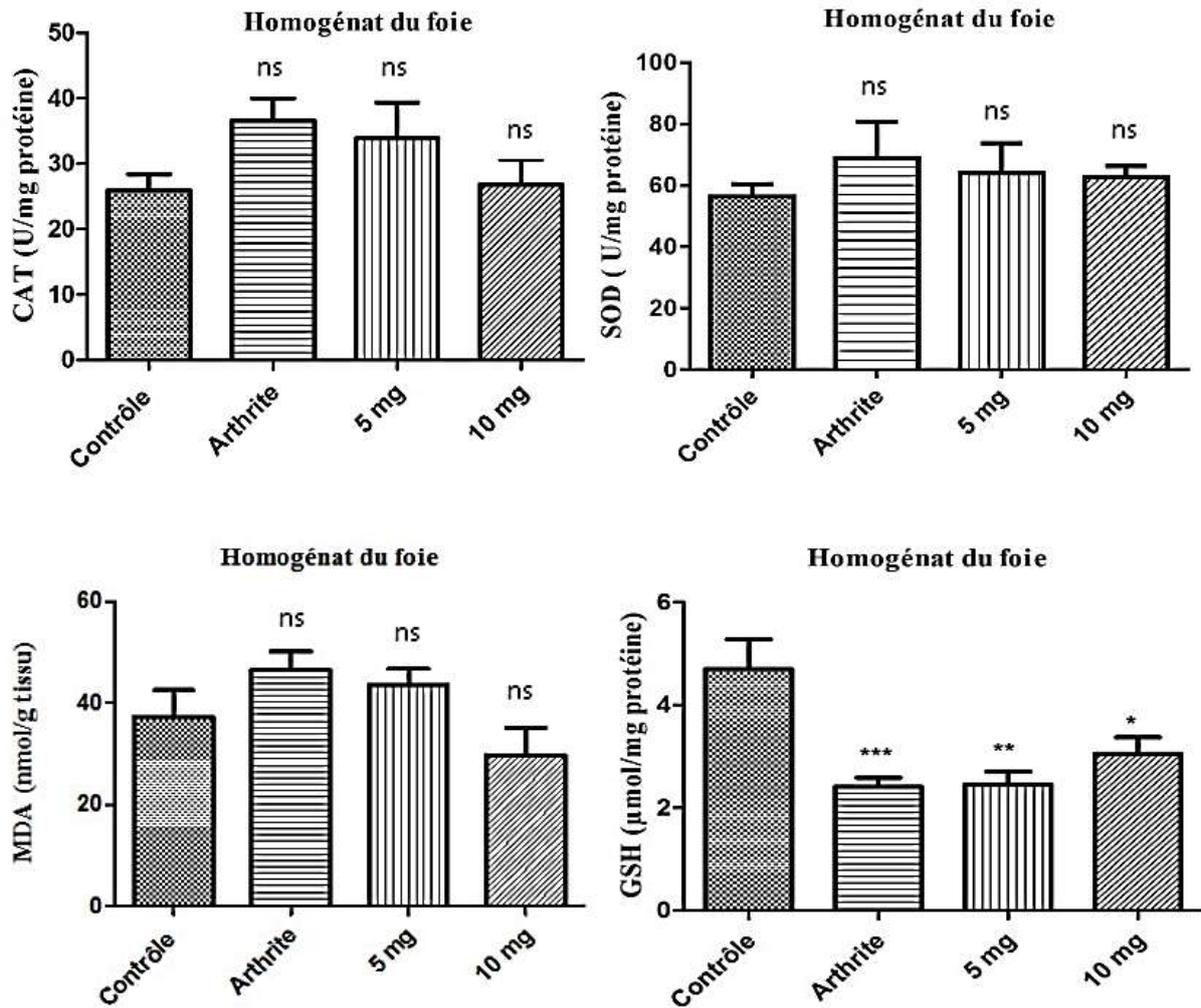
**Figure 35** : Coupes histologiques des articulations des rats arthritiques, traitées avec TQ et normaux, X 40. A-C : arthrite; DC : Destruction du cartilage, DO : Destruction de l'os, P : Pannus, MSE : Membrane synoviale enflammée, I Suba-C : Inflammation Sub-aigue -Chronique et FIS : Fibrose inflammatoire sévère. D: Arthrite et 05 mg/kg/jour TQ; FIM : Fibrose inflammatoire modérée et DC: Destruction du cartilage. E: Arthrite et 10 mg/kg/jour TQ; DISC FI :Discrète fibrose inflammatoire. F: Articulation normale; Cp : Capsule, C : Cartilage, MS : Membrane synoviale, 1° OS et 2° OS : Os de l'articulation.

### 4.3. Statut des marqueurs du stress oxydant dans le cas de l'arthrite

#### 4.3.1. Statut des marqueurs du stress oxydant au niveau tissulaire

Le statut des marqueurs du stress oxydant dans le cas de l'arthrite induite chez les rats mâles en présence et en absence de la TQ a été évalué. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 36 et le tableau XIII (au niveau de l'homogénat du foie) et la figure 37 et le tableau XIV (au niveau de l'homogénat de la rate). Au niveau de l'homogénat du foie, l'arthrite induite chez le rat mâle est accompagnée par une augmentation du MDA et de l'activité de la CAT et de la SOD. Par ailleurs, une diminution significative ( $p \leq 0.001$ ) a été notée pour le GSH par rapport au groupe contrôle. De même, le dosage de ces marqueurs au niveau de l'homogénat de la rate montre également une augmentation du taux de MDA, de l'activité de la SOD et de la CAT ( $p \leq 0.05$ ), alors qu'une diminution du GSH est observée, en comparaison avec le groupe contrôle.

Le traitement des rats avec la TQ en utilisant 05 et 10 mg/kg/jour de la TQ, pendant 40 jours montrent que la TQ induit une régulation dose-dépendante de la perturbation de l'activité des enzymes antioxydantes et du taux plasmatique de MDA, dont la dose de 10 mg/kg/jour a permis de les restaurer et de les maintenir à des valeurs proches de celles enregistrées chez le groupe contrôle. Exception faite pour le taux du GSH qui reste significativement inférieur aux valeurs normales enregistrées chez le groupe contrôle et ce même si la TQ induit son augmentation d'une manière dose-dépendante.

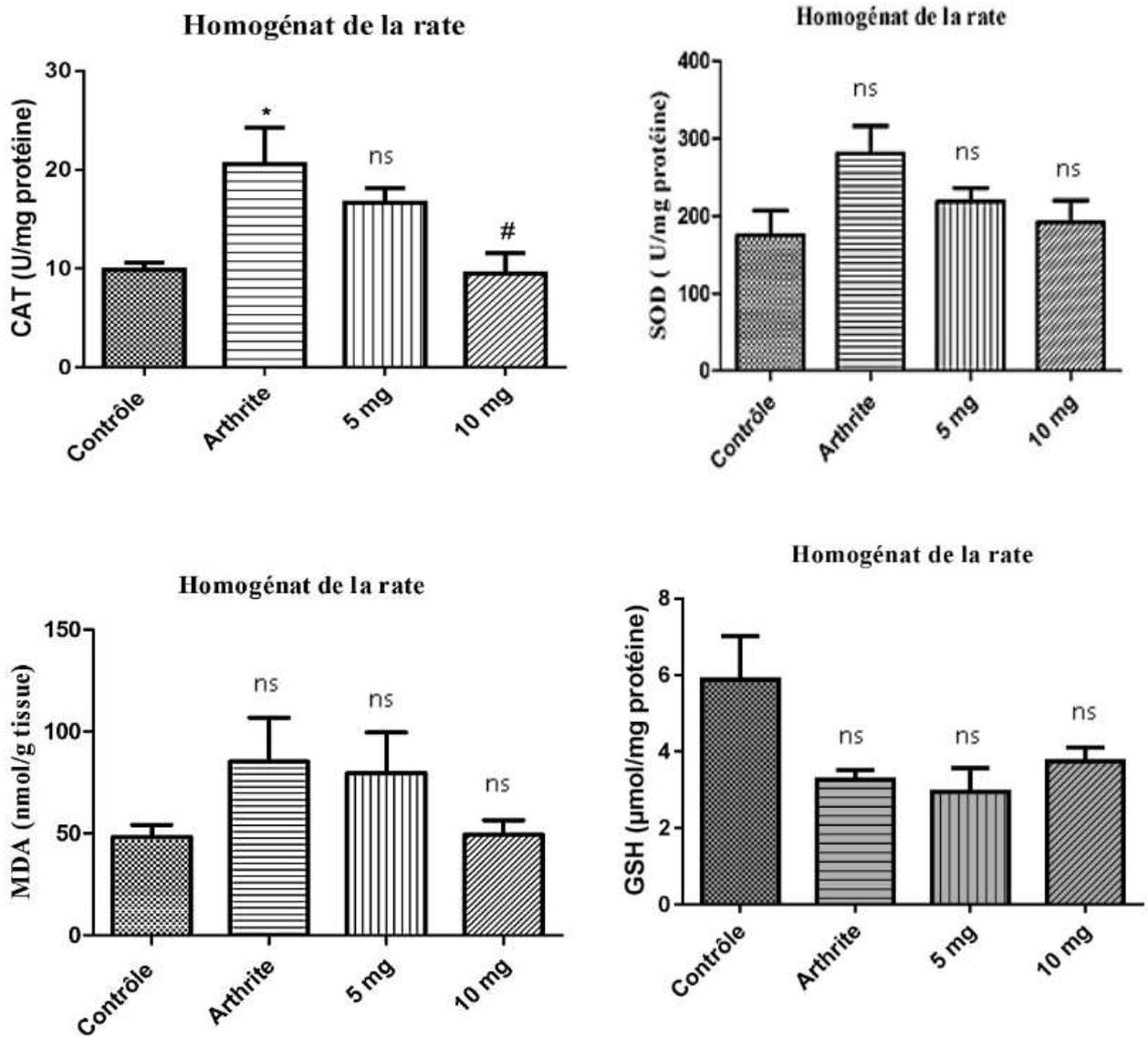


**Figure 36 :** Effet de la Thymoquinone sur le statut des marqueurs du stress oxydatif au niveau de l'homogénat du foie. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM, (n = 7) ; \* :  $p \leq 0.05$ , \*\* :  $p \leq 0.01$ , \*\*\* :  $p \leq 0.001$  une différence significative par rapport au groupe contrôle.

**Tableau XIII :** Effet de la thymoquinone sur le statut des marqueurs du stress oxydant au niveau de l'homogénat du foie.

Traitement (mg/kg)	Homogénat du foie			
	Catalase (U/mg protéine)	SOD (U/mg protéine)	GSH (µmol/mg protéine)	MDA (nmol/g Tissu)
Contrôle	25.9 $\pm$ 2.51	56.4 $\pm$ 3.98	4.70 $\pm$ 0.58	37.3 $\pm$ 5.19
5 mg	33.9 $\pm$ 5.51 <sup>ns</sup>	64.0 $\pm$ 9.81 <sup>ns</sup>	2.45 $\pm$ 0.25 <sup>**</sup>	43.6 $\pm$ 3.17 <sup>ns</sup>
10 mg	26.8 $\pm$ 3.92 <sup>ns</sup>	62.8 $\pm$ 3.60 <sup>ns</sup>	3.05 $\pm$ 0.32 <sup>*</sup>	29.7 $\pm$ 5.39 <sup>ns</sup>
Arthrite	36.6 $\pm$ 3.46 <sup>ns</sup>	68.9 $\pm$ 11.8 <sup>ns</sup>	2.41 $\pm$ 0.17 <sup>***</sup>	46.4 $\pm$ 3.68 <sup>ns</sup>

Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM, (n = 7) ; \* :  $p \leq 0.05$ , \*\* :  $p \leq 0.01$ , \*\*\* :  $p \leq 0.001$  une différence significative par rapport le groupe contrôle de rats.



**Figure 37 :** Effet de la Thymoquinone sur le statut des marqueurs du stress oxydatif au niveau de l'homogénat de la rate. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM, (n = 7) ; \* :  $p \leq 0.05$ , une différence significative par rapport le groupe contrôle de rats, # :  $p \leq 0.05$  une différence significative par rapport au groupe de rats arthritiques.

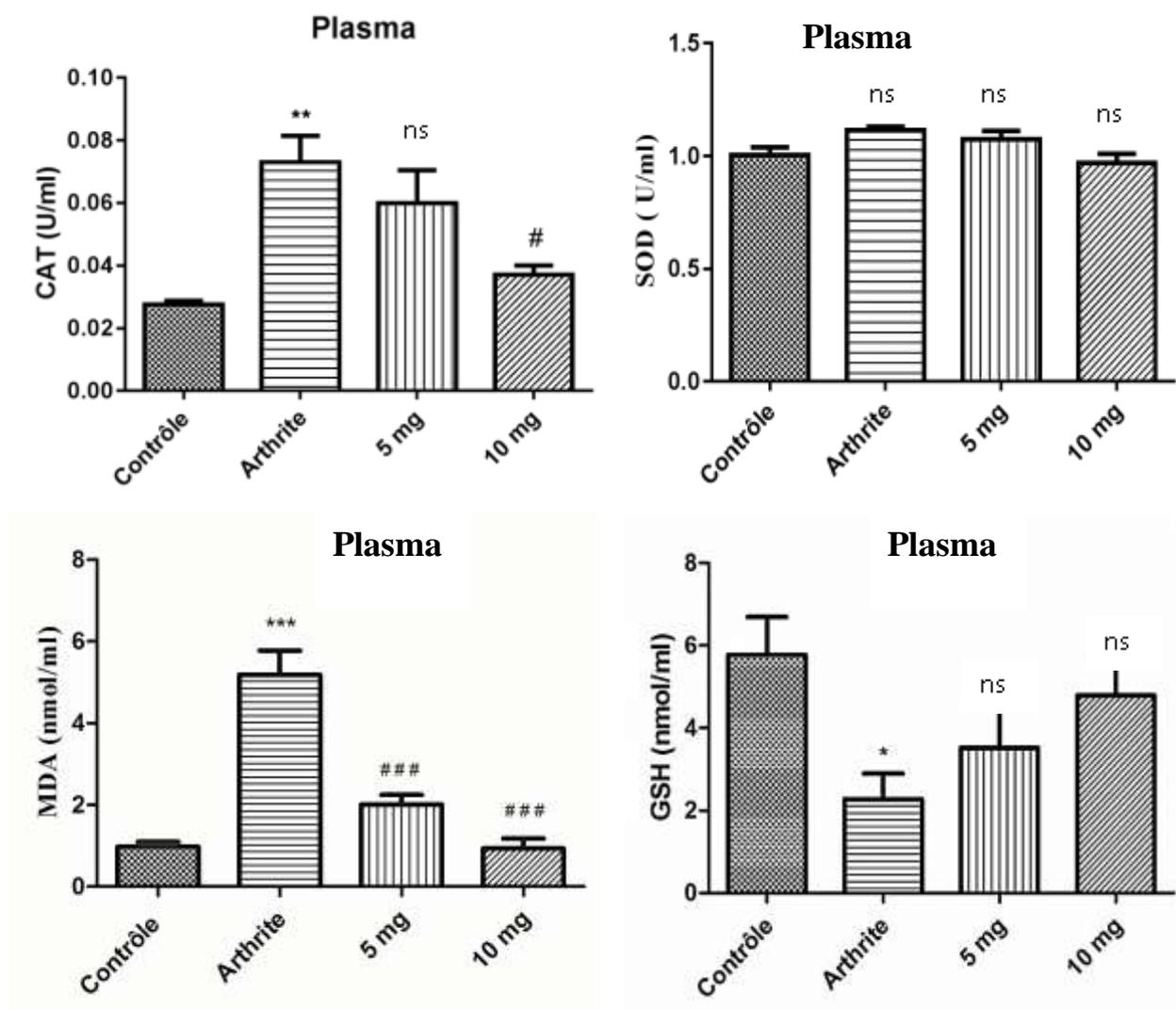
**Tableau XIV :** Effet de la thymoquinone sur le statut des marqueurs du stress oxydant au niveau de l'homogénat de la rate.

Traitement (mg/kg)	Homogénat de la rate			
	Catalase (U/mg protéine)	SOD (U/mg protéine)	GSH (µmol/mg protéine)	MDA (nmol/g Tissu)
Contrôle	9.83 $\pm$ 0.78	175 $\pm$ 31.9	5.89 $\pm$ 1.13	48.3 $\pm$ 5.91
5 mg	16.7 $\pm$ 1.48 <sup>ns</sup>	219 $\pm$ 17.6 <sup>ns</sup>	2.95 $\pm$ 0.25 <sup>ns</sup>	79.6 $\pm$ 19.9 <sup>ns</sup>
10 mg	9.48 $\pm$ 2.09 <sup>#</sup>	192 $\pm$ 28.3 <sup>ns</sup>	3.75 $\pm$ 0.36 <sup>ns</sup>	49.5 $\pm$ 7.12 <sup>ns</sup>
Arthrite	20.6 $\pm$ 3.72 <sup>*</sup>	281 $\pm$ 35.3 <sup>ns</sup>	3.26 $\pm$ 0.25 <sup>ns</sup>	85.3 $\pm$ 21.6 <sup>ns</sup>

Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM, (n = 7) ; \* :  $p \leq 0.05$  une différence significative par rapport au groupe contrôle de rats, # :  $p \leq 0.05$  une différence significative par rapport au groupe de rats arthritiques.

### 4.3.2. Statut plasmatique des marqueurs du stress oxydant

Les résultats de dosage des marqueurs du stress oxydant au niveau du plasma montrent une légère augmentation de l'activité de la SOD, une augmentation significative de la CAT ( $p \leq 0.01$ ) et une augmentation hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) du MDA. Par ailleurs, une diminution relativement significative ( $p \leq 0.05$ ) du GSH est observée, chez les rats arthritiques par rapport aux rats du groupe contrôle. Le traitement avec la TQ des rats arthritiques provoque une régulation dose-dépendante de la perturbation des activités des enzymes antioxydantes et du taux plasmatique de GSH et de MDA, dont la dose de 10 mg/kg/jour a permis de les restaurer et de les maintenir à des valeurs proches de celles observées chez le groupe contrôle (figure 38 et tableau XV).



**Figure 38 :** Effet de la Thymoquinone sur le statut des marqueurs du stress oxydatif au niveau plasmatique. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM, (n = 7) ; \*\* :  $p \leq 0.01$ , \*\*\* :  $p \leq 0.001$  une différence significative par rapport le groupe de rats contrôle, ### :  $p \leq 0.001$  une différence significative par rapport le groupe des rats arthritiques.

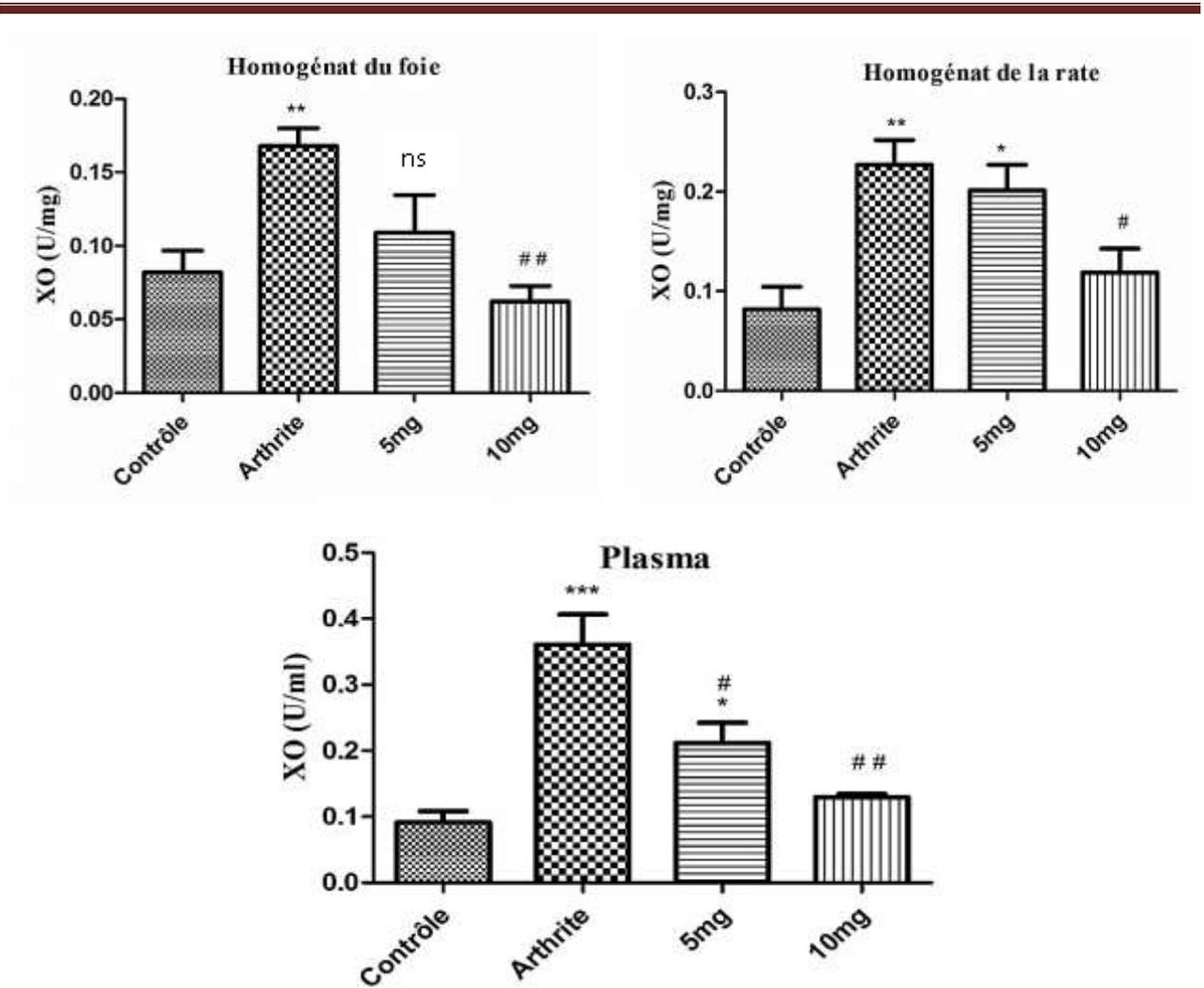
**Tableau XV** : Effet de la Thymoquinone sur le statut plasmatique des marqueurs du stress oxydant.

Traitement (mg/kg)	Plasma			
	Catalase (U/ml)	SOD (U/ml)	GSH (nmol/mg protéine)	MDA (nmol/g Tissu)
<b>Contrôle</b>	1.81 ± 0.16	1.01 ± 0.04	5.78 ± 0.91	0.97 ± 0.13
<b>5 mg</b>	4.91 ± 1.21 <sup>ns</sup>	1.08 ± 0.04 <sup>ns</sup>	3.52 ± 1.02 <sup>ns</sup>	2.01 ± 0.23 <sup>###</sup>
<b>10 mg</b>	2.39 ± 0.182 <sup>ns</sup>	0.971 ± 0.03 <sup>ns</sup>	4.79 ± 0.99 <sup>ns</sup>	0.93 ± 0.24 <sup>###</sup>
<b>Arthrite</b>	5.98 ± 1.17 <sup>**</sup>	1.11 ± 0.02 <sup>ns</sup>	2.28 ± 0.62 <sup>ns</sup>	5.18 ± 0.60 <sup>***</sup>

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM, (n = 7) ; \*\* : p ≤ 0.01, \*\*\* : p ≤ 0.001 une différence significative par rapport au groupe contrôle de rats, # # # : p ≤ 0.001 une différence significative par rapport au groupe des rats arthritiques.

#### 4.4. Effet de la TQ sur l'activité xanthine oxydase

Les résultats de l'activité de la xanthine oxydase (XO) étudiée dans le cas de l'arthrite dans les homogénats (du foie et de la rate) et dans le plasma sont présentés dans la figure 39 et le tableau XVI. Ils montrent que l'arthrite est accompagnée par une augmentation significative de l'activité XO (p ≤ 0.01 et p ≤ 0.001, respectivement) en comparaison avec le groupe contrôle. Les résultats montrent que l'homogénat de la rate exprime une activité enzymatique de la XO comparable à celle enregistrée au niveau de l'homogénat du foie. Le traitement des rats arthritiques avec 05 et 10 mg/kg/jour de la TQ provoque une diminution dose-dépendante de l'activité XO, dont la dose de 10 mg/kg/jour a permis de la restaurer et maintenir à une activité similaire à celle enregistrée chez le groupe contrôle.



**Figure 39 :** Effet de la TQ sur la xanthine oxydase dans cas de l'arthrite. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM, (n = 7) ; \* :  $p \leq 0.05$ , \*\* :  $p \leq 0.01$ , \*\*\* :  $p \leq 0.001$  une différence significative par rapport au groupe contrôle de rats, # :  $p \leq 0.05$ , ## :  $p \leq 0.01$  une différence significative par rapport au groupe des rats arthritiques.

**Tableau XVI :** Effet de la TQ sur la xanthine oxydase dans le cas de l'arthrite.

Traitement	Plasma	Homogénat du foie	Homogénat de la rate
	XO (U/ml)	XO (U/mg)	XO (U/mg)
Contrôle	0.091 $\pm$ 0.017	0.082 $\pm$ 0.015	0.082 $\pm$ 0.022
Arthrite	0.361 $\pm$ 0.046 ***	0.168 $\pm$ 0.012 **	0.227 $\pm$ 0.025 **
TQ (5 mg/kg)	0.212 $\pm$ 0.031 * , #	0.109 $\pm$ 0.026 ns	0.201 $\pm$ 0.026 *
TQ (10mg/kg)	0.129 $\pm$ 0.005 ##	0.062 $\pm$ 0.01 ##	0.119 $\pm$ 0.024 #

Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM, (N = 7) ; \* :  $p \leq 0.05$ , \*\* :  $p \leq 0.01$ , \*\*\* :  $p \leq 0.001$  une différence significative par rapport au groupe contrôle de rats, # :  $p \leq 0.05$ , ## :  $p \leq 0.01$  une différence significative par rapport au groupe des rats arthritiques.

Dans la présente étude le modèle d'arthrite induite par le collagène (CIA) a été choisi. Ce modèle est le plus connu et certainement le plus apprécié car il implique l'immunisation avec une composante du cartilage : le collagène II (CII).

Globalement, les résultats d'étude de l'hépatotoxicité et de la néphrotoxicité dans le modèle de l'arthrite montrent que les doses utilisées ne présentent aucune toxicité. Cela pourrait être expliqué par l'ordre des doses utilisées (05 et 10 mg/kg/jour), qui sont 50 et 25 fois, respectivement inférieures à la dose maximale tolérée pour l'administration orale chez les rats (Abukhader, 2012) et sont également 158 et 79 fois inférieures à cette valeur de la DL<sub>50</sub>. Al-Ali et ses collaborateurs ont montré en 2008 que les doses thérapeutiques (antioxydante et anti-inflammatoire) sont 100-150 fois inférieures au DL<sub>50</sub> qui est de l'ordre de 794,3 mg/ kg pour une administration orale chez les rats. Ces doses thérapeutiques ne présentent aucune toxicité. L'étude histologique et radiologique ainsi que les dosages biochimiques montrent que l'arthrite induite par le collagène se manifeste par une destruction importante de l'os et du cartilage accompagnée par la formation du pannus et d'une fibrose inflammatoire sévère. Ces détériorations tissulaires sont associées à une augmentation significative des facteurs rhumatoïdes et des ASLO. Ceci peut être expliqué en se basant sur les résultats de plusieurs études qui ont établi que la destruction prend place principalement quand le pannus est en contact avec le cartilage intra-articulaire et l'os (Polzer *et al.*, 2008). Le processus inflammatoire est caractérisé par une infiltration des cellules inflammatoires dans les articulations enflammées, conduisant à la prolifération des fibroblast-synoviocytes (FLS) et la destruction du cartilage et de l'os (Polzer *et al.*, 2008). Dans le tissu synovial, les cellules infiltrées sont les macrophages, les neutrophiles, les lymphocytes T, B et NK. Les FLS, les cellules inflammatoires et les cellules T produisent des cytokines pro-inflammatoires (Vaillancourt *et al.*, 2011). En réponse à ces cytokines, les FLS produisent des chimokines, métallo-protéinases (MMPs), prostaglandine E2 (PGE2) et cyclooxygénase-2 (COX-2) qui amplifient l'inflammation, l'hyperplasie et la destruction du cartilage (Chabaud *et al.*, 2000; Hammaker *et al.*, 2007). La contribution de ces cellules à la destruction de l'os est effectuée par leur capacité de sécréter le RANKL qui est la molécule clef de la différenciation des ostéoblastes en ostéoclastes interviennent dans la destruction de l'os et du cartilage (Ishida *et al.*, 2009).

De plus, la relation entre l'inflammation et l'homéostasie de l'os est attribuée aux effets de cytokines ; Une augmentation des niveaux de médiateurs pro-inflammatoires incluant IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  et PGE2 est démontrée chez les rats arthritiques (Gazzar *et al.*, 2006). Le blocage de ces molécules a entraîné une réduction de la sévérité de la maladie et la résorption osseuse (Williams, 2004 ; Schett *et al.*, 2008). Une diminution du niveau des cytokine anti-inflammatoires (IL-10 et IL-4) est également rapportée chez des rats arthritiques entraînant ainsi une destruction accrue du cartilage et de l'os (Uarranz *et al.*, 2005 ; Gazzar *et al.*, 2006).

L'effet antiarthritique de la TQ démontré dans cette étude est exprimé par un retard de l'apparition des premiers signes de l'inflammation, par la diminution significative du score arthritique et par la préservation de l'intégrité articulaire (prévention de la destruction de l'os et du cartilage) et par la diminution du taux plasmatique des facteurs rhumatoïdes et des ASLO. Les résultats concordent avec d'autres études qui ont montré l'efficacité de la TQ en tant qu'agent antiarthritique puissant (Tekeoglu *et al.*, 2007 ; Vaillancourt *et al.*, 2011 ; Umar *et al.*, 2012). Ces effets peuvent être expliqués par l'effet antioxydant et immuno-modulateurs de la TQ, démontré dans des modèles de l'arthrite induites chez des animaux.

L'administration de la TQ était efficace contre l'arthrite rhumatoïde induite par le collagène. Elle supprime l'augmentation de NO<sup>•</sup> et myeloperoxydase (MPO). De plus, la TQ inhibe l'accumulation et l'activation des cellules polymorphonucléaires et elle maintient l'homéostasie dans le déséquilibre des cytokines par des niveaux inférieurs de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  et IL-6 et le niveau élevé d'IL-10 (Umar *et al.*, 2012). Vaillancourt et ses collaborateurs ont également rapporté que le TQ (05 mg/kg/jour) réduisait significativement les taux sériques d'IL-1 et de TNF- $\alpha$ . El-Gazzar et ses collaborateurs (2006) ont montré que la TQ a la capacité de maintenir l'équilibre de la balance des cytokines pro et anti-inflammatoires dans le cas des maladies inflammatoires, en augmentant la production des cytokines anti-inflammatoires et en diminuant la production des cytokines pro-inflammatoires.

La polyarthrite est une maladie multisystémique immuno-inflammatoire chronique. Les espèces réactives de l'oxygène sont impliquées dans sa pathogenèse (Ozkan *et al.*, 2007). Les articulations arthritiques contiennent grand nombre de fibroblastes, de chondrocytes, de macrophages et surtout de neutrophiles, qui produisent des ERO (Hitchon et El-Gabalawy, 2004). Dans cette étude, l'effet de la Thymoquinone sur les marqueurs du stress oxydant a été étudié.

Dans la présente étude, une augmentation significative de l'activité de la catalase a été observée chez les rats arthritiques par rapport aux rats normaux. De même, une étude précédente a rapporté une augmentation de l'activité de la catalase plasmatique chez les patients atteints de la polyarthrite (Mezes et Bartosiewicz, 1983 ; Ostałowska *et al.*, 2016). La catalase est l'enzyme qui protège les cellules de l'accumulation du peroxyde d'hydrogène par la dismutation de ce dernier pour former de l'eau et de l'oxygène ou en l'utilisant comme oxydant dans lequel elle fonctionne comme une peroxydase. Cette augmentation de la CAT pourrait être une régulation compensatoire du stress oxydatif suite à l'augmentation de la production des ERO par les polynucléaires neutrophiles (PNN) au site de l'inflammation et en raison de l'augmentation du niveau de la SOD qui conduit à la génération du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'augmentation de l'activité CAT joue un rôle important dans la dismutation des peroxydes et le maintien de l'intégration fonctionnelle des membranes

cellulaires (Chandra *et al.*, 2000). Le traitement avec la thymoquinone inhibe cette up-régulation d'une manière dose-dépendante. Cela pourrait être dû à ses effets antioxydant et anti-inflammatoire qui ont été bien documentées dans plusieurs études (Houghton *et al.*, 1995 ; Nagi et Mansour, 2000).

Chez les rats arthritiques, une augmentation de l'activité de la SOD au niveau tissulaire (le foie et la rate) et plasmatique a été observée. Ces résultats sont similaires à d'autres études démontrant une augmentation du taux plasmatique de la SOD (Mezes et Bartosiewicz, 1983 ; Cimen *et al.*, 2000 ; Ostałowska *et al.*, 2016). Cette augmentation du niveau de la SOD pourrait être aussi une régulation compensatoire en réponse à une augmentation du stress oxydatif suite à une production accrue des ERO, en particulier l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) par les polynucléaires neutrophiles (PNN) au site de l'inflammation. Une étude antérieure a démontré que l'anion superoxyde joue un rôle capital dans l'inflammation, en particulier chez les patients atteints d'une maladie inflammatoire des articulations (Schiller *et al.*, 2003). Le traitement avec la thymoquinone a permis de restaurer et de maintenir le niveau de la SOD d'une manière dépendante de la dose. La diminution du niveau de la SOD pourrait être due au piégeage de l'anion superoxyde produit par les PNN. Cet effet piègeur de l' $O_2^{\cdot-}$  pourrait être due à la transformation la thymoquinone en hydroquinone, un antioxydant puissant (Badary *et al.*, 2003 ; Staniek et Gille, 2010).

Les résultats montrent une diminution du taux de GSH dans le plasma, le foie et la rate chez les rats arthritiques, cela pourrait être dû aux plusieurs raisons : le stress oxydatif pourrait causer une diminution du GSH suite à son oxydation (Jackson *et al.*, 2004). Cette oxydation aura lieu pour prévenir les dommages oxydatifs. C'est une défense accrue contre les dommages oxydants dans la polyarthrite rhumatoïde (Surapneni et Gopan, 2008).

Un autre aspect important est la nutrition. Lorsque l'apport protéique alimentaire est suffisant pour maintenir l'équilibre azoté, il peut être insuffisant pour maintenir le GSH cellulaire, en particulier dans des conditions de stress oxydatif. Ainsi, des précurseurs de la synthèse du GSH tels que la N-acétyl-cystéine (NAC) ou l'acide 2-oxothiazolidine-4-carboxylique pourraient l'influencer. Le taux des précurseurs de la cystéine, ou de la cystéine elle-même, pourraient être la cause de cette diminution du GSH (Jackson *et al.*, 2004). Les résultats sont en accord avec d'autres rapports qui ont montré la déplétion du GSH dans l'arthrite rhumatoïde (Surapneni et Gopan, 2008). Le traitement avec la thymoquinone a conduit à une augmentation dose-dépendante du taux de GSH. Ces résultats concordent avec les résultats d'Umar et ses collaborateurs (2012) qui ont montré l'augmentation du taux de GSH suite au traitement des rats arthritiques avec la TQ pendant 21 jours.

Dans cette étude, une augmentation du taux de MDA a été observée chez les rats arthritiques. Des rapports similaires du taux élevé du MDA ont été rapportés chez des patients atteints de maladies rhumatismales (Mezes et Bartosiewicz, 1983 ; Kajanachumpol *et al.*, 2000, Jaswal *et al.*, 2003 ; Karatas *et al.*, 2003 ; Ozkan *et al.*, 2007 ; Surapneni et Gopan, 2008; Umar *et al.*, 2012 ; Ostalowska *et al.*, 2016). L'augmentation du taux de MDA pourrait être le résultat d'une peroxydation lipidique accrue qui joue un rôle capital dans la pathogenèse de l'arthrite (Bauerova *et al.*, 2011). Le traitement avec la thymoquinone a entraîné une diminution du taux du MDA d'une manière dose-dépendante. Cela pourrait être expliqué par son effet inhibiteur de la peroxydation lipidique, comme suggéré par Houghton et ses collaborateurs (1995) et Umar et ses collaborateurs (2012).

Les résultats du dosage de l'activité de Xanthine oxydase (XO) montrent que l'activité de la XO dans le plasma et dans le cas de l'arthrite est plus élevée que dans l'homogénat du foie et de la rate, Bien que la distribution naturelle de la XOR soit prédominante dans le foie (Harrison, 2002) et les niveaux de transcription les plus élevés se trouvent dans le foie et l'intestin (Kurosaki *et al.*, 1995). Cela peut être expliqué par la transformation du XOR en XO. Une fois libérée dans le plasma, la XOR est rapidement converti en forme oxydase XO génératrice potentielle des espèces réactives de l'oxygène (Martín *et al.*, 2004). La présence d'autres sources de la XO est évidente, du fait que l'ARNm de la XOR est détecté dans la plupart des tissus. Benboubetra et ses collaborateurs (1997) ont localisé l'enzyme dans la membrane synoviale.

Au cours de l'inflammation, la XOR est activée par différents médiateurs inflammatoires, tels que TNF- $\alpha$ , qui provoquent la conversion de la XDH en XO (Batteli *et al.*, 2014b). Les neutrophiles activés causent également une conversion irréversible de la forme XDH en forme XO dans les cellules endothéliales (Richard *et al.*, 2007).

D'après ces résultats, on peut suggérer que la TQ exerce son effet antiarthritique selon un mécanisme anti-inflammatoire et protecteur du cartilage et de l'os au niveau des articulations. Cet effet pourrait être induit par l'inhibition des cytokines proinflammatoires (Umar *et al.*, 2012). Ceci, conduit à une réduction de la production des radicaux libres et des dommages qui en découlent.

### Conclusion et perspectives

L'objectif de l'étude développée dans ce travail était de déterminer l'effet de la thymoquinone sur le stress oxydant et l'activité de la xanthine oxydase dans le cas de l'arthrite rhumatoïde et l'hépatotoxicité induites chez les rats mâles. L'étude est réalisée en utilisant des tests *in vitro* puis d'autres *in vivo*.

Dans une première étape, l'effet antioxydant et antiarthritique de la thymoquinone *in vitro* a été étudié. Les résultats montrent un effet antioxydant intéressant spécifiquement l'effet scavenger des ERO et l'inhibition de la peroxydation lipidique.

Dans une deuxième étape, l'effet de la TQ sur le stress oxydant *in vivo* a été étudié. Le premier volet de l'étude *in vivo* a été effectué en induisant l'hépatotoxicité par CCl<sub>4</sub>, avant et après l'application du traitement avec la thymoquinone afin d'évaluer l'effet prophylactique et curatif, respectivement. Les résultats montrent une amélioration considérable de l'activité des enzymes hépatiques (ASAT, ALAT et PAL), le statut des marqueurs du stress oxydant (SOD, CATA, GSH et MDA) et l'activité de la xanthine oxydase au niveau plasmatiques et tissulaires. Une amélioration du tissu hépatique a été également observée.

Le deuxième volet de l'étude *in vivo* est effectué en induisant l'arthrite rhumatoïde par immunisation des rats avec le collagène II, puis l'application du traitement avec la thymoquinone a été procédé. Les résultats montrent une amélioration considérable du statut des marqueurs du stress oxydant (SOD, CATA, GSH et MDA) et l'activité de la xanthine oxydase au niveau plasmatiques et tissulaires, accompagnée par une préservation de l'architecture histologique des articulations. Un retard de l'apparition de la maladie et une diminution de sa sévérité sont également enregistrées. Les résultats obtenus révèlent le pouvoir anti-arthritique, hépatoprotecteur et hépatocuratif de la thymoquinone.

Nous envisageons dans un proche avenir de compléter cette étude par d'autres essais afin de :

- Comprendre l'effet de la thymoquinone sur les cytokines proinflammatoires TNF- $\alpha$  et IL-1 et IL-6.
- Comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans les processus préventifs et curatifs.
- Développer des approches appropriées pour une éventuelle application thérapeutique de la thymoquinone ou de ses dérivés.

## *Références*

- Abdelmeguid NE, Fakhoury R, Kamal SM, Al Wafai RJ (2010). Effects of *Nigella sativa* and thymoquinone on biochemical and subcellular changes in pancreatic  $\beta$ -cells of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Diabetes*. **2(4)**: 256-266.
- Abirami A, Nagarani G, Siddhuraju P (2015). Hepatoprotective effect of leaf extracts from *Citrus hystrix* and *C. maxima* against paracetamol induced liver injury in rats. *Food Science and Human Wellness*. **4**: 35 - 41.
- Abukhader MM (2012). The effect of route of administration in thymoquinone toxicity in male and female rats. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. **74**: 195–200.
- Aebi H (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. **105**: 121-126.
- Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A (2007). Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Revue du Rhumatisme*. **74**: 636–643.
- Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL (2003). Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *The Journal of Biological Chemistry*. **278**: 1910-1914.
- Al-Ali A, Alkhawajah AA, Randhawa MA, Shaikh NA (2008). Oral and intraperitoneal LD50 of thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa*, in mice and rats. *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad*. **20(2)**: 25-27.
- Alam MN, Bristi NJ, Rafiqzaman M (2012). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. **21 (2)**: 143-152.
- Al-Amri AM, Bambosa AO (2009). Phase I Safety and Clinical Activity Study of Thymoquinone in Patients with Advanced Refractory Malignant Disease. *Shiraz E Medical Journal*. **10(3)**: 107-111.
- Alhosin M, Ibrahim A, Boukhari A, Sharif T, Gies JP, Auger C, Schini-Kerth VB (2012). Anti-neoplastic agent thymoquinone induces degradation of  $\alpha$  and  $\beta$  tubulin proteins in human cancer cells without affecting their level in normal human fibroblasts. *Investigational New Drugs*. **30**: 1813–1819.
- Alkharfy KM, Al-Daghri NM, Al-Attas OS, Alokail MS (2011). The protective effect of thymoquinone against sepsis syndrome morbidity and mortality in mice. *International immunopharmacology*. **11(2)**: 250-254.
- Al-Malki A L, Sayed AAR (2014). Thymoquinone attenuates cisplatin-induced hepatotoxicity via nuclear factor kappa-  $\beta$ . *Complementary and Alternative Medicine*. **14**: 282-290.
- AL-Shabanah OA, Alam K, Nagi MN, Alrikabi AC, Al-Bekairi AM (2000). Protective effect of aminoguanidine, a nitric oxide synthase inhibitor, against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in mice. *Life Science*. **66**: 265-270.
- Al Wafai RJ (2013). *Nigella sativa* and thymoquinone suppress cyclooxygenase-2 and oxidative stress in pancreatic tissue of streptozotocin-induced diabetic rats. *Pancreas*. **42**: 841–849.
- Ammar E-SM, Gameil NM, Shawky NM, Nader MA (2011). Comparative evaluation of anti-inflammatory properties of thymoquinone and curcumin using an asthmatic murine model. *International immunopharmacology*. **11(12)**: 2232-2236.
- Arafa ESA, Zhu Q, Shah ZI, Wani G, Barakat BM, Racoma I, El-Mahdy MA, Wani AA (2011). Thymoquinone up-regulates PTEN expression and induces apoptosis in doxorubicin-resistant human breast cancer cells. *Mutation Research*. **706**: 28–35.
- Atkin JD, Farg MA, Turner BJ, Tomas D, Lysaght JA, Nunan J, Rembach A, Nagley P, Beart PM, Cheema SS, Horne MK (2006). Induction of the unfolded protein response in familial amyotrophic lateral sclerosis and association of protein disulfide isomerase with superoxide dismutase. *The journal of Biological Chemistry*. **281**: 30152-30165.
- Attoub S, Sperandio O, Raza H, Arafat K, Al-Salam S, Al Sultan MA, Al Safi M, Takahashi T, Adem A (2013). Thymoquinone as an anticancer agent: evidence from inhibition of cancer cells viability and invasion in vitro and tumor growth in vivo. *Fundamental & clinical pharmacology*. **27(5)**: 557-569.
- Auger I, Sebbag M, Vincent C, Balandraud N, Guis S, Nogueira L, Svensson B, Cantagrel A, Serre G, Roudier J (2005). Influence of HLA-DR genes on the production of rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated fibrinogen. *Arthritis & Rheumatology*. **52**: 3424-3432.

- Aviña-Zubieta JA, Choi HK, Sadatsafavi M, Etminan M, Esdaile JM, Lacaille D (2008). Risk of cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Arthritis & Rheumatology*. **59(12)**:1690-1697.
- Avissar N, Whittin JC, Allen PZ (1989). Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. *The Journal of Biological Chemistry*. **2**: 15850-15855.
- Aycan IÖ, Tüfek A, Tokgöz O, Evliyaoglu O, Fırat U, Kavak GÖ, Turgut H, Yüksel MU (2014). Thymoquinone treatment against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *International Journal of Surgery*. **12**: 213 – 218.
- Aycan IO, Tokgoz O, Tüfek A, Ulas-Alabalık U, Evliyaoglu O, Turgut H, Çelik F, Güzel A (2015). Thymoquinone treatment against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *International Journal of Surgery*. **13**: 33-37.
- Babior BM (1999). NADPH oxidase: An update. *Blood*. **93**:1464-1476.
- Badary OA, Gamal El-Din AM (2001). Inhibitory effects of thymoquinone against 20 methylcholanthrene induced fibrosarcoma tumorigenesis. *Cancer detection and prevention*. **25 (4)**: 362-368.
- Badary OA, Taha RA, Gamal El-Din AM, Abdel-Wahab MH (2003). Thymoquinone Is a Potent Superoxide Anion Scavenger. *Drug and Chemical Toxicology*. **26(2)**: 87–98.
- Banerjee S, Kaseb AO, Wang Z, Kong D, Mohammad M, Padhye S, Sarkar FH, Mohammad RM (2009). Antitumor activity of gemcitabine and oxaliplatin is augmented by thy-moquinone in pancreatic cancer. *Cancer Research*. **69**: 5575–5583.
- Barros L, Ferreira MJ, Queiros B, Ferreira ICFR, Baptista P (2007). Total phenols, ascorbic acid, b-carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry*. **103**: 413-419.
- Basu S (2003). Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. *Toxicology*. **189**: 113-127.
- Battelli MG, Bolognesi A, Polito L (2014a). Pathophysiology of circulating xanthine oxidoreductase: New emerging roles for a multi-tasking enzyme. *Biochimica & Biophysica Acta*. **1842**: 1502-1517.
- Battelli MG, Polito L, Bolognesi A (2014b). Xanthine oxidoreductase in atherosclerosis pathogenesis: Not only oxidative stress. *Atherosclerosis*. **237**: 562-567.
- Bauerova K, Ponist S, Mihalova D, Drafi F, Kuncirova V (2011). Utilization of adjuvant arthritis model for evaluation of new approaches in rheumatoid arthritis therapy focused on regulation of immune processes and oxidative stress. *Interdisciplinary Toxicology*. **4**: 33–39.
- Beavis PA, Gregory B, Green P, Cribbs AP, Kennedy A, Amjadi P, Palfreeman AC, Feldmann M, Brennan FM (2011). Resistance to regulatory T cell-mediated suppression in rheumatoid arthritis can be bypassed by ectopic foxp3 expression in pathogenic synovial T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **108**:16717-22.
- Bechmann LP, Hannivoort RA, Gerken G, Hotamisligil GS, Trauner M, Canbay A (2012). The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *Journal of Hepatology*. **56**: 952 - 564.
- Benboubetra M, Arrar L, Hanachi N, Baghiani A. (2001). Xanthine oxidoreductase activity in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Biochemical Society Transactions*. **29(5)**: A110.
- Bendele A (2001). Animal models of rheumatoid arthritis. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*. **1**: 377-385.
- Bettelli, E, Korn T, Kuchroo VK. (2007). Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Current Opinion in Immunology*. **19**: 652-657.
- Beutler E, Duron O, Kelly BM (1993). Improved Method for the Determination of Blood Glutathione. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. **61**: 882–888.
- Blake DR, Stevens CR, Sahinogla TM, Ellis G, Gaffney K, Edmonds S, Benboubetra M, Harrison R, Jawed S, Kanezler J, Miller TM, Winyord PG, Zhang Z (1997). Xanthine oxidase; four roles for the enzyme in rheumatoid pathology. *Biochemical Society Transactions*. **25**: 812-816.

- Boll M, Weber LWD, Becker E, Stampfl A (2001). Pathogenesis of carbon tetrachloride-induced hepatocyte injury. Bioactivation of CCl<sub>4</sub> by cytochrome P<sub>450</sub> and effect on lipid homeostasis. *Zeitschrift für Naturforschung*. **56**: 111-12.
- Borg JM, Reeber A (2008). Biochimie métabolique. 2<sup>ème</sup> ed, Ellipses, France. pp: 257-269.
- Boudiaf K, Hurtado-Nedelec M, Belambri SA, Marie JC, Derradji Y, Benboubetra M, El-Benna J, Dang PMC (2016). Thymoquinone strongly inhibits fMLF-induced neutrophil functions and exhibits anti-inflammatory properties in vivo. *Biochemical Pharmacology*. **104**: 62–73.
- Brai BIC, Adisa RA, Odetola A A (2014). Hepatoprotective properties of aqueous leaf extract of persea americana, mill (lauraceae) ‘avocado’ against CCl<sub>4</sub>-induced damage in rats. *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicine*. **11(2)**: 237-244.
- Bray RC (1975). Molybdenum iron-sulphur flavin hydroxylases and related enzymes. In The enzymes. Boyer P.D 3<sup>rd</sup> ed, Academic press, New York. pp: 299- 419.
- Buldak L, Łabuzek K, Bułdak RJ, Kozłowski M, Machnik G, Liber S, Suchy D, Duława- Bułdak A, Okopien B (2014). Metformin affects macrophages’ phenotype and improves the activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase and decreases malondialdehyde concentration in a partially AMPK-independent manner in LPS-stimulated human monocytes/ macrophages. *Pharmacological Reports*. **66**: 418-429.
- Burdon RH, Gill V (1993). Cellular generated active oxygen species and Hella Cell proliferation. *Free radical research communications*. **19**: 203-213.
- Calabresi E, Petrelli F, Bonifacio AF, Puxeddu I, Alunno A (2018). One year in review 2018: pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental rheumatology*. **36**: 175-184.
- Cantin PA (1999). Oxidant and antioxidants in lung injury. In: Lam and Other Diseases Characterized By Smooth Muscle Proliferation. Moss J (Ed) New York, USA. pp: 519-531.
- Cantu-Medellin N, Kelley EE (2013a). Xanthine oxidoreductase-catalyzed reactive species generation: A process in critical need of reevaluation. *Redox Biology*. **1**: 353–358.
- Cantu-Medellin N, Kelley EE (2013b). Xanthine oxidoreductase-catalyzed reduction of nitrite to nitric oxide: Insights regarding where, when and how. *Nitric Oxide*. **34**: 19-26.
- Cedergren J, Forslund T, Sundqvist T, Skogh T (2007). Intracellular oxidative activation in synovial fluid neutrophils from patients with rheumatoid arthritis but not from other arthritis patients. *Journal of Rheumatology*. **34**: 2162-70.
- Cerhan JR, Saag KG, Merlino LA, Mikuls TR, Criswell LA (2003). Antioxidant micronutrients and risk of rheumatoid arthritis in a cohort of older women. *American Journal of Epidemiology*. **157**: 345-54.
- Chabaud M, Garnero P, Dayer JM, Guerne PA, Fossiez F, Miossec P (2000). Contribution of interleukin 17 to synovium matrix destruction in rheumatoid arthritis. *Cytokine*. **12**: 1092–1099.
- Chaieb K, Kouidhi B, Jrah H, Mahdouani K, Bakhrouf A (2011). Antibacterial activity of Thymoquinone, an active principle of Nigella sativa and its potency to prevent bacterial biofilm formation, *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **13 (11)**: 29.
- Chandra R, Aneja R, Rewal C, Konduri R, Dass K, Agarwal S (2000). An opium alkaloid-papaverine ameliorates ethanol induced hepatotoxicity: diminution of oxidative stress. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. **15(2)**: 155-160.
- Chandra S, Mondal D, Agrawal KC (2009). HIV-1 protease inhibitor induced oxidative stress suppresses glucose stimulated insulin release: protection with thymoquinone. *Experimental biology and medicine*. **234**: 442–453.
- Chehl N, Chipitsyna G, Gong Q, Yeo CJ, Arafat HA (2009). Anti-inflammatory effects of the Nigella sativa seed extract, thymoquinone, in pancreatic cancer cells. *The official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*. **11(5)**: 373-381.
- Chenevier-Gobeaux C, Lemarechal H, Bonnefont-Rousselot D, Poiraudau S, Ekindjian OG, Borderie D (2006). Superoxide production and NADPH oxidase expression in human rheumatoid synovial cells: regulation by interleukin-1 $\beta$  and tumour necrosis factor- $\alpha$ . *Inflammation Research*. **55(11)**: 483–490

- Cho YG, Cho ML, Min SY, Kim HY (2007). Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. *Autoimmune Revue*. **7** : 65-70.
- Chopra P, Roy S, Ramalingaswami V, Nayak NC (1972). Mechanism of carbon tetrachloride hepatotoxicity. An in vivo study of its molecular basis in rats and monkeys. *Laboratory Investigation*. **26**: 716-727.
- Choy EH, Panayi GS (2001). Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine*. **344**: 907-916.
- Ciaccio M, Riccio A (1995). Contribution of vitamin A to the oxidation resistance of human low density lipoproteins. *Free Radical Biology and Medicine*. **18**: 401-409.
- Cimen MY, Cimen OB, Kacmaz M, Ozturk HS, Yorgancioglu R, Durak I (2000). Oxidant/antioxidant status of the erythrocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology*. **19(4)**: 275-7.
- Clark J (2005). What does tumour necrosis factor excess do to the immune system long term?. *Annals of the Rheumatic Diseases*. **64**: 70-76.
- Cohen-Solal M, de Vernejoul MC (2005). Perte osseuse de la polyarthrite rhumatoïde. *Revue du Rhumatisme*. **72** : 365-369.
- Conso F, Hermouet C (1993). Maladies hépatiques toxiques d'origine professionnelle. Encyclopédie médico-chirurgicale. Toxicologie-Pathologie professionnelle, Editions techniques, Elsevier, Paris. pp : 7.
- Custodio JM, Wu CY, Benet LZ (2008). Predicting drug disposition, absorption/elimination/transporter interplay and the role of food on drug absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **60**: 717 - 733.
- Daba MH, Abdel-Rahman MS (1998). Hepatoprotective activity of thymoquinone in isolated rat hepatocytes, *Toxicology Letters*. **95**: 23-29.
- Dai L, Lamb DJ, Leake DS, Kus ML, Jones HW, Morris CJ, Winyard PG (2000). Evidence for oxidised low density lipoprotein in synovial fluid from rheumatoid arthritis patients. *Free Radical Research*. **32**: 479-86.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*. **329**: 23-38.
- Dalton TP, Shertzer HG, Puga A (2002). Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Signalling*. **14**: 879.
- Dang PM, Stensballe A, Boussetta T, Raad H, Dewas C, Kroviarski Y, Hayem G, Jensen ON, Gougerot-Pocidallo MA, El-Benna J (2006). A specific p47phox -serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *Journal of Clinical Investigation*. **116**: 2033-2043.
- Darakhshan S, Bidmeshki PA, Hosseinzadeh CA, Sisakhtnezhad S (2015). Thymoquinone and its therapeutic potentials. *Pharmacological research*. **95**: 138-158.
- Dayer JM, Beutler B, Cerami A (1985). Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *Journal of Experimental Medicine*. **162**: 2163-8.
- Dayer J.M (2003). The pivotal role of interleukin-1 in the clinical manifestations of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. **42(2)** : ii3-10.
- De Andrade Belo MA, Soares VE, de Souza LM, da Rosa Sobreira MF, Silveira Cassol DM, Toma SB (2012). Hepatoprotective treatment attenuates oxidative damages induced by carbon tetrachloride in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*. **64**: 155-165.
- Dekkers JS, Verheul MK, Stoop JN, Liu B, Ioan-Facsinay A, van Veelen PA, de Ru AH, Janssen GMC, Hegen M, Rapecki S, Huizinga TWJ, Trouw LA, Toes REM (2017). Breach of autoreactive B cell tolerance by post-translationally modified proteins. *Annals of the Rheumatic Diseases*. **76**: 1449-1457.
- Dergarabetian EM, Ghattass KI, El-Sitt SB, Al-Mismar RM, El-Baba CO, Itani WS, Melhem NM, El-Hajj HA, Bazarbachi AA, Schneider-Stock R, Gali-Muhtasib HU (2013). Thymoquinone induces apoptosis in malignant T-cells via generation of ROS. *Frontiers in bioscience*. **5**: 706-719.
- Devasagayam TBA, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD (2004). Free radical and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Journal of the Association of Physicians of India*. **52**: 794-804.

- Dhiman RK, Chawla YK (2008). Minimal hepatic encephalopathy: time to recognise and treat, *Trop. Gastroenterology*. **29**: 6-12.
- Di W, Chang Y, Wu YJ, Wei W (2011). Research progress on B cell surface molecules targeted therapy in rheumatoid arthritis. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*. **42**:175-80.
- Dolhain, RJ, van der Heiden AN, ter Haar NT, Breedveld FC, Miltenburg AM (1996). Shift toward T lymphocytes with a T helper 1 cytokine-secretion profile in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. **39**: 1961-1969.
- Dooley JS, Lok ASF, Burroughs AK, Heathcote EJ (2011). *Sherlock's diseases of the liver and biliary system*, 12<sup>th</sup> ed, Blackwell science, John Wiley & Sons, Ltd, Milan, Italy. pp: 254.
- Draper HH, Hardley M (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*. **186** : 421-431.
- Dumontet E, Bigot-Corbel E (2012). Physiopathologie de l'atteinte osseuse et articulaire dans la polyarthrite rhumatoïde. *Elsevier Masson SAS*. **446**: 65-72.
- Durie FH, Fava RA, Noelle RJ (1994). Collagen-induced arthritis as a model of rheumatoid arthritis. *Clinical Immunology and Immunopathology*. **73**: 11-18.
- El-Badry AM, Moritz W, Contaldo C, Tian Y, Graf R, Clavien PA (2007). Prevention of reperfusion injury and microcirculatory failure in macrosteatotic mouse liver by omega-3 fatty acids. *Hepatology*. **45**: 855 - 863.
- Elbarbry F, Ragheb A, Marfleet T, Shoker A (2012). Modulation of hepatic drug metabolizing enzymes by dietary doses of thymoquinone in female New Zealand White rabbits. *Phytotherapy research*. **26(11)**: 1726-1730.
- El-Dakhakhny M (1963). Studies on the chemical constitution of egyptian nigella sativa l. Oil. *Planta Medica*. **11(4)**: 465-470.
- El-Dakhakhny M (1965). Studies on the Egyptian Nigella sativa L. Some pharmaco-logical properties of the seeds' active principle in comparison to its dihydrocompound and its polymer, *Arzneimittelforschung*. **15**: 1227-1229.
- El Gazzar M, El Mezayen R, Marecki JC, Nicolls MR, Canastar A, Dreskin SC (2006a). Anti-inflammatory effect of thymoquinone in a mouse model of allergic lung inflammation. *International immunopharmacology*. **6(7)**: 1135-1142.
- El Gazzar M, El Mezayen R, Nicolls MR, Marecki JC, Dreskin SC (2006b). Downregulation of leukotriene biosynthesis by thymoquinone attenuates airway inflammation in a mouse model of allergic asthma. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. **1760 (7)**: 1088-1095.
- Elizabeth K, Rao MNA (1990). Oxygen radical scavenging activity of curcumin. *International Journal of Pharmaceutics*. **58**: 237-240.
- Ellman GL (1959). Tissue sulphhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **82**: 70-77.
- El-Mahmoudy A, Shimizu Y, Shiina T, Matsuyama H, El-Sayed M, Takewaki T (2005). Successful abrogation by thymoquinone against induction of diabetes mellitus with streptozotocin via nitric oxide inhibitory mechanism. *International immunopharmacology*. **5(1)**: 195-207.
- El Mezayen R, El Gazzar M, Nicolls MR, Marecki JC, Dreskin SC, Nomiyama H (2006). Effect of thymoquinone on cyclooxygenase expression and prostaglandin production in a mouse model of allergic airway inflammation. *Immunology Letters*. **106**: 72-81.
- El-Najjar N, Chatila M, Moukadem H, Vuorela H, Ocker M, Gandesiri M, Schneider-Stock R, Gali-Muhtasib H (2010). Reactive oxygen species mediate thymoquinone-induced apoptosis and activate ERK and JNK signaling. *Apoptosis*. **15(2)**: 183-195.
- EL-Tawil OS, Moussa SZ (2006). Antioxidant and hepatoprotective effects of thymoquinone against carbon tetrachloride- induced hepatotoxicity in isolated rat hepatocytes. *The Egyptian Society of Toxicology*. **34**: 33-41.
- Evans JR (2006). Antioxidant vitamin and mineral supplements for slowing the progression of age-related macular degeneration. *Cochrane Database System Review*. **19**: 254.

- Fararh KM, Shimizu Y, Shiina T, Nikami H, Ghanem MM, Takewaki T (2005). Thymoquinone reduces hepatic glucose production in diabetic hamsters. *Research in Veterinary Science*. **79**: 219–223.
- Farida T, Salawu OA, Tijani AY, Ejiofor JI (2012). Pharmacological evaluation of *Ipomoea asarifolia* (Desr.) against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. **142(3)**: 642- 646.
- Favier A (2003). Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. novembre-décembre. 108-115.
- Fiedman LS, Keefe EB (2004). Handbook of liver diseases, 2<sup>nd</sup> ed, Churchill Livingstone, Philadelphia. pp:1-16.
- Fouda AM, Daba MH, Dahab GM, Sharaf El-Din OA (2008). Thymoquinone ameliorates renal oxidative damage and proliferative response induced bymercuric chloride in rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. **103**: 109–118.
- Francis GA, Fayard E, Picard F, Auwerx J (2003). Nuclear receptors and the control of metabolism. *Annual review of physiology*. **65**: 261 - 311.
- Friedl HP, Till GO, Ryan US, Ward PA (1989). Mediator-induced activation of xanthine oxidase in endothelial cells. *Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*. **3**: 2512-2518.
- Fromenty B, Lettéron P, Pessayre D (2003). Aspects physiopathologiques. *La lettre de l'hépatogastroentérologue*. **6** : 12 - 17.
- Fulbert JC, Cals MJ (1992). Les Radicaux libres en biologie clinique. *Pathologie Biologie*. **49**: 66-77.
- Gali-Muhtasib H, Diab-Assaf M, Boltze C, Al-Hmaira J, Hartig R, Roessner A, Schneider-Stock R (2004a). Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism. *International journal of oncology*. **25(4)**: 857-866.
- Gali-Muhtasib HU, Abou Kheir WG, Kheir LA, Darwiche N, Crooks PA (2004b). Molecular pathway for thymoquinone-induced cell cycle arrest and apopto-sis in neoplastic keratinocytes. *Anticancer Drugs*. **15**: 389–399.
- Gali-Muhtasib H, Ocker M, Kuester D, Krueger S, El-Hajj Z, Diestel A, Evert M, El-Najjar N, Peters B, Jurjus A, Roessner A, Schneider-Stock R (2008). Thymoquinone reduces mouse colon tumor cell invasion and inhibits tumor growth in murine colon cancer models. *Journal of cellular and molecular medicine*. **12(1)**: 330-342.
- Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z, Jore D (2003). Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ?. *L'actualité chimique*. **11 (12)** : 91-96.
- Germain E, Bonnet P, Aubourg L, Grangepon MC, Chajès V, Bougnoux P (2003). Anthracycline-induced cardiac toxicity is not increased by dietary omega-3 fatty acids. *Pharmacological Research*. **47**: 111-117.
- Gholivand MB, Rahimi-Nasrabadi M, Batooli H, Ebrahimabadi AH (2010). Chemical composition and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of *Psammogeton Canescens*. *Food chemical toxicology*. **48**: 24-28.
- Ghozlani I, Achemlal L, Rezqi A, Mounach A, Bezza A, El Maghraoui A (2012). Physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde. *Revue Marocaine de Rhumatologie*. **19** : 6-9.
- Girard A, Madani S, Boukourt F, Cherkaoui-Malki M, Belleville J, Prost J (2006). Fructose enriched diet modifies antioxidant status and lipid metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Nutrition*. **22**: 758-766.
- Girish C, Pradhan SC (2012). Hepatoprotective activities of picroliv, curcumin, and ellagic acid compared to silymarin on carbon-tetrachloride-induced liver toxicity in mice. *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*. **3**: 149-155.
- Goel A, Dani V, Dhawan DK (2005). Protective effects of zinc on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and hepatic histoarchitecture in chlorpyrifos induced toxicity. *Chemico-Biological Interactions*. **156**: 131-140.

- Gohari AR, Ostad SN, Moradi-Afrapoli F, Malmir M, Tavajohi S, Akbari H, Saeidnia S (2012). Evaluation of the cytotoxicity of *Satureja spicigera* and its main compounds. *Scientific World Journal*. **2012**: 203861.
- Grassi D, Desideri G, Ferri C (2010). Flavonoids: antioxidants against atherosclerosis. *Nutrients*. **2**: 889-902.
- Griffiths MM, Cannon GW, Corsi T, Reese V, Kunzler K (2007). Collagen-Induced Arthritis in Rats, *Arthritis Research*. **2(15)**: 201-214.
- Grivennikova VG, Vinogradov AD (2013). Mitochondrial production of reactive oxygen species. *Biochemistry (Moscow)*. **78(13)**: 1490-1511.
- Grosso C, Figueiredo AC, Burillo J, Mainar AM, Urieta JS, Barroso JG, Coelho JA, Palavra AM (2010) Composition and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* volatiles: comparison between supercritical fluid extraction and hydrodistillation. *Journal of Separation Science*. **33(14)**: 2211–2218.
- Grootveld M, Henderson EB, Farrell A, Blake DR, Parkes HG, Haycock P (1991). Oxidative damage to hyaluronate and glucose in synovial fluid during exercise of the inflamed rheumatoid joint. Detection of abnormal low-molecular-mass metabolites by proton-n.m.r. spectroscopy. *Biochemical Journal*. **273**: 459-467.
- Guillemin F (2007). Rheumatoid arthritis and spondyloarthropathies: geographical variations in prevalence in France. *Journal of Rheumatology*. **34** : 117-22.
- Hadi M (2004). La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres ; études et applications thérapeutiques, Thèse pour obtenir le titre de docteur en Sciences de l'Université Louis Pasteur, Domaine : Pharmacochimie, Université Strasbourg I. pp: 155.
- Haleng J, Pincemail J, Defraigne JO, Charlier C, Chapelle JP (2007). Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liege*. **62 (10)**: 628-638.
- Halliwell B (2001). Role of free radicals in neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drug and Aging*. **18**: 685-716.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4<sup>th</sup> ed. Oxford university Press. pp: 20-31.
- Hammaker DR, Boyle DL, Inoue T, Firestein GS (2007). Regulation of the JNK pathway by TGF-beta activated kinase 1 in rheumatoid arthritis synoviocytes. *Arthritis Research & Therapy*. **9**: R57.
- Harrison R (2002). structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?. *Free Radical Biology & Medicine*. **33**: 774-797.
- Harzallah HJ, Neffati A, Skandrani I, Maaloul E, Chekir-Ghedira L, Mahjoub T (2010). Antioxidant and antigenotoxic activities of *Globularia alypum* leaves extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*. **4**: 2048–2053.
- Hattori Y (1989). Localization of xanthine dehydrogenase in chicken liver. *Acta Histochemica et Cytochemica*. **22**: 617–624.
- Hitchon CA, El-Gabalawy HS (2004). Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*. **6**: 265–278.
- Hoare C (2002). Xanthine oxidoreductase: cellular distribution and role in NO production. Doctoral dissertation, University of Bath, Bath, UK.
- Holmdahl R, Mo J, Nordling C, Larsson P, Jansson L, Goldschmidt T, Andersson M, Klareskog L (1989). Collagen induced arthritis: an experimental model for rheumatoid arthritis with involvement of both DTH and immune complex mediated mechanisms. *Clinical and experimental rheumatology*. **7(3)**: 51-55.
- Houghton PJ, Zarka R, Heras B, Hoults RS (1995). Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leucocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Medica*. **61**: 33–36.
- Hurkadale PJ, Shelar PA, Palled SG, Mandavkar YD, Khedkar AS (2012). Hepatoprotective activity of *Amorphophallus paeoniifolius* tubers against paracetamol-induced liver damage in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. **2**: S238 - S242.

- Hussain, J, Bukhari N, Hussain H, Rehman NU, Hussain SM (2010). Chemical constituents of *Nepeta distans*. *Natural product communications*. **5(11)**: 1785–1786.
- Hussain AR, Ahmed M, AhmedS, Manogaran P, Platanius LC, Alvi SN, Al-Kuraya KS, Uddin S (2011). Thymoquinone suppresses growth and induces apoptosis via generation of reactive oxygen species in primary effusion lymphoma. *Free Radical Biology and Medicine*. **50**: 978–987.
- Huang P, Feng L, Oldham EA, Keating MJ, Plunkett W (2000). Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. *Nature*. **407**: 390-395.
- Ichikawa M, Nishino T, Nishino T, Ichikawa A (1992). Subcellular localization of xanthine oxidase in rat hepatocytes. High resolution immunoelectron microscopic study combined with biochemical analysis. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. **40**:1097–1103.
- Imboden JB (2009). The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *The Annual Review of Pathology*. **4**:417-34.
- Ishida S, Yamane S, Nakano S, Yanagimoto T, Hanamoto Y, Maeda-Tanimura M, Toyosaki-Maeda T, Ishizaki J, Matsuo Y, Fukui N, Itoh T, Ochi T, Suzuki R (2009). The interaction of monocytes with rheumatoid synovial cells is a key step in LIGHT-mediated inflammatory bone destruction. *Immunology*. **128**: e315–e324.
- Ismail M, Al-Naqeep G, Chan KW (2010). *Nigella sativa* thymoquinone-rich fraction greatly improves plasma antioxidant capacity and expression of antioxidant genes in hypercholesterolemic rats. *Free radical biology & medicine*. **48(5)**: 664-672.
- Jackson AA, Gibson NR, Lu Y, Jahoor F (2004). Synthesis of erythrocyte glutathione in healthy adults consuming the safe amount of dietary protein. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **80(1)**: 101–107.
- Jaeschke H (2011). Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. **26(1)**: 173-179.
- Jafri SH, Glass J, Shi R, Zhang S, Prince M, Kleiner-Hancock H (2010). Thymoquinone and cisplatin as atherapeutic combination in lung cancer: *In vitro* and *in vivo*. *Journal of experimental & clinical cancer research*. **29**: 87.
- Jaswal S, Mehta HC, Sood AK, Kaur J (2003). Antioxidant status in rheumatoid arthritis and role of antioxidant therapy. *Clinica Chimica Acta*. **338(1-2)** : 123-9.
- Juarranz Y, Abad C, Martinez C, Arranz A, Gutierrez-Canas I, Rosignoli F, Gomariz RP, Leceta J (2005). Protective effect of vasoactive intestinal peptide on bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*. **7**: R1034–R1045
- Kabouche A, Kabouche Z, Ozturk M, Kolal U, Topcu G (2007). Antioxidant abietane diterpenoids from *Salvia barrelieri*. *Food Chemistry*. **102**: 1281–1287.
- Kaipainen-Seppanen O, Kautiainen H (2006). Declining trend in the incidence of rheumatoid factor-positive rheumatoid arthritis in Finland 1980-2000. *Journal of Rheumatology*. **33**: 2132-8.
- Kaipainen-Seppanen O, Aho K., Isomaki H, Laakso M (1996). Shift in the incidence of rheumatoid arthritis toward elderly patients in Finland during 1975-1990. *Clinical and Experimental Rheumatology*. **14**: 537-42.
- Kajanachumpol S, Vanichapuntu M, Verasertniyom O, Totemchokchayakarn K, Vatanasuk M (2000). Levels of plasma lipid peroxide products and antioxidant status in rheumatoid arthritis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. **31(2)**: 335-8.
- Kanter M (2008). Effects of *Nigella sativa* and its major constituent, thymoquinone on sciatic nerves in experimental diabetic neuropathy. *Neurochemical research*. **33(1)**: 87-96.
- Kanter M (2009). Protective effects of thymoquinone on streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Journal of molecular histology*. **40(2)**: 107-115.
- Karatas F, Ozates I, Canatan H, Halifeoglu I, Karatepe M, Colakt R (2003). Antioxidant status and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis. *Indian Journal of Medical Research*. **118**: 178-181.

- Kaseb AO, Chinnakannu K, Chen D, Sivanandam A, Tejwani S, Menon M, Dou QP, Reddy GP (2007). Androgen receptor-and E2F-1-targeted thymoquinone therapy for hormone refractory prostate cancer. *Cancer Research*. **67**: 7782–7788.
- Keenan TW (2001). Milk lipid globules and their surrounding membrane: a brief history and perspectives for future research. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. **6**: 365-371.
- Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D, Kollias G (1991). Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *The Journal of the European Molecular Biology Organization*. **10**: 4025.
- Kelley EE (2015). A new paradigm for XOR-catalyzed reactive species generation in the endothelium. *Pharmacological Reports*. **67(4)**: 669-674.
- Khalife KH, Lupidi G (2007). Nonenzymatic reduction of thymoquinone in physiological conditions. *Free radical research*. **41(2)**: 153-161.
- Khalife KH, Lupidi G (2008). Reduction of hypervalent states of myoglobin and hemoglobin to their ferrous forms by thymoquinone: the role of GSH, NADH and NADPH. *Biochimica et biophysica acta*. **1780(4)**: 627-637.
- Khan MA, Ashfaq MK, Zuberi HS, Mahmood MS, Gilani AH (2003). The in vivo antifungal activity of the aqueous extract from *Nigella sativa* seeds. *Phytotherapy Research*. **17**: 183–186.
- Khan S, Greenberg JD, Bhardwaj N (2009). Dendritic cells as targets for therapy in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*. **5** : 566-571.
- Kierszenbaum AL (2006). Histologie et biologie cellulaire, 1<sup>er</sup> Edition, de Boeck. Bruxelles. Belgique. pp: 619.
- Kim WU, Cho ML, Jung YO, Min SY, Park SW, Min DJ, Yoon JH, Kim HY (2004). Type II collagen autoimmunity in rheumatoid arthritis. *American Journal of the Medical Sciences*. **327**: 202-211.
- Kinne RW, Brauer R, Stuhlmüller B, Palombo-Kinne E, Burmester GR (2000). Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis research*. **2(3)**: 189–202.
- Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Källberg H, Bengtsson C, Grunewald J, Rönnelid J, Harris HE, Ulfgren AK, Rantapää-Dahlqvist S, Eklund A, Padyukov L, Alfredsson L (2006). A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)- restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis & Rheumatology*. **54**: 38-46.
- Klareskog L, Catrina AI, Paget S (2009). Rheumatoid arthritis. *Lancet*. **373**: 659-72. 119.
- Klein A, Zhadkewich M, Margolick J, Winkelstein J, Bulkley G (1994). Quantitative discrimination of hepatic reticuloendothelial clearance and phagocytic killing. *Journal of leukocyte biology*. **55**: 248–252.
- Knolle PA, Gerken G (2000). Local control of the immune response in the liver. *Immunological Reviews*. **174**: 21-34.
- Knolle PA, Limmer A, (2003). Control of immune responses by scavenger liver endothelial cells. *Swiss Medical Weekly*. **133**: 501-506.
- Koka PS, Mondal D, Schultz M, Abdel-Mageed AB, Agrawal KC (2010). Studies on molecular mechanisms of growth inhibitory effects of thymoquinone against prostate cancer cells: role of reactive oxygen species. *Experimental biology and medicine*. **235(6)**: 751-760.
- Kokoska L, Havlik J, Valterova I, Sovova H, Sajfritova M, Jankovska I (2008). Comparison of chemical composition and antibacterial activity of *Nigella sativa* seed essential oils obtained by different extraction methods. *Journal of Food Protection*. **71**: 2475–2480.
- Koller A (1984). Total serum protein. In Kaplan LA, Presce AJ, eds. *Clinical Chemistry, Theory, Analysis, and Correlation*. 5<sup>th</sup> ed, St. Louis: Mosby Company. pp: 1316-1319.
- Kouidhi B, Zmantar T, Jrah H, Souiden Y, Chaieb K, Mahdouani K, Bakhrouf A (2011). Antibacterial and resistance-modifying activities of thymoquinone against oral pathogens. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. **10**: 29.
- Kumawat R, Sharma S, Vasudeva N, Kumar S (2012). In vivo anti-inflammatory potential of various extracts of *Sida tiagii* Bhandari. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. **2**: S947- S952.

- Kurosaki M, Li Calzi M, Scanziani E, Garattini E, Terao M (1995). Tissue and cellspecific expression of mouse xanthine oxidoreductase gene *in vivo*: regulation by bacterial lipo polysaccharide. *Biochemical Journal*. **306**: 225-234.
- Kvien TK, Uhlig T, Odegard S, Heiberg MS (2006). Epidemiological aspects of rheumatoid arthritis: the sex ratio. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1069**: 212-22.
- Kwoh CK, Venglish C, Lynn AH, Whitley DM, Young E, Chakravarti A (1996). Age, sex, and the familial risk of rheumatoid arthritis. *The American Journal of Epidemiology*. **144**: 15-24.
- Lagouge M, Larsson NG (2013). The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing. *Journal of internal medicine*. **273**: 529-543.
- Le K, Chiu F, Ng K (2007). Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*. **105**: 353-363.
- Lebba F, Di Sora F, Tarasi A, Leti W, Montella F (2011). Rheumatoid arthritis: a typical multifactorial genetic disease: review of the literature. *Recenti progressi in medicina*. **102**:175-82.
- Lee YH, Bae SC (2017). Associations between circulating IL-17 levels and rheumatoid arthritis and between IL-17 gene polymorphisms and disease susceptibility: a meta-analysis. *Postgraduate Medical Journal*. **93**: 465-471.
- Lefevre S, Knedla A, Tennie C, Kampmann A, Wunrau C, Dinser R, Korb A, Schnäker EM, Tarner IH, Robbins PD, Evans CH, Stürz H, Steinmeyer J, Gay S, Schölmerich J, Pap T, Müller-Ladner U, Neumann E (2009). Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nature Medecine*. **15**: 1414-20.
- Lemarechal H, Allanore Y, Chenevier-Gobeaux C, Kahan A, Ekindjian OG, Borderie D (2006). Serum protein oxidation in patients with rheumatoid arthritis and effects of infliximab therapy. *Clinica Chimica Acta*. **372**: 147-153.
- Li F, Rajendran P, Sethi G (2010). Thymoquinone inhibits proliferation, inducesapoptosis and chemosensitizes human multiple myeloma cells through sup-pression of signal transducer and activator of transcription 3 activationpathway. *British Journal of Pharmacology*. **161**: 541–554.
- Liau KH, Blumgart LH, DeMatteo RP (2004). Segment-oriented approach to liver resection. *Surgical Clinics of North America*. **84**: 543-561.
- Lin HM, Tseng HC, Wang CJ, Lin JJ, Lo CW, Chou FP (2008). Hepatoprotective effects of Solanum nigrum Linn extract against CCl<sub>4</sub>-induced oxidative damage in rats. *Chemico-Biological Interactions*. **171(3)**: 283-293.
- Liu H, Liu HY, Jiang YN, Li N (2016). Protective effect of thymoquinone improves cardiovascular function, and attenuates oxidative stress, inflammation and apoptosis by mediating the PI3K/Akt pathway in diabetic rats. *Molecular medicine reports*. **13(3)**: 2836-2842.
- Lukas B, Schmiderer C, Franz C, Novak J (2009). Composition of essential oil compounds from different Syrian populations of *Origanum syriacum* L. (Lamiaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **57**: 1362–1365.
- Lutzky V, Hannawi S, Thomas R (2007). Cells of the synovium in rheumatoid arthritis Dendritic cells. *Arthritis Research and Therapy*. **9(4)**: 219.
- Maillefert JF, Combe B, Goupille P, Cantagrel A, Dougados M (2003). Long term structural effects of combination therapy in patients with early rheumatoid arthritis: five year follow up of a prospective double blind controlled study. *Annals of the Rheumatic Diseases*. **62**: 764-6.
- Mahmoudvand H, Sepahvand A, Jahanbakhsh S, Ezatpour B, AyatollahiMousavi SA (2014). Evaluation of antifungal activities of the essential oil and variousextracts of *Nigella sativa* and its main component, thymoquinone againstpathogenic dermatophyte strains. *Journal de Mycologie Médicale*. **24** : 155–161.
- Malarkey DE, Johnson K, Ryan L, Boorman G, Maronpot RR (2005). New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicologic Pathology*. **33**: 27-34.
- Manibusan MK, Odin M, Eastmond DA (2007). Postulated carbon tetrachloride mode of action: a review. *Journal of environmental science & health*. **25**:185-209.

- Mansour MA, Ginawi OT, El-Hadiyah T, El-Khatib AS, Al-Shabanah OA, Al-Sawaf HA (2001). Effects of volatile oil constituents of *Nigella sativa* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice: evidence for antioxidant effects of thymoquinone. *Research communications in molecular pathology & pharmacology*. **110**: 239–251.
- Mansour MA, Nagi MN, El-Khatib AS, Al-Bekairi AM (2002). Effects of thymoquinone on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation and DT-diaphorase in different tissues of mice: a possible mechanism of action. *Cell Biochemistry and Function*. **20**(2): 143-51.
- Manter DK, Kelsey RG, Karchesy JJ (2007) Antimicrobial activity of extractable conifer heartwood compounds toward *Phytophthora ramorum*. *Journal of Chemical Ecology*. **33**: 2133–2147.
- Martin HM, Hancock JT, Vyv Salisbury, Harrison R (2004). Role of Xanthine Oxidoreductase as an Antimicrobial Agent. *Infection and Immunity*. **72**: 4933- 4939.
- Marklund SL (1982). Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. **79**: 7634-7638.
- Marklund SL, Holme E, Hellner L (1982). Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clinica Chimica Acta*. **126**(1):41-51.
- Masuda T, Shingai Y, Takahashi C, Inai M, Miura Y, Honda S, Masuda A (2014). Identification of a potent xanthine oxidase inhibitor from oxidation of caffeic acid. *Free Radical Biology and Medicine*. **69**: 300-307.
- Masuda T, Nojima S, Miura Y, Honda S, Masuda A (2015). An oxidative coupling product of luteolin with cysteine ester and its enhanced inhibitory activity for xanthine oxidase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **25** (16): 3117-3119.
- Mates JM, Perez-Gomez C, De Castro IN (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*. **32**: 595-603.
- McCay PB, Lai EK, Poyer JL, DuBose CM, Janzen EG (1984). Oxygen and carbon-centred free radical formation during carbon tetrachloride metabolism. *Journal of Biological Chemistry*. **259**: 21352-21353.
- McCuskey RS, Sipes IG (1997). Introduction to the liver and its response to toxicants. *Comprehensive Toxicology Journal*. **9**: 1-10.
- Mena S, Ortega A, Estrela JM (2009). Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutation Research*. **674**: 36-44.
- Meneshian A, Bulkley GB (2002). The physiology of endothelial xanthine oxidase: from urate catabolism to reperfusion injury to inflammatory signal transduction. *Microcirculation*. **9**: 161–175.
- Mezes M, Bartosiewicz G (1983). Investigations on vitamin E and lipid peroxide status in rheumatic diseases. *Clinical Rheumatology*. **2**(3): 259-63.
- Miesel R, Zuber M (1993). Elevated levels of xanthine oxidase in serum of patients with inflammatory and autoimmune rheumatic diseases. *Inflammation*. **17**: 551–561.
- Mikuls TR, Payne JB, Reinhardt RA, Thiele GM, Maziarz E, Cannella AC, Holers VM, Kuhn KA, O'Dell JR (2009). Antibody responses to *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) in subjects with rheumatoid arthritis and periodontitis. *International Immunopharmacology*. **9** : 38-42.
- Milane H (2004). La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres ; études et applications thérapeutiques. Thèses de doctorat, Université Louis Pasteur.
- Miossec P, Korn T, Kuchroo VK (2009). Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *The New England Journal of Medicine*. **361**: 888-898.
- Moller P, Wallin H, Knudsen LE (1996). Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chemico-Biological Interaction*. **102** : 17-36.
- Monfort AAF (2016). Les médicaments responsables d'hépatotoxicité chez les animaux de compagnie. Thèse pour le doctorat vétérinaire. Ecole nationale vétérinaire d'Alfort. pp: 26-27.
- Mulherin DM, Thurnham DI, Situnayake RD (1996). Glutathione reductase activity, riboflavin status, and disease activity in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. **55**: 837-40.

- Nandy S, Shekhar H P, Ranjan BN, Chakraborty B (2012). *In vitro* evaluation of antioxidant activity of *Leucas plukenetii* (Roth) Spreng. *Asian Journal of Plant Science and Research*. **2** (3): 254-262.
- Nagi MN, Alam K, Badary OA, Al-Shabanah OA, al-Sawaf HA, al-Bekairi AM (1999). Thymoquinone protects against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice via an antioxidant mechanism. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology International*. **47**(1): 153-159.
- Nagi MN, Mansour MA (2000). Protective Effect of Thymoquinone against Doxorubicin-induced Cardiotoxicity in Rats: A Possible Mechanism of Protection. *Pharmacological Research*. **41**: 283–289.
- Nagi MN, Almakki HA (2009). Thymoquinone supplementation induces quinone reductase and glutathione transferase in mice liver: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Phytotherapy research*. **23**: 1295–1298.
- Nakajima K, Nakano T, Tanaka A (2006). The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: The comparison of atherogenic effects on oxidized LDL and remnant lipoproteins in plasma. *Clinica Chimica Acta*. **367** : 36-47.
- Naidu MM, Sulochanamma G, Sampathu SR, Srinivas P (2008). Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee. *Food Chemistry*. **107**: 377-384.
- Natesan V, Mani R, Arumugam R (2016). Review Clinical aspects of urea cycle dysfunction and altered brain energy metabolism on modulation of glutamate receptors and transporters in acute and chronic hyperammonemia. *Biomed Pharmacother*. **81**: 192-202.
- Navarro VJ, Senior JR (2006). Drug-related hepatotoxicity. *New England Journal of Medicine*. **354**: 731- 739.
- Naziroglu M, Cay M, Ustundag B, Aksakal M, Yekeler H (1999). Protective effects of vitamin E on carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. *Cell Biochemistry and Function*. **17**: 253-259.
- Night JA (1999). The aging process. In: Free Radicals, Antioxidants, Aging, and Disease. AACC Press, Washington, DC. p. 64.
- Nili-Ahmadabadi A, Tavakoli F, Hasanzadeh GR, Rahimi HR, Sabze-vari O (2011). Protective effect of pretreatment with thymoquinone against AflatoxinB1 induced liver toxicity in mice. *DARU*. **19**: 282–287.
- Nimse SB, Pal D (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *Royal Society of Chemistry Advances*. **5**: 27986–28006.
- Nkosi CZ, Opoku AR, Terblanche SE (2005). Effect of pumpkin seed (*Cucurbita pepo*) protein isolate on the activity levels of certain plasma enzymes in CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in low protein fed rats. *Phytotherapy Research*. **19**: 341-345.
- Odeh F, Ismail SI, Abu-Dahab R, Mahmoud IS, Al Bawab A (2012). Thymoquinone in liposomes: a study of loading efficiency and biological activity towards breast cancer. *Drug Delivery*. **19**(8): 371-377.
- Okado-Matsumoto A, Fridovich I (2001). Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu, Zn-SOD mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*. **276**: 38388-38393.
- Olsson LM, Nerstedt A, Lindqvist AK, Johansson SC, Medstrand P, Olofsson P, Holmdahl R (2012). Copy number variation of the gene NCF1 is associated with rheumatoid arthritis. *Antioxidants & Redox Signaling*. **16**:71-8.
- O'Mahony JA, Fox PF, Kelly AL (2013). Indigenous enzymes of milk advanced dairy chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects. 4<sup>th</sup> Edition, Springer Science, New York. pp: 337-385.
- Omran OM (2014). Effects of thymoquinone on STZ-induced diabetic nephropathy: an immunohistochemical study. *Ultrastructural pathology*. **38**(1): 26-33.
- Ostałowska A, Koczy B, Słowińska L, Kasperczyk A, Dobrakowski M, Błaszczuk U, Stołtny T, Birkner E, Kasperczyk S (2016). Oxidative stress and enzymatic antioxidant status of blood and synovial fluid in rheumatoid arthritis patients. *Annales Academiae Medicae Silesiensis*. **70**: 196–205.
- Ozen T, Demirtas I, Aksit H, (2011). Determination of antioxidant activities of various extracts and essential oil compositions of *Thymus praecox* subsp. *scorpilii* var. *scorpilii*. *Food Chemistry*. **124**: 58-64.
- Ozkan Y, Yardym-Akadyın S, Sepici A, Keskin E, Sepici V, Simsek B (2007). Oxidative status in rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology*. **26**(1): 64–68.

- Pacher P, Nivorozhkin A, Szabo C (2006). Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacological Reviews*. **58**: 87–114.
- Packer L (1997). Vitamin C and redox cycling antioxidants. In: Vitamin C in health and disease. Eds Packer L and Fuchs J. Marcel Dekker Inc, New York. pp: 95-121.
- Packer L, Weber SU, Rimbach G (2001). Molecular aspects of  $\alpha$ -tocotrienol antioxidant action and cell signalling. *Journal of Nutrition*. **31**: 369-373.
- Pari L, Sankaranarayanan C (2009). Beneficial effects of thymoquinone on hepatic enzymes in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Life Sciences*. **85**: 830–834
- Park JY, Pillinger MH (2007) Interleukin-6 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases*. **65**(1): 4-10.
- Parker RS (1996). Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *FASEB Journal*. **10**: 542–551.
- Perez HD, Weksler BB, Goldstein IM (1990). Generation of a chemotactic lipid from arachidonic acid by exposure to a superoxide generating system. *Inflammation*. **4**: 313- 328.
- Pérez-Pérez E, Vit P, Huq F (2013). Flavonoids and polyphenols in studies of honey antioxidant activity. *International Journal of Medicinal Plant and Alternative Medicine*. **1**(4): 63-72.
- Pessayre D, Haouzi D, Fau D, Robin MA, Mansouri A, Berson A (1999). Withdrawal of life support, altruistic suicide, fratricidal killing and euthanasia by lymphocytes: different forms of drug-induced hepatic apoptosis. *Journal of Hepatology*. **31** : 760-70.
- Pincemail J, Meurisse M, Limet R, Defraigne J (1999). Evaluation du stress oxydant : une réalité pour le médecin généraliste. *Vaisseaux, Coeur, Poumon*. **4** : 148-154.
- Pincemail J, Siquet J, Chappelle JP (2000). Evaluation des concentrations plasmatiques en antioxydants anticorps contre les LDL oxydées et homocysteine dans un échantillon de la population liégeoise. *Annales de Biologie Clinique*. **58** : 178-185.
- Piras A, Rosa A, Marongiu B, Porcedda S, Falconieri D, Dessi MA, Ozcelik B , Koca U (2013). Chemical composition and in vitro bioactivity of the volatile and fixed oils of *Nigella sativa* L. extracted by supercritical carbon dioxide. *Industrial Crops and Products*. **46**: 317–323.
- Plaa GL, Charbonneau M (2001). Detection and evaluation of chemically induced liver injury. In principles and methods of toxicology, 4<sup>th</sup> ed, ed. A. Wallace. Hayes, Philadelphia: Taylor & Francis. pp: 1145 – 1187.
- Prasad KN, Yang B, Dong X, Jiang G, Zhang H, Xie H (2009). Flavonoid contents and antioxidant activities from Cinnamomum species. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. **10**(4): 627-632.
- Prete M, Racanelli V, Digiglio L, Vacca A, Dammacco F, Perosa F (2011). Extraarticular manifestations of rheumatoid arthritis: An update. *Autoimmunity Reviews*. **11**:123-31.
- Pol S (2009). ANRS HC 02 RIBAVIC : Impact de la stéatose au cours de la co-infection VHC-VIH. *Gastroentérologie clinique et biologique*. **33**: S110 - S112.
- Polzer K, Baeten D, Soleiman A, Distler J, Gerlag DM, Tak PP, Schett G, Zwerina J (2008). Tumour necrosis factor blockade increases lymphangiogenesis in murine and human arthritic joints. *Annals of the Rheumatic Diseases*. **67**:1610– 1616.
- Powers SK, Lennon SL (1999). Analysis of cellular response to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *The Nutrition Society*. **58**: 1025-1033.
- Quirke AM, Fisher BA, Kinloch AJ, Venables PJ (2011). Citrullination of autoantigens: upstream of TNF $\alpha$  in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. **85**: 3681-8.
- Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K (2014). Oxidative stress, prooxidants and antioxidants: the interplay. *BioMed Research International*. **2014**: 1-19.
- Rajput S, Kumar BN, Dey KK, Pal I, Parekh A, Mandal M (2013). Molecular targeting of Akt by thymoquinone promotes G (1) arrest through translationinhibition of cyclin D1 and induces apoptosis in breast cancer cells. *Life Sciences*. **93**: 783–790.

- Randhawa MA (2011). In vitro antituberculous activity of thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa*. *Journal of Ayub Medical College*. **23**: 78–81.
- Recknagel RO, Glende, EAJ, Dolak JA, Waller AR (1989). Mechanism of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacology & Therapeutics*. **43**: 139- 154.
- Rees MD, Hawkins CL, Davies MJ (2004). Hypochlorite and superoxide radicals can act synergistically to induce fragmentation of hyaluronan and chondroitin sulphates. *Biochemical Journal*. **381**: 175-84.
- Richard M, John E (2007). Methods of modulating inflammatory reactions by modulating xanthine oxidoreductase activity. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. **60**: 505-922.
- Ríos-Arrabal S, Artacho-Cordón F, León J, Román-Marinetto E, Salinas-Asensio MM, Calvente I, Núñez MI (2013). Involvement of free radicals in breast cancer. *Springer plus*. **2(404)**: 1-12.
- Rivollier A, Mazzorana M, Tebib J, Piperno M, Aitsiselmi T, Raboutin-Combe C, Jurdic P, Servet-Delprat C (2004). Immature dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts: a novel pathway sustained by the rheumatoid arthritis microenvironment. *Blood*. **104**: 4029–37.
- Rodés J, Benhamou J-P, Blei A, Reichen J, Rizzetto M (2007). Textbook of Hepatology: From Basic Science to Clinical Practice, 3<sup>rd</sup> edition, Wiley-Blackwell Publishing, Malden. pp:9-19.
- Roepke M, Diestel A, Bajbouj K, Walluscheck D, Schonfeld P, Roessner A, Schneider-Stock R, Gali-Muhtasib H (2007). Lack of p53 augments thymoquinone-induced apoptosis and caspase activation in human osteosarcoma cells. *Cancer biology & therapy*. **6(2)**: 160-169.
- Rooney S, Ryan MF (2005). Effects of alpha-hederin and thymoquinone, constituents of *Nigella sativa*, on human cancer cell lines. *Anticancer research*. **25(3)**: 2199-2204.
- Ruch RJ, Cheng SJ, Klaunig JE (1989). Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*. **10**: 1003–1008.
- Saad AF, Virella G, Chassereau C, Boackle RJ, Lopes-Virella MF (2006). OxLDL immune complexes activate complement and induce cytokine production by MonoMac 6 cells and human macrophages. *Journal of Lipid Research*. **47**: 1975-1983.
- Saba AB, Oyagbemi AA, Azeez OI (2010). Amelioration of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity and haemotoxicity by aqueous leaf extract of *Cnidioscolus aconitifolius* in rats. *Nigerian Journal of Physiological Sciences*. **25**: 139 - 147.
- Saber T, Veale DJ, Balogh E, McCormick J, NicAnUltaigh S, Connolly M, Fearon U (2011). Toll-like receptor 2 induced angiogenesis and invasion is mediated through the Tie2 signalling pathway in rheumatoid arthritis. *PLoS One*. **6(8)**: 23540.
- Sahu SC (2007). Hepatotoxicity. From Genomics to *in vitro* and *in vivo* Models. John Wiley & Sons Ltd. pp: 191-635.
- Salido M, Rosado JA (2009). Apoptosis: involvement of oxidative stress and intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis genes. *Springer Science and Business Media*. pp: 1-17.
- Salmani JM, Asghar S, Lv H, Zhou J (2014). Aqueous solubility and degradation kinetics of the phytochemical anticancer thymoquinone; probing the effects of solvents, pH and light, *Molecules*. **19**: 5925–5939.
- Schett G, Stach C, Zwerina J, Voll R, Manger B (2008). How antirheumatic drugs protect joints from damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology*. **58**: 2936–2948.
- Schiller J, Fuchs B, Arnold J, Arnold K (2003). Contribution of reactive oxygen species to cartilage degradation in rheumatic diseases: molecular pathways, diagnosis and potential therapeutic strategies. *Current Medicinal Chemistry*. **10**: 2123–2145.
- Schlesier K, Harwat M, Bohm V, Bitsch R (2002). Assessment of antioxidant activity by using different *in vitro* methods. *Free Radical Research*. **36**: 177-87.
- Schmidt D, Goronzy JJ, Weyand CM (1996). CD4+ CD7-CD28-T cells are expanded in rheumatoid arthritis and are characterized by autoreactivity. *Journal of Clinical Investigation*. **97**: 2027-2037.
- Schreck R, Baeuerle PA (1991). A role for oxygen radicals as second messengers. *Trends in Cellular Biology*. **1**: 39-42.

- Sedlak J, Lindsay RH (1968). Estimation of total protein bound and non-protein bound sulfhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*. **25**: 192-205.
- Sentman ML, Granstrom M, Jakobson H, Reaume A, Basu S, Marklund SL (2006). Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*. **281**: 6904-6909.
- Shakya AK, Sharma N, Saxena M, Shrivastava S, Shukla S (2012). Evaluation of the antioxidant and hepatoprotective effect of Majoon-e-Dabeed-ul-ward against carbon tetrachloride induced liver injury. *Experimental and Toxicologic Pathology*. **64**: 767-773.
- Shanmugam S, Thangaraj P, Lima BdS, Chandran R, de Souza Araújo AA, Narain N, Serafini MR, Quintans Júnior LJ (2016). Effects of luteolin and quercetin 3-b-D-glucoside identified from *Passiflora subpeltata* leaves against acetaminophen induced hepatotoxicity in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. **83**: 1278-1285.
- Shoieb AM, Elgayyar M, Dudrick PS, Bell JL, Tithof PK (2003). In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone. *International journal of oncology*. **22(1)**: 107-113.
- Shotorbani SS, Su ZL, Xu HX (2011). Toll-like receptors are potential therapeutic targets in rheumatoid arthritis. *World Journal of Biological Chemistry*. **2**:167-172.
- Sibulesky L (2013). Normal liver anatomy. *Clinical Liver Disease*. **2**: 1-3.
- Singh D, Arya PV, Sharma A, Dobhal MP, Gupta RSJ (2015). Modulatory potential of  $\alpha$ -amyrin against hepatic oxidative stress through antioxidant status in wistar albino rats. *Ethnopharmacology*. **161**: 186 - 193.
- Silman AJ, Pearson JE (2002). Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research*. **4 (3)**: 265-272.
- Sircar D, Albazi SJ, Atallah Y, Pizzi W (2008). Validation and application of an HPLC method for determination of di (2-ethylhexyl) phthalate and mono (2-ethylhexyl) phthalate in liver samples. *Journal of Chromatographic Science*. **46(7)**: 627-631.
- Smirnoff N, Cumbes QJ (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*. **28**: 1057-1060.
- Smolen JS, Steiner G (2003). Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Drug Discovery*. **2**: 473-488.
- Snir O, Rieck M, Gebe JA, Gebe JA, Yue BB, Rawlings CA, Nepom G, Malmström V, Buckner JH (2011). Identification and functional characterization of T cells reactive to citrullinated vimentin in HLA-DRB1\*0401-positive humanized mice and rheumatoid arthritis patients. *Arthritis & Rheumatology*. **63**: 2873-2883.
- Soler L, Delingette H, Malandain G, Montagnat J, Ayache N, Koehl C, Dourthe O, Malassagne B, Smith M, Mutter D, Marescaux J (2001). Fully automatic anatomical, pathological, and functional segmentation from CT scans for hepatic surgery. *Computer Aided Surgery*. **6**: 131-142.
- Staniek K, Gille L (2010). Is thymoquinone an antioxidant?. *BMC Pharmacology*. **10(1)**: A9.
- Stirpe F, Ravaioli M, Battelli MG, Musiani S, Grazi GL (2002). Xanthine oxidoreductase activity in human liver disease. *American Journal of Gastroenterology*. **97**: 2079-2085.
- Sturtz LA, Diekert K, Jensen LT, Lill R, Culotta VC (2001). A fraction of yeast Cu, Zn superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *Journal of Biological Chemistry*. **276**: 38084-38089.
- Suddek GM (2014). Protective role of thymoquinone against liver damage induced by tamoxifen in female rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. **92**: 640-644.
- Sugiyama D, Nishimura K, Tamaki K, Tsuji G, Nakazawa T, Morinobu A, Kumagai S (2010). Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Annals of the Rheumatic Diseases*. **69**: 70-81.

- Sung JY, Hong JH, Kang HS, Choi I, Lim SD, Lee JK, Seok JH, Lee JH, Hur GM (2000). Methotrexate suppresses the interleukin-6 induced generation of reactive oxygen species in the synoviocytes of rheumatoid arthritis. *Immunopharmacology*. **47(1)**: 35-44.
- Surapneni KM, Gopan VSC (2008). Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with rheumatoid arthritis. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. **23 (1)**: 41-44.
- Svendsen AJ, Junker P, Houen G, Kyvik KO, Nielsen C, Skytthe A, Holst R (2017). Incidence of chronic persistent rheumatoid arthritis and the impact of smoking: a historical twin cohort study. *Arthritis Arthritis Care & Research*. **69**: 616-24.
- Szekanecz Z, Besenyei T, Paragh G, Koch AE (2009). Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity*. **42**: 563–573.
- Taha MM, Sheikh BY, Salim LZ, Mohan S, Khan A, Kamalidehghan B, Ahmadipour F, Abdelwahab SI (2016). Thymoquinone induces apoptosis and increase ROS in ovarian cancer cell line. *Cellular and Molecular Biology*. **62(6)**: 97-101.
- Tekeoglu I, Dogan A, Ediz L, Budancamanak M, Demirel A (2007). Effects of thymoquinone (volatile oil of black cumin) on rheumatoid arthritis in rat models. *Phytotherapy Research*. **21**: 895–897.
- Teocharis SE, Margeli AP, Skaltsas SD, Spiliopoulou CA, Koutselinis AS (2001). Induction of methallothionein in the liver of carbon tetrachloride intoxicated rats: an immunohistochemical study. *Toxicology*. **161**: 129-138.
- Terpolilli NA, Moskowitz MA, Plesnila N (2012). Nitric oxide: considerations for the treatment of ischemic stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. **32**: 1332-1346.
- Tiwari P, Ahirwae D, Chandy A, Ahirwar B (2014). Evaluation of hepatoprotective activity of alcoholic and aqueous extracts of *Selaginella lepidophylla*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. **4**: S81-S86.
- Tobón GJ, Youinou P, Saraux A (2010). The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *Journal of Autoimmunity*. **35**: 10-14.
- Trang NTD, Wanner MJ, Phuong LVN, Koomen GJ, Dung NX (1993). Thymoquinone from *Eupatorium ayapana*. *Planta Medica*. **59(1)**: 99.
- Umar S, Zargan J, Umar K, Ahmad S, Katiyar C, Khan HA (2012). Modulation of the oxidative stress and inflammatory cytokine response by thymoquinone in the collagen induced arthritis in Wistar rats. *Chemico-biological interactions*. **197(1)**: 40-46.
- Umar S, Hedaya O, Singh AK, Ahmed S (2015). Thymoquinone inhibits TNF- $\alpha$ -induced inflammation and cell adhesion in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by ASK1 regulation. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **287 (3)**: 299–305.
- Upadhyay G, Tiwari MN, Prakash O, Jyoti A, Shanker R, Singh MP (2010). Involvement of multiple molecular events in pyrogallolinduced hepatotoxicity and silymarin-mediated protection: evidence from gene expression profiles. *Food and Chemical Toxicology*. **48**: 1660-1670.
- Vaillancourt F, Silva P, Shi Q, Fahmi H, Fernandes JC, Benderdour M (2011). Elucidation of molecular mechanisms underlying the protective effects of thymoquinone against rheumatoid arthritis. *Journal of cellular biochemistry*. **112(1)**: 107-117.
- Valko M, Morris H, Conin MTD (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*. **12**: 1161-1208.
- Van der Helm-van Mil AHM, Verpoort KN, Breedveld FC, Huizinga TW, Toes RE, de Vries RR (2006). The HLA-DRB1 shared epitope alleles are primarily a risk factor for anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and are not an independent risk factor for development of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology*. **54**: 1117-1121.
- VieiraAV, Schneider WJ, Vieira PM, Endocrinol J (1995). Retinoids: transport, metabolism, and mechanisms of action. *endocrinology-journal*. **146**: 201–207.
- Vorbach C, Harrison R, Capecchi MR (2003). Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system. *TRENDS in Immunology*. **24**: 512-517.

- Wages PA, Silbajoris R, Speen A, Brighton L, Henriquez A, Tong H, Bromberg PA, Simmons SO, Samet JM (2014). Role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the oxidative effects of zinc exposure in human airway epithelial cells. *Redox Biology*. **3**: 47–55.
- Wang BJ, Liu CT, Tseng CY, Wu CP, Yu ZR (2004). Hepatoprotective and antioxidant effects of Bupleurum kaoi Liu (Chao et Chuang) extract and its fractions fractionated using supercritical CO<sub>2</sub> on CCl<sub>4</sub>-induced liver damage. *Food and Chemical Toxicology*. **42**: 609-617.
- Ward FM, Daly MJ (1999). Hepatic disease. In: Clinical pharmacy and therapeutics, 11<sup>th</sup> ed, Walker R and Edwards C. Churchill Livingstone, New York. pp: 195 - 212.
- Weber LW, Boll M, Stampfl A (2003). Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: Carbon tetrachloride as a toxicological model. *Critical Reviews in Toxicology*. **33**: 105-136.
- Wegner N, Wait R, Sroka A, Eick S, Nguyen KA, Lundberg K, Kinloch A, Culshaw S, Potempa J, Venables PJ (2010). Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and  $\alpha$ -enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology*. **62**: 2662-72.
- Williams LAD, Connar AO, Latore L, Denis O, Ringer S, Whittaker JA, Conrad J, Vogler B, Rosner H, Kraus W (2008). The in vitro anti-denaturation effects induced by natural products and nonsteroidal compounds in heat treated (immunogenic) bovine serum albumin is proposed as a screening assay for the detection of anti-inflammatory compounds, without the use of animals, in the early stages of the drug discovery process. *West Indian Medical Journal*. **57(4)**: 327-331.
- Williams RO (2004). Collagen-induced arthritis as a model for rheumatoid arthritis. *Methods in Molecular Medicine*. **98**: 207–216.
- Woo CC, Loo SY, Gee V, Yap CW, Sethi G, Kumar AP, Tan KH (2011). Anticancer activity of thymoquinone in breast cancer cells: Possible involvement of PPAR- $\gamma$  pathway. *Biochemical pharmacology*. **82(5)**: 464-475.
- Yeo L, Toellner KM, Salmon M, Filer A, Buckley CD, Raza K, Scheel-Toellner D (2011). Cytokine mRNA profiling identifies B cells as a major source of RANKL in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. **70**: 2022-2028.
- Yerian L (2012). Histopathological evaluation of fatty and alcoholic liver diseases. *Journal of digestive diseases*. **12**: 17 -24.
- You X, Boyle DL, Hammaker D, Firestein GS (2006). PUMA-mediated apoptosis in fibroblast-like synoviocytes does not require p53. *Arthritis Research and Therapy*. **8(6)**: 157.
- You CG, Li XJ, Li YM, Wang LP, Li FF, Guo XL (2013). Association analysis of single nucleotide polymorphisms of proinflammatory cytokine and their receptors genes with rheumatoid arthritis in northwest Chinese Han population. *Cytokine*. **61**: 133–138.
- Zafeer MF, Waseem M, Chaudhary S, Parvez S (2012). Cadmium-induced hepa-totoxicity and its abrogation by thymoquinone. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. **26**: 199–205.
- Zhang DX, Gutterman DD (2007). Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. **292**: 2023-2031.
- Ziech D, Franco R, Georgakilas AG, Georgakila S, Malamou-Mitsi V, Schoneveld O, Pappa A, Panayiotidis MI (2010). The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental and carcinogenesis and biomarker development. *Chemico-Biological Interactions*. **188**: 334-339.

## ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم تأثير الثيموكينون (TQ) على الإجهاد التأكسدي في حالة التسمم الكبدي والإلتهاب الرئوي الروماتيزمي المحرضين عند الجرذان. لهذا الغرض، قُدرنا في البداية نشاطية TQ المضادة للأكسدة والمضادة للإلتهاب، خارج الجسم الحي. أظهرت النتائج المتحصل عليها أن TQ يمتلك قدرة معتبرة مضادة للأكسدة، وخاصة القدرة على تثبيط بيروكسيد الدهون بنسبة  $2.12 \pm 79.5$  % وقدرة اقتناص الجذر الهيدروكسيلي وبيروكسيد الهيدروجين بقيم  $IC_{50}$  مساوية لـ  $26.3 \pm 0.59$  و  $11.0 \pm 0.57$  ميكروغرام/مل، على التوالي. كما تمتلك تراكيزه الضعيفة تأثيراً معتبراً مضاداً للإلتهاب. لتأكيد النتائج المحصل عليها خارج الجسم تم إجراء دراسات مكملة داخل الجسم الحي، من خلال تقدير تأثير TQ على الإجهاد التأكسدي المرافق للتسمم الكبدي من جهة، بتقييم القدرة الوقائية والعلاجية للكبد ضد التسمم المحرض بـ  $CCl_4$  قبل وبعد علاج الجرذان الذكور بـ TQ لمدة 07 أيام. أظهرت النتائج أن TQ يملك تأثيراً وقائياً وعلاجياً معتبراً، ناتج عن تحسين حالة مؤشرات الإجهاد التأكسدي (MDA, SOD, CAT, GSH) في البلازما والأنسجة وكذا تعديل المؤشرات البيوكيميائية (الكبدية والدهنية). تم تأكيد هذه القدرة المضادة لسمية الكبد عن طريق دراسة المقاطع النسيجية. من جهة أخرى تم تقدير تأثير TQ على الإجهاد التأكسدي في حالة الإلتهاب الرئوي الروماتيزمي، باستعمال نموذج مرض الكولاجين II عند الجرذان الذكور، إثر علاجهم بـ TQ لمدة 40 يوم. أظهرت النتائج أن TQ سمح بتعديل حالة مؤشرات الإجهاد التأكسدي بصفة مرتبطة بالجرعة، كما بينت نتائج دراسة المقاطع النسيجية والفحص بالأشعة السينية لمفاصل الجرذان المعالجة تحسناً معنوياً لحالة المفاصل. من أجل فهم تأثير الـ TQ المضاد للأكسدة والمضاد للإلتهاب تم تقدير تأثيره على نشاطية انزيم الكزانيتين أكسيداز على المستوى النسيجي والمصلي. أظهرت النتائج تعديل نشاطية هذا الانزيم لدى الحيوانات المعالجة بـ TQ إلى مقدار مماثل لنشاطيته عند الجرذان السليمة. أثبتت نتائج هذه الدراسة قدرة عالية لـ TQ مضادة للإلتهاب الرئوي الروماتيزمي وكذلك قدرة وقائية وعلاجية ضد التسمم الكبدي من خلال النشاطية التثبيطية للكزانيتين أكسيداز وتعديل حالة مؤشرات الإجهاد التأكسدي.

**الكلمات المفاتيح:** الثيموكينون، الإجهاد التأكسدي، مضادات الأكسدة، الكزانيتين أكسيداز، سمية الكبد، الإلتهاب الرئوي الروماتيزمي.

## RESUME

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet de la thymoquinone (TQ) sur le stress oxydant dans le cas de l'hépatotoxicité et de l'arthrite rhumatoïde induites chez les rats. Pour cela, l'activité antioxydante et anti-inflammatoire de la thymoquinone (TQ) a été initialement évaluée, *in vitro*. Les résultats obtenus montrent que la TQ est dotée d'un pouvoir antioxydant important, notamment l'inhibition de la peroxydation lipidique avec  $79,5 \pm 2,12$  % et le pouvoir scavenger du radical hydroxyle et du peroxyde d'hydrogène, avec des  $IC_{50}$  de l'ordre de  $26,3 \pm 0,59$  et  $11,0 \pm 0,57$   $\mu\text{g/ml}$ , respectivement. Elle est également douée d'un bon effet anti-inflammatoire à des faibles concentrations. Pour confirmer les résultats obtenus *in vitro*, des études complémentaires ont été évaluées, *in vivo*. D'une part, en évaluant l'effet de la TQ sur le stress oxydant associé à l'hépatotoxicité. Les pouvoirs hépatoprotecteur et hépatocuratif ont été évalués, dans un modèle d'hépatotoxicité induite par  $CCl_4$  avant ou après le traitement des rats mâles avec la TQ pendant 07 jours. Les résultats montrent que la TQ possède des effets hépatoprotecteur et hépatocuratif importants, en améliorant le statut plasmatique et tissulaire des marqueurs du stress oxydant (GSH, CAT, SOD et MDA) et les paramètres biochimiques (hépatiques et lipidiques). Ce potentiel anti-hépatotoxique est confirmé par une étude histologique. D'autre part, l'effet de la TQ sur le stress oxydant dans le cas de l'arthrite rhumatoïde a été évalué, en utilisant un modèle d'arthrite induite par le collagène II ; développé chez les rats mâles qui sont traités pendant 40 jours avec la TQ. Les résultats montrent que la TQ a rétabli le statut des marqueurs du stress oxydant d'une manière dose-dépendante. L'étude histologique et radiologique aux rayons X des articulations des rats arthritiques traités montre une amélioration significative de leur état. Pour mieux comprendre le pouvoir antioxydant et anti-inflammatoire de la TQ, son effet sur l'activité plasmatique et tissulaire de la xanthine oxydase (XO) a été évalué. Les résultats montrent que l'activité XO est rétablie chez les animaux traités avec la TQ à un niveau comparable à celui des rats normaux. En conclusion, les résultats révèlent un pouvoir anti-arthritique, hépatoprotecteur et hépatocuratif de TQ, via l'inhibition de l'activité XO et le rétablissement du statut des marqueurs du stress oxydant.

**Mots-clés :** Thymoquinone, stress oxydant, antioxydant, xanthine oxydase, hépatotoxicité et arthrite rhumatoïde.