

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

*Université ABDERRAHMANE MIRA-Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique*

MÉMOIRE DE MASTER

Filière : BIOLOGIE

Option : *PHARMACOLOGIE MOLÉCULAIRE*

Thème :

**Profil toxicologique *in vivo* et *in vitro* des alcaloïdes de la
graine de *Nigella damascena***

Présenté par :

M^{lle} BOUDRIOUA Souad et M^{lle} TIR Lydia

Promoteur : M^r BOUGUEZZA Y MAA UAMB

Membres de jury :

Présidente : M^{elle} KHETTAL B MCA UAMB

Examineur : M^r BRIBI N MAA UAMB

Examinatrice : M^{elle} LOUNIS H MAA UAMB

Année : 2012/2013

DÉDICACE

À mes chers parents

Vous avez comblés ma vie de tendresse d'affection et de compréhension, rien au monde ne pourrait compenser les efforts et les sacrifices que vous avez consentis pour mon bien être. Aucune dédicace, ne saurait exprimer à sa juste valeur le profond amour que je vous porte.

À mes frères

Souvenez-vous, c'était hier, nos jeux, nos bêtises, et nous voilà des années plus tard toujours aussi proches, moins gamins mais éternellement liés.

À toi Anis, tu es et tu resteras mon petit frère adorable et ambitieux. Je te souhaite un avenir plein d'amour et de réussite. Tous les mots que je pourrais utiliser seraient insuffisants pour vous témoigner l'amour que je vous porte.

À toi Sarah

Bien plus qu'une cousine, tu es ma sœur et ma meilleure amie, tu as toujours été là pour moi, on a tous partagé : Les fou rires (loune garoune), les moments difficiles (tes parties mais pour moi tu seras toujours là). Je te dédicace ce travail en témoignage de ma gratitude, mon estime et mon profond amour.

À mes chères amies

Ces dédicaces ne seraient pas complètes sans vous remercier toutes du fond du cœur,

À toi Yasmine ; Cinq ans sont passés et je n'imagine plus être loin de toi, aucun mot ne peut qualifier la beauté de ton esprit. Merci à toi et à ta famille pour tous ce que vous avez fait pour moi.

À toi Meriem ; Exceptionnelle que tu es, par ta modestie, ton grand cœur et ta personnalité, tu m'as beaucoup appris. Je te remercie infiniment toi et ta famille pour m'avoir ouvert vos bras.

À toi chahinez ; Je t'admire et je te respecte, pour ton courage, ton acharnement et ton éternelle joie de vivre. Merci d'avoir été là quand j'avais le plus besoin.

À toi Souad ; Ce mémoire à été le lien qui nous a rapproché durant plus de 7mois, j'espère avoir été à la hauteur de tes attentes. Je reste en admiration devant ta gentillesse et ta grandeur d'âme, puisses-tu un jour atteindre tous tes objectifs et tes rêves.

En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble, je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

Lydia

Dédicaces

Je dédie ce travail

A ma très chère mère SAMIA,

Affable, honorable, aimable, tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

A mon très cher père Noureddine,

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai pour toi.

A ma grande sœur OUMSAAD

A mon petit frère YOUBA

A MON ONCLE SOULEYMENE,

Qui était d'une grande aide tout le long de notre travail.

A tous les membres de ma famille

A mon ami HAMZA qui m'a beaucoup aidé et de sa précieuse présence dans mes moments difficiles.

Et enfin à mes fidèles amies RAHMA, LYDIA, YASMINE, CHAHINEZ, MERIEM & LYDIA.

SOUAD

Remerciements

La première personne que nous tenons à remercier est notre promoteur M^r BOUGUEZZA, pour son aide et son encouragement.

On remercie également les membres de jury Dr KHETTAL, M^{elle} LOUNIS, et M^r BRIBI, qui ont acceptés d'examiner ce travail.

Un grand merci à monsieur D^r CHADER et D^r AMMI, qui nous ont accueillis dans l'enceinte de l'annexe de toxico-pharmacologie du Laboratoire national de contrôle des produits pharmaceutiques.

Nos remerciement et notre gratitude vont à toute l'équipe de résidents en pharmacie, pour leur aide précieuse, et grâce aux quels on a puent travailler dans un cadre particulièrement agréable.

Un grand merci au staff du laboratoire d'anatomie pathologique du CHU de Sétif pour leur aide et leur soutien éternel.

Nos remerciements s'étendent également aux techniciennes (Saïda et Habiba) du laboratoire pédagogique d'enzymologie qui ont toujours été présentes pour nous guider.

Enfin, on remercie tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Lydia et Souad

Sommaire

Remerciements	
Listes des figures.....	i
Listedes tableaux.....	iii
Liste des abreviation.....	vi
Introduction.....	1

*****Partie théorique*****

Chapitre I : Généralité sur *Nigella damascena*

I.1.Description botanique.....	2
I.2.Classification de <i>Nigella damascena</i>	3
I.3.Généralités sur les alcaloïdes.....	3
I.3.1.Origines des alcaloïdes.....	3
I.3.1.1.Origine végétales.....	3
I.3.1.2.Origine animale.....	4
I.3.1.3.Origines bactériennes.....	4
I.3.1.4.Origine fongique.....	4
I.3.2.Classification des alcaloïdes.....	5
I.3.3.Propriété physico-chimique des alcaloïdes.....	6
I.3.4.Caractérisation des alcaloïdes.....	7
I.3.5.Propriété pharmacologique des alcaloïdes.....	7

I.4. Les alcaloïdes de <i>Nigella damascena</i>	8
I.5. Propriétés thérapeutiques de <i>Nigella damascena</i>	9
I.5.1. Propriété analgésique.....	9
I.5.2. Propriété antibactérienne et antiparasitaire.....	9
I.5.3. Propriété emménagogue.....	9
I.5.4. Propriété anti-oxydante.....	9

Chapitre II : Hépatotoxicité, Néphrotoxicité et Cytotoxicité

II.1. Généralité sur la toxicité.....	10
II.1.1. Types de toxicité.....	10
II.1.1.1. Toxicité aiguë.....	10
II.1.1.2. Toxicité subaiguë ou sub-chronique.....	10
II.1.1.3. Toxicité chronique.....	11
II.2. Étude de toxicité <i>in vivo</i>	11
II.2.1. Hépatotoxicité.....	11
II.2.1.1. Généralité sur le foie.....	11
II.2.1.2. Hépatotoxicité.....	11
II.2.1.3. Mécanismes de l'hépatotoxicité.....	12
II.2.1.4. Hépatotoxicité directe.....	12
II.2.1.5. Hépatotoxicité indirecte (immunologique).....	13
II.2.1.6. Évaluation de l'hépatotoxicité.....	13
II.2.2. Néphrotoxicité.....	14
II.2.2.1. Généralité sur les reins.....	14
II.2.2.2. Néphrotoxicité.....	15

II.2.2.3. Vulnérabilité des reins aux toxiques.....	15
II.2.2.4. Néphrotoxicité liée au toxique.....	15
II.2.2.5. Évaluation de la néphrotoxicité.....	16
II.2.2.6. Marqueurs de l'équilibre homéostatique.....	16
II.3. Étude de toxicité <i>in vitro</i>	17
II.3.1. Cytotoxicité.....	17
II.3.1.1. Le système hématologique.....	17
II.3.1.2. Mécanisme de la Cytotoxicité.....	19
II.3.1.2.1. Cytotoxicité directe.....	19
II.3.1.2.2. Cytotoxicité indirecte (Hémolyse oxydative).....	19

*****Partie pratique*****

Chapitre I : Matériels et méthode

I. Matériels et méthode.....	20
I.1. Matériel végétal.....	20
I.1.1. Obtention du matériel végétal.....	20
I.1.2. Extraction des alcaloïdes totaux.....	20
I.2. Matériel animal.....	21
I.2.1. Animaux.....	21
I.3. Evaluation de la toxicité des alcaloïdes totaux <i>in vivo</i>	22
I.3.1. Choix des doses et voie d'administration.....	22
I.3.2. Suivi quotidien et observation comportementale.....	22
I.3.3. Études biochimique.....	23

I.3.4.Étude histopathologique.....	23
I.4.Évaluation de la cytotoxicité des alcaloïdes <i>in vitro</i>	24
I.4.1.Etude hémolytique.....	24
I.4.1.1.Principe.....	24
I.4.1.2.Isolement des érythrocytes.....	25
I.4.2.Préparation des solutions.....	25
I.4.3.Etude de l'hémolyse.....	25
I.4.4.Observation microscopique.....	26
I.4.5.Analyse statistique.....	26

Chapitre II : Résultats et discussion

II.1. Matériel végétal	27
II.1.1. Rendement d'extraction.....	27
II.2. Toxicité sub-chronique	27
II.2.1. Paramètres physiques.....	27
II.2.1.1. Evolution du poids corporel	27
II.2.1.2. Evolution de la prise alimentaire.....	28
II.2.1.3. Evolution de la température corporelle centrale (température rectale).....	28
II.2.2. Paramètres biochimiques.....	29
II.2.2.1. Paramètres hépatiques.....	29
II.2.2.2. Paramètres néphrétiques.....	30
II.2.2.3. Paramètres d'équilibre homéostatique.....	31
II.2.3. Examen histopathologique.....	32
II.2.3.1. Poids final des organes internes (Foie et reins).....	32

II.2.3.2. Histologie hépatique.....	32
II.2.3.3. Histologie rénale.....	34
II.3. Étude <i>in vitro</i> de la cytotoxicité érythrocytaire.....	35
II.3.1. Dosage de l'hémoglobine et pourcentage d'hémolyse.....	35
II.3. 2. Observation microscopique.....	36
II.4. Discussion générale	37
Conclusion.....	40
Références bibliographique.....	41
Annexe.....	I

Liste des figures

Figure 1: <i>Nigella damascena</i> à gauche, aspect intérieure de la gousse à graines de <i>Nigella damascena</i> à droite.....	2
Figure 2: Structure chimique de la damascenine (1) et damascinine (2).....	8
Figure 3: Réaction de biosynthèse de la damascenine.....	8
Figure 4: Conditions d'installation des souris au niveau du laboratoire.....	21
Figure 5: Administration de l'extrait "alcaloïdes totaux" par voie intra-péritonéale.....	22
Figure 6: A droite : une souris anesthésiée; A gauche : Prélèvement de la kétamine.....	23
Figure 7: Dissection, prélèvement et fixation.....	24
Figure 8 : Variation du poids corporel des différents groupes de souris	27
Figure 9 : Poids des organes (Foie et reins) des différents groupes de souris.....	28
Figure 10 : Variation de la température corporelle centrale prise par voie rectale des différents groupes de souris.....	29
Figure 11 : Dosage des transaminases ALT et AST et de la bilirubine des différents groupes de souris	29
Figure 12 : Dosage de la créatinine et de l'urée des différents groupe de souris	30
Figure 13 : Dosage du glucose des différents groupes des souris	31
Figure 14 : Poids des organes internes (Foie et reins) des différents groupes des souris.....	32
Figure 15 : Micrographie du parenchyme hépatique des souris des deux sexes des groupes traités.....	33
Figure 16 : Micrographie du parenchyme rénale des souris des deux sexes	34

Figure 17 : Pourcentage d'hémolyse érythrocytaire en présence et en absence des différentes concentrations d'alcaloïdes et du Triton X-10036

Figure 18 : Images par Microscopie optique de la morphologie érythrocytaire en absence et en présence des alcaloïdes totaux de la graine de *Nigella damascena*.....36

Liste des tableaux

Tableau I : Classification de <i>Nigella damascena</i>	3
Tableau II: Exemple d'alcaloïdes d'origine animale et fongique.....	4
Tableau III: Principaux hétérocycle des alcaloïdes.....	5
Tableau IV: Quelques activités pharmacologiques des alcaloïdes.....	7

Liste des abréviations

- **mM** : milli molaire
- **UV** : ultras violet
- **cyt p-450** : cytochrome p-450
- **DMSO** : Diméthyle sulfoxyde.
- **Ip** : intrapéritonéale
- **LNCPP** : laboratoire national de contrôle de produits pharmaceutiques.
- **MT+** : mâle témoin positif.
- **MT** : mâle témoin négatif.
- **FT+** : femelle témoin positif.
- **FT-** : femelle témoin négatif.
- **F** : femelle.
- **M** : mâle.
- **Alc T** :alcaloïdes totaux.
- **ALT** : alanine amino-transférase.
- **AST** :aspartate amino-transférase.
- **Rpm** :Rotation par minute.
- **GX40** : Grossissement foie 40.

Introduction

Employées depuis l'antiquité, les plantes médicinales sont reconnues pour leurs effets thérapeutiques. Leurs propriétés réelles ont, à toute époque, été exagérées, ou ignorées, selon les connaissances en vigueur. Les progrès des sciences biologiques, ont permis de mettre en évidence les propriétés des plantes, dites médicinales, quelle soit thérapeutiques ou toxiques (**Boullard, 2001**).

Nigella damascena est une plante annuelle herbacée, de la famille des Renonculacée rencontrée dans les régions du pourtour du bassin méditerranéen (**Schmauder et Doebel, 1991**). Elle est douée de plusieurs propriétés thérapeutiques ; tels que les effets : oestrogénique, emménagogue, antipyrétique, analgésique, anti-inflammatoire, anti-oxydante, antiparasitaire, antibactérienne (**Fico et al, 2004**).

Néanmoins, les données toxicologiques concernant *Nigella damascena*, reste à ce jour peu connues et le peu d'informations disponibles provient d'études non référenciées. Seuls les travaux de **Bouhezza et al (2013)** ont fait l'objet de l'étude de la toxicité aigüe et subchronique de l'extrait méthanolique de la graine de cette plante. Quand à la toxicité des alcaloïdes totaux de *Nigella damascena*, aucune étude de ce genre n'a été faite à ce jour.

Les études toxicologiques, tels que les essais précliniques et cytotoxiques, sont autant de méthodes qui nous permettent de déterminer la toxicité potentielle ou l'innocuité d'une plante, et permettent de fournir des informations sur la potentielle dangerosité de ces remèdes.

Notre étude porte sur l'évaluation de la toxicité sub-chronique des alcaloïdes totaux de la graine de *Nigella damascena* sur des souris *Swiss albinos* mâles et femelles. Pour cela une évaluation de certains paramètres biochimiques de la fonction hépatique et rénale ainsi qu'une étude histopathologique ont été réalisés pour permettre de confirmer ou d'affirmer le potentiel effet toxicologique de nos alcaloïdes. Un deuxième aspect a été réalisé pour évaluer *in vitro* la cytotoxicité de ces alcaloïdes en prenant comme model cellulaire, des érythrocytes humains.

I.1.Description botanique

Les nigelles sont des plantes dicotylédones, de la famille des renonculacées (**Agradi et al, 2001**), du genre *nigella*, autre fois, appelées; *Melanthium*. Elles sont réparties en vingt espèces dont *Nigella sativa*, *Nigella arvensis*, *Nigella hispanica*, *Nigella damascena*, *Nigella gallica* et *Nigella orientalis*, qui poussent au niveau des régions méditerranéennes. (**Nickavar et al, 2003**)

Nigella Damascena est une plante considérée comme ornementale, cultivée dans les jardins et fleurit dans la période allant de mars jusqu'à juillet. (**Andreas et Oeggli, 2005**)

Communément, appelée cheveux d'anges ou pattes d'araignée, est une plante herbacée annuelle, présente une hauteur de 50cm, avec des feuilles allongées à lanières fines et enchevêtrées. Les fleurs sont de couleur blanche ou bleu pâle (**Toma et al, 2003**). Elles sont bordées d'une collerette de cinq feuilles longues et minces avec des fruits de forme ovale et globuleuse qui renferment les graines de *Nigella damascena* (d'une forme ovoïde et aplanie) (**Figure 1**). (**Tacherfiout, 2008**)

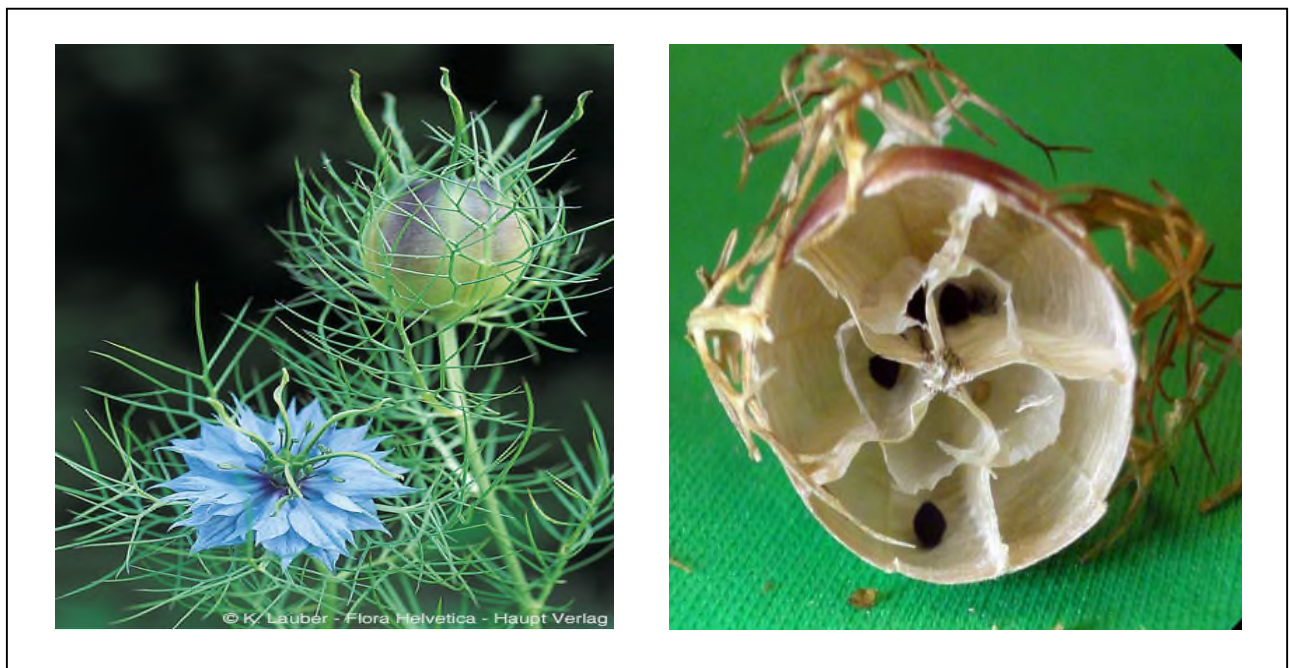


Figure 1: *Nigella damascena* à gauche, aspect intérieure de la gousse à graines de *Nigella damascena* à droite. (**Lauber, 2012**)

I.2. Classification de *Nigella damascena*

Selon la classification Linnéenne, *Nigella damascena* est classée comme suite;

Tableau I : Classification de *Nigella damascena*. (Guignard, 2001)

Rang taxonomique	Nomenclature
Règne	Végétale
Sous règne	Cormophyte
Supra embranchement	Rhizophytes
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Dialypétales
Série	Thalamiflores
Ordre	Ranales
Famille	Renonculaceae
Genre	<i>Nigella</i>
Espèce	<i>Nigella damascena</i>

I.3. Généralités sur les alcaloïdes

Les alcaloïdes représentent un ensemble de molécules d'origine naturelle, renfermant du carbone, de l'hydrogène et de l'azote qui leur confère leur caractère alcalin. La plupart possèdent une activité biologique marquée qui a suscité un intérêt thérapeutique. (Bruneton, 1999; Cartier et Roux, 2007)

I.3.1. Origines des alcaloïdes

On estime que le nombre d'alcaloïdes découverts à ce jour est de 10 000. Ils font partie de quatre origines différentes ; végétales, animales, fongiques et bactériennes.

I.3.1.1. Origine végétales

Les alcaloïdes se trouvent essentiellement dans les plantes supérieures telles que les angiospermes, aussi bien dans les monocotylédones (Amaryllidacée, Liliacée) qu'aux niveaux des dicotylédones (Annonacée, Apocynacée, Fumariacée, Renonculaceae, Papavéracée, etc.). (Bruneton, 2009)

1.3.1.2. Origine animale

Les alcaloïdes retrouvées chez les animaux sont, pour la plus part, des métabolites produits à partir des alcaloïdes contenus dans l'alimentation de type végétale de l'animal en question. On prend pour exemple la castoramine, un alcaloïde issue du castor, qui est également retrouvé chez les nénuphars. (**Tableau II**)

D'autres animaux possèdent des alcaloïdes tels que les batraciens, salamandres et les insectes (fourmis, cochenilles, les mille-pattes) (**Tableau II**) et certains organismes marins (éponges de mère et les unicellulaires). (**Manske, 1973**)

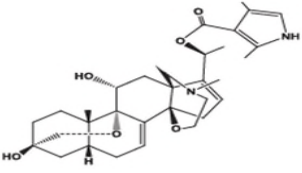
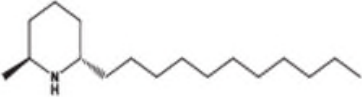
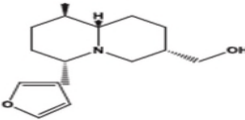
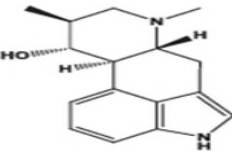
1.3.1.3. Origines bactériennes

Des substances de nature alcaloïdique se retrouvent également chez quelques bactéries *Pseudomonas aeruginosa*. (**William, 2003**)

1.3.1.4. Origine fongique

Les champignons, peu utilisés pour les études et la recherche d'alcaloïdes, ont donné toutefois des résultats. C'est le cas du Chanoclavine; alcaloïde extrait de l'ergot de seigle (*Claviceps purpurea*). (**Tableau II**)

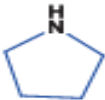
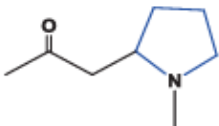
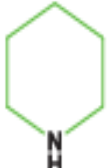
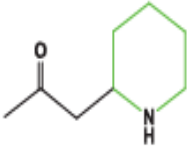
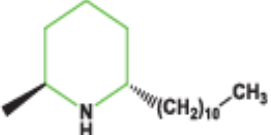
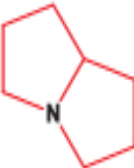
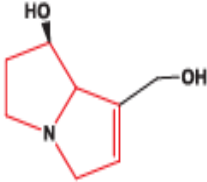
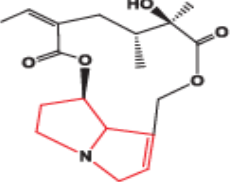
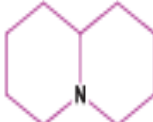
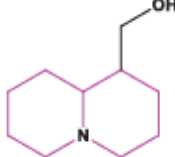
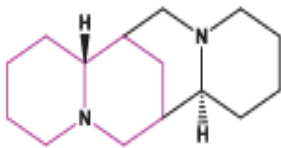
Tableau II: Exemple d'alcaloïdes d'origine animale et fongique. (**Badiaga, 2011**)


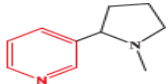
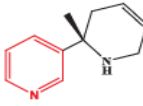
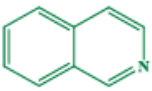
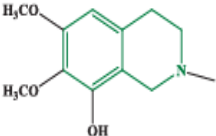
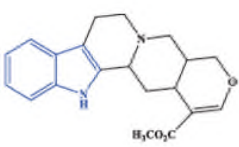
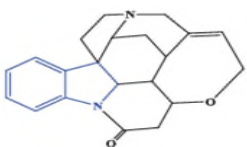
Dénomination	Structure	Origine
Batrachotoxine		Type d'alcaloïde extrait à partir des peaux de certains batraciens (<i>Dendrobates</i>).
Solenopsine		Type d'alcaloïde isolé de la fourmi (<i>Solenopes invicta</i>).
Castoramine		Type d'alcaloïde isolé du castor.
Chanoclavine		Alcaloïde indolique isolé d'un champignon de type <i>Claviceps purpurea</i> .

I.3.2. Classification des alcaloïdes

La classification des alcaloïdes est assez complexe, vue leur nombre important et leur hétérogénéité. La classification la plus utilisée est basée essentiellement sur la nature du cycle. Les alcaloïdes possèdent un squelette hétérocyclique azoté, à l'exception de certaines substances où l'azote est extra-cyclique (colchicine, éphédrine). (Bruneton, 1999; Badiaga, 2011)

Tableau III: Principaux hétérocycle des alcaloïdes. (Badiaga, 2011)

Un seul cycle contenant l'atome d'azote	 Cycle pyrrolidinique	Exemples	 Hygrine	
	 Cycle pipéridinique		 Isopelletierine	 Solenopsine A
Deux cycles contenant l'atome d'azote	 Cycle pyrrolizidinique	Exemples	 Retronecine	 sénecionine
	 Cycle quinolizidinique		 Lupinine	 Sparteine

Hétérocycles aromatiques		Exemples		
	Cycle pyridinique		Nicotine	Anatabine
			Cycle isoquinoléique	
	Cycle indolique			

I.3.3. Propriété physico-chimique des alcaloïdes

La masse moléculaire des alcaloïdes varie de 100 à 900 MM. La plupart des alcaloïdes non oxygénés sont liquides et volatils, alors que les alcaloïdes oxygénés sont plutôt solides, cristallisables. Sous forme basique, ils sont peu ou pas solubles dans l'eau, mais solubles dans les alcools de titre élevé, ainsi que dans les solvants organiques apolaires (ou peu polaires).

La basicité des alcaloïdes repose sur la disponibilité du doublet libre de l'azote. Les groupements électro-donneurs adjacents à l'azote augmentent la basicité, et le groupe électro-attracteurs la diminuent. **(Cartier and Roux, 2007)**

La couleur des alcaloïdes résulte du spectre d'absorption de la lumière, ils sont souvent incolores en raison de leurs absorption dans le spectre proche de l'U.V, mais dans de rare cas cette absorption déborde sur le spectre visible attribuant une couleur aux alcaloïdes, comme La berbérine et l'ellipticine qui sont de couleur jaune à orangé et la sanguinarine qui est rouge. **(Manske, 1973)**

I.3.4. Caractérisation des alcaloïdes

De nombreuses réactions sont possibles avec les alcaloïdes. Elles permettent la caractérisation des composés. Ces réactions sont le plus souvent des réactions de précipitation, ou de coloration, réalisées grâce à des réactifs. Les réactions de précipitation se font par la combinaison de l'alcaloïde avec des métaux ou métalloïdes tels que l'iode, le bismuth, ou le mercure. (Abayomi, 2010)

La réaction avec le tétraiodomercurate de potassium (réactif de Mayer) donne un précipité blanc-jaunâtre. La réaction avec le tétraiodobismuthate de potassium (réactif de Dragendorff) donne un précipité orange à rouge.

Cette méthode de détection présente des limites, car elle n'est pas totalement spécifique aux alcaloïdes. Certaines substances telles que des protéines, coumarines, hydroxyflavones, et autres composés peuvent donner de faux résultats positifs. (Abayomi, 2010)

I.3.5. Propriété pharmacologique des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont particulièrement intéressants pour leurs activités pharmacologiques, en effet ils constituent le principe actif de plusieurs médicaments. (Bruneton, 1999)

Tableau IV: Quelques activités pharmacologiques des alcaloïdes. (Fattorusso et Tagliatela-Scafati, 2007)

Alcaloïdes	Plantes	Effet biologiques
Vinblastine	<i>Catharansus roseus</i>	Anticancéreux
Quinidine	<i>Cinchona pubescens</i>	Antiarythmique
Berbérine	<i>Coptis japonica</i>	Antifongique-Antibactérien
Sanguinarine	<i>Sanguinaria canadensis</i>	Antiseptique
Morphine	<i>Papaver somniferum</i>	Analgésique
Caféine	<i>Coffea arabica</i>	Stimulant du SNC
Boldine	<i>Peumus boldus</i>	Cholérétique et Cholagogue

I.4. Les alcaloïdes de *Nigella damascena*

En 1830, Schneider isole pour la première fois la damascenine, l'alcaloïde majoritaire de la graine de *Nigella damascena* et lui attribue la composition chimique $C_{10}H_{15}O_3N$. Ewins reprit les travaux de Schneider et définie la formule constitutionnelle de la damascenine par sa synthèse, démontrant ainsi sa structure $C_9H_{11}O_3N$ et sa formule détaillée 2-méthylamino 3-methoxy benzoic acid methyl ester (**Figure 2**). (**Ewins, 1912**)

En 1970, Deopke et Fitsch, ont démontrés la présence d'un deuxième alcaloïde dans les graines de *Nigella damascena*, la damascinine de formule chimique 2-méthylamino-3-hydroxy benzoic acid methyl ester (**Figure 2**), qui se trouve à de faible taux dans la graine. (**Dopke et Fritsch, 1970; Manske, 1973**)

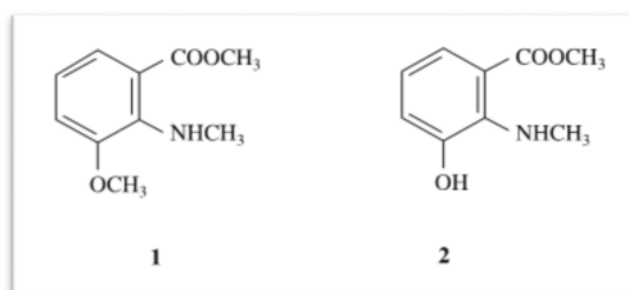


Figure 2: Structure chimique de la damascenine (1) et damascinine (2). (**Fico et al, 2004**)

La damascenine est l'alcaloïde principal des graines de *Nigella damascena*, il représente 0.1 à 0.7 % du poids de la graine, elle atteint sa valeur maximale lorsque les graines sont à maturité. A un stade avancé de développement les valeurs en damascenine sont de 0,15% dans les graines, 0,013% dans les feuilles, 0,0001 % dans les tiges et de 0,0002 % au niveau des racines. (**Mohan et al, 1965**)

L'étude des réactions de biosynthèses de la damascenine montre qu'elle est synthétisée à partir de la méthionine (**Munsche et Mothes, 1965**), bien que les réactions de biosynthèse ne soient pas bien élucidées à ce jour.

Autres composés

En plus des alcaloïdes, la graine de *Nigella damascena* contient d'autres substances telles que les flavonoïdes, sesquiterpènes, stérols, saponines, composés phénoliques, polyols et des acides gras. (Yoshimitsu et al, 2007)

I.5. Propriété thérapeutiques de *Nigella damascena*

On attribue aux graines de *Nigella damascena* plusieurs propriétés thérapeutiques ;

I.5.1. Propriété analgésique

L'activité analgésique des graines de *Nigella damascena* provient de l'huile fixe, qui contient un principe actif opioïde responsable de l'effet analgésique. (Teuscher et al, 2005)

I.5.2. Propriété antibactérienne et antiparasitaire

L'étude de Tanis et al en 2009 a déterminé que les extraits des graines (chloroformique, méthanolique et acétonique) de *Nigella damascena*, possèdent un effet sur les bactéries à gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), néanmoins son activité reste faible comparée à l'Ampicilline. (Tanis, 2009)

I.5.3. Propriété emménagogue

L'activité oestrogénique de *Nigella damascena* a été déterminée, en utilisant la levure YES, contenant un récepteur d'œstrogène humain et l'extrait méthanolique de *Nigella damascena*. Une forte activité oestrogénique a été observée, elle est dû à deux composés: 3,4-dihydroxy-B-phénethyl alcool et l'acide 2,4-dihydroxyphénylacétique qui sont agonistes aux œstrogènes. Elles se fixent aux récepteurs d'œstrogène et régule le cycle menstruel. (Agradi et al, 2001; Agradi et al, 2002), elle est également galactagogue, cette effet peut être dû aux huiles essentielles et aux saponines. (Brukner, 1993; Ficoet al, 2001)

I.5.4. Propriété anti-oxydante

Les graines de *Nigella damascena* possèdent un effet antioxydant grâce aux huiles fixes, qui captent les radicaux libres, mais aussi elles inhibent la peroxydation non enzymatique. (Teuscher et al, 2005)

II.1.Généralité sur la toxicité

La toxicité d'un composé chimique ou organique (xénobiotique) est une caractéristique biologique qui dépend de la structure atomique ou moléculaire de ce dernier et de son interaction avec la matière vivante, qui au contact ou après pénétration dans l'organisme provoque un dysfonctionnement à l'échelle moléculaire, cellulaire, ou organique. Cette toxicité dépend aussi de la dose du xénobiotique nécessaire pour produire un effet toxique. (Claverie et Hedde, 2008)

II.1.1.Types de toxicité

Les signes de toxicités, leurs sévérités, apparitions, progressions et réversibilités sont déterminés suite à des études toxicologiques indispensables à toute substance destinée à l'utilisation humaine.

On distingue trois formes de toxicité; la toxicité aiguë, la toxicité à court terme (subaiguë ou subchronique) et la toxicité à long terme (chronique). (Leyral et Vierling, 2007)

II.1.1.1.Toxicité aiguë

La toxicité aiguë est évaluée après administration d'une dose forte et unique, à concentration croissante sur différents groupes d'animaux homogènes.

Pour déterminer la toxicité aiguë, l'étude de la DL50 (dose létale à 50 %) est indispensable, sa mise en évidence est réalisée avec des tests qui durent de 24h à 14jours, elle dépend de la voie d'administration, de l'espèce, des quantités limites à utilisées lors des autres tests, et des organes cibles. (Leyral et Vierling, 2007)

II.1.1.2.Toxicité subaiguë ou sub-chronique

La substance testée est administrée de façons répétées, pendant une durée qui n'excède pas quatre-vingt-dix jours, elle a pour but d'établir une corrélation entre la dose administrée et les effets toxiques observés, et donc d'estimer la dose sans effet, qui servira à déterminer la dose admissible chez l'homme. (Claverie et Hedde, 2008)

II.1.1.3.Toxicité chronique

La substance est administrée de manière répétée, pendant une période qui dépasse quatre-vingt-dix jours. L'étude de la toxicité chronique permet d'une part, de déterminer un niveau de dose sans effets toxiques, et d'autre part, elle détermine leurs temps d'apparition et leurs possibles réversibilités. (Leyral et Vierling, 2007)

II.2.Étude de toxicité *in vivo*

Les essais de toxicité *in vivo*, par opposition à *in vitro*, qualifient toute étude toxicologique effectuée pour un organisme vivant. Les essais cliniques sont une forme de recherche *in vivo*. (Stellman, 2000)

II.2.1.Hépatotoxicité

II.2.1.1.Généralité sur le foie

Le foie joue un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie du milieu intérieur. Interposé entre le système digestif et la circulation sanguine systémique, il est le premier organe atteint par les substances endogènes et exogènes amenées par la veine porte.

Le foie reçoit également du sang de la circulation systémique et participe à la détoxification et l'élimination de substances ayant pénétré l'organisme par d'autres voies, comme les voies cutanées et respiratoires.

Le foie est le principal site de biotransformation et de détoxification des xénobiotique. Les voies biliaires constituent une voie d'excrétion importante pour les produits du métabolisme endogène et les substances étrangères et leurs métabolites. (Delaney, 2006)

II.2.1.2.Hépatotoxicité

L'Hépatotoxicité est définie comme le pouvoir qu'a une substance de provoquer des dommages au niveau du foie, qui peut être associés à une déficience de la fonction hépatique, mais aussi aux médicaments, produits chimiques et plantes médicinales qui sont, l'une des causes croissantes d'atteintes hépatiques, du fait de leur réputation d'innocuité. (Navarro et Senior, 2006; Stickel et al, 2005; Larrey, 2007)

L'hépatotoxicité se manifeste sous forme d'inflammation (hépatite), de nécrose hépatique ou encore de maladie veino-occlusive. Divers mécanismes peuvent provoquer des lésions allant de l'augmentation des taux enzymatiques à une dysfonction sévère de la fonction hépatique. (Assis et Navarro, 2009)

II.2.1.3.Mécanismes de l'hépatotoxicité

De nombreux travaux expérimentaux ont été réalisés avec quelques molécules (paracétamol, acide valproïque, halothane, analogues nucléosidiques antirétroviraux), afin de déterminer les mécanismes de l'hépatotoxicité, ces investigations ont permis d'avoir un schéma générale des atteintes hépatotoxiques et leurs mécanisme d'action. (Andrade et al, 2009; Daly, 2010)

L'hépatotoxicité peut résulter de l'action directe du xénobiotique, ou peut découler indirectement des interactions avec d'autre molécules, de nature intrinsèque ou extrinsèque qui peuvent modifier les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques du xénobiotique en le rendant toxique pour les cellules du foie. (Mumoli et al, 2006)

II.2.1.4.Hépatotoxicité directe

- Hépatotoxicité liée au xénobiotique

Ce type de toxicité résulte de l'action de la molécule mère directement sur les hépatocytes en provoquant la nécrose cellulaire. (Andrade et al, 2009)

- Hépatotoxicité des métabolites réactifs

La formation de métabolites réactifs par l'intermédiaire de la biotransformation de la molécule mère est l'une des premiers mécanismes d'hépatotoxicité connue. Les métabolites réactifs formés lors de la transformation de la molécule dans l'hépatocyte peuvent interagir directement sur les protéines, les lipides ou les acides nucléiques, entraînant un stress oxydant, une peroxydation des lipides et des altérations de la perméabilité des membranes mitochondriales qui, induiront la mort cellulaire, par nécrose ou apoptose. (Andrade et al, 2009; Daly, 2010)

II.2.1.5. Hépatotoxicité indirecte (immunologique)

- Activation du système immunitaire

L'atteinte hépatique d'origine immunitaire, est initiée par des molécules à bas poids moléculaire. Appelées haptènes elles sont non immunogènes, mais peuvent acquérir une immunogénécité en se liant à une macromolécule porteuse, telle qu'une protéine. La protéine altérée sera alors perçue comme étrangère par le système immunitaire. (**Knowles et al, 2000; Robin et al, 2000**)

Le complexe haptène-macromolécule déclenche l'activation des cellules T auxiliaires qui, par la production de cytokines, activant les lymphocytes T cytotoxiques. Les cellules Natural killer et les lymphocytes B (producteurs d'anticorps) entraînant une attaque auto-immune contre les constituants des cellules hépatiques normales. (**Jaeschk et al, 2004**)

II.2.1.6. Évaluation de l'hépatotoxicité

L'hépatotoxicité peut être identifié suite à un bilan hépatique. La bilirubine, l'ALT, l'AST, la LDH sont des marqueurs qui peuvent mettre en évidence des lésions hépatiques ou des altérations fonctionnelles. (**Hughes et Jefferson, 2009**)

- Alanine Amino Transférase

L'alanine aminotransférase appelé ALAT, est une enzyme produite par les hépatocytes. (**Poortmans et Boisseau, 2003**) Le taux d'ALAT contenu dans le sang augmente lorsque les hépatocytes sont endommagés ou détruits à un rythme plus élevé que la normale. Les drogues, l'alcool, les toxines, les virus et d'autres substances causent des dommages aux cellules hépatiques qui peuvent contribuer à l'élévation du taux d'ALAT.

Le niveau d'ALAT est utilisé pour évaluer le degré d'inflammation et de l'atteinte au foie. Les valeurs dites normales d'ALAT, peuvent varier d'un laboratoire à un autre, Toutefois, les taux habituellement rapportés se situent entre 0 et 40 UI/L. (**Hughes et Jefferson, 2009**)

- Aspartate aminotransférase

Aspartate aminotransférase (ASAT) également appelé sérum glutamique, est une enzyme non spécifique, elle se trouve également dans d'autres cellules telles que les cellules cardiaques, musculaires et sanguines. Son taux élevé peut être dû à une hépatite aigüe. D'autres tests biochimiques sont nécessaires pour confirmer ce diagnostic. (**Nyblom et al, 2002**)

- La Bilirubine

La bilirubine est le produit du catabolisme de l'hème, provient de la destruction des globules rouges vieillissants. La bilirubine est libérée dans le sang ou elle se lie à l'albumine, qui la transporte vers le foie. Contrairement à la bilirubine liée à l'albumine, la forme libre est neurotoxique. (**Alan et Lowe, 2006**)

La bilirubine est utilisée comme marqueur hépatique, car son taux élevé dans le corps suggère une anomalie hépatique. Généralement des ictères qui se manifestent par la pigmentation jaune de la peau et des muqueuses. La quantité totale normale de bilirubine est de 0,1 à 1,2 mg/dL. (**Hughes et Jefferson; 2009**)

II.2.2.Néphrotoxicité

II.2.2.1.Généralité sur les reins

Les reins, en nombre de deux, sont situés dans la région rétro-péritonéale, de part et d'autre de la colonne vertébrale. (**Alan et Lowe, 2006**) C'est un organe excréteur, il assure plusieurs fonctions vitales, dont l'élimination et la conservation des composants du sang. Il assure notamment l'évacuation des déchets du métabolisme, le contrôle de la pression osmotique, mais aussi de la composition électrolytique du milieu intérieur et du volume de sang. Le rein assure également le maintien de la constance du pH du milieu. C'est l'organe principal de régulation et de contrôle de la composition de l'organisme. (**Elaine, 2008; Nguyen et Bourouina, 2008**)

Durant le processus de filtration des déchets sanguins, les reins, sont la cible des substances toxiques d'origine endogène et exogène. Les cellules rénales sont donc exposées à des concentrations plus élevées en toxique que les cellules sanguines. (**Elaine, 2008**)

II.2.2.2.Néphrotoxicité

La néphrotoxicité est l'ensemble des altérations fonctionnelles ou structurelles rénales, induites par des toxiques endogène (immunologiques) ou exogène (xénobiotiques). Les manifestations des atteintes rénales toxiques sont très nombreuses, et les symptômes ne sont pas différents de ceux des maladies rénales connues. Les toxiques rénaux peuvent donner presque toutes les formes de syndrome néphrologique. **(Stengel et Simon, 1997)**

II.2.2.3.Vulnérabilité des reins aux toxiques

La vulnérabilité du rein vis-à-vis des agressions toxiques, s'explique par plusieurs facteurs liée à des paramètres anatomo-fonctionnels de cet organe. **(Sherwood, 2006)**

- Débit vasculaire et surface d'échange

Les reins reçoivent environ 1/5 du débit cardiaque et la surface d'échange endothéliale entre le sang et les tissus rénaux est très importante. Les cellules endothéliales sont en contact permanent avec les toxiques à plus forte concentration, D'où le risque élevé de toxicité

- Phénomène de réabsorption et de concentration

Une partie des xénobiotiques subissent une réabsorption tubulaire, ajouter à cela, le phénomène de concentration, qui augmente l'accumulation des substances toxiques et provoque une cytotoxicité.

II.2.2.4.Néphrotoxicité liée au toxique

L'Atteinte rénale peut découler directement de la molécule toxique, soit par une action directe, qui dépend de la nature du toxique ou de ses dérivés et leur mode d'action, ou par action indirecte dites d'hypersensibilité. **(Edelstein et faubel, 2011)**

La toxicité rénale directe, affecte les cellules en contact avec le toxique, elle est dose-dépendante et prévisible. Elle provoque la dégénérescence et la nécrose des cellules épithéliales tubulaires, et déficience des tubules rénaux, ce qui engendre une insuffisance rénale aigüe.

La toxicité rénale indirecte "hypersensibilité" survient suite au contact répété avec le toxique. Elle est indépendante de la dose et imprévisible mais nécessite une sensibilisation préalable, ce qui explique l'enclenchement du système immunitaire et de l'hypersensibilité.

La néphropathie interstitielle et le syndrome néphrétique sont les manifestations les plus courantes d'une réaction d'hypersensibilité à un toxique. **(Edelstein et faubel, 2011)**

II.2.2.5.Évaluation de la néphrotoxicité

De nombreux marqueurs rénaux ont été développés, dans le but de détecter des atteintes fonctionnelles ou structurelles rénales d'origine toxique à un stade précoce. **(Marshall et Bangert, 2004)**

- Créatinine

La créatinine est le marqueur biochimique le plus fiable de la fonction glomérulaire, elle est le produit final du catabolisme de la créatine, sa concentration plasmatique est relative à la masse musculaire et varie d'un individu à l'autre (60-120 $\mu\text{mol/l}$). Cette molécule est évaluée pour estimer le taux de filtration glomérulaire; elle est strictement éliminée par les reins, L'augmentation de la concentration de la créatinine dans le sang indique un dysfonctionnement au niveau du néphron. **(Hughes et Jefferson, 2009)**

- L'urée

L'urée est synthétisée dans le foie et résulte des réactions de désamination des acides aminés. Elle est éliminée principalement dans les urines qui sont la voie d'élimination des nitrogènes. Cette molécule est filtrée aussi par le glomérule mais elle est réabsorbée par les tubules par diffusion passive. L'intervalle de référence de l'urée est 2,5-6,6 mmol/l . Les concentrations plasmatiques indiquent généralement une atteinte de la fonction glomérulaire mais aussi elles peuvent être modifiées par une alimentation inadéquate, d'une hémorragie gastro-intestinale, etc. **(Hughes et Jefferson, 2009)**

II.2.2.6. Marqueurs de l'équilibre homéostatique

➤ Le glucose

La concentration normale en glucose à jeun est estimée entre 0.7g /l à 1.05g/l. Lorsque le taux du glucose est élevé, il favorise le stockage des molécules énergétiques issues du métabolisme, tandis que la diminution du taux sanguin du glucose, stimule la libération du glucagon par les cellules alpha du pancréas. Une déficience en ces deux derniers entraîne une diminution ou augmentation du glucose sanguin. (Gaw et al, 2008)

II.3. Étude de toxicité *in vitro*

Les études *in vitro*, sont menées sur des cellules ou des tissus d'origine animale ou humaine, en dehors de l'organisme vivant. Les études *in vitro* livrent une grande quantité d'informations sur la toxicité intrinsèque d'un produit ou sur son mécanisme de toxicité cellulaire et moléculaire. De plus, elles offrent de nombreux avantages sur les études *in vivo*, car elles sont généralement moins coûteuses et peuvent être réalisées dans des conditions mieux contrôlables. (Zurlo, 2000)

II.3.1. Cytotoxicité

La Cytotoxicité est la propriété qu'a un agent chimique ou biologique d'altérer des cellules, et provoquée une apoptose. L'altération des cellules sanguines se traduit par une hémolyse cellulaire. (Dausset, 1976)

II.3.1.1. Le système hématologique

Le sang est un tissu liquide, circulant à l'intérieur d'un système vasculaire clos. Il assure le transport des cellules spécialisées mais aussi d'éléments dissous: protéines, nutriments, hormones, vitamines, minéraux, déchets, médicaments. Le sang est composé de deux parties, le plasma et les cellules. (Valensi, 2005)

- Le plasma et le sérum

La phase liquide du sang, le plasma, est composée d'eau (90 %) et de substances solubles : protéines (albumine, globulines), glucides, lipides, sels minéraux. Sorti du système vasculaire ou sous l'effet de certains stimuli, le plasma coagule: l'une de ses protéines, le fibrinogène, soluble, se transforme en une molécule insoluble; la fibrine et provoque la coagulation. **(Atul et Hoffbrand, 2004)**

- Les cellules du sang

Le sang contient des cellules anucléées; les hématies (érythrocytes), des cellules nucléées; les leucocytes (ou globules blancs), des fragments de cytoplasme et les plaquettes (ou thrombocytes). Leur origine est la médullaire, ils proviennent d'une même cellule souche hématopoïétique totipotente. **(Stevens et Lowe, 1997)**

➤ Les hématies

Les hématies également nommées globules rouges ou érythrocytes, sont des cellules anucléées, biconcave. Formées dans la moelle osseuse, Leur production est régulée par une hormone, l'érythropoïétine. Elle a pour fonction, le transport de l'oxygène dans l'organisme. **(Prchal et Gregg, 2005)**

➤ Structure des hématies

L'érythrocyte se compose d'une membrane, et d'un cytoplasme (enzymes et hémoglobine). La membrane cellulaire, composée d'une bicouche lipidique, de glycoprotéines membranaires, elle assure le maintien de la forme en disque biconcave, et permet les échanges entre plasma et cytoplasme qui se compose d'eau, d'ions minéraux (K⁺, Na⁺, Ca⁺⁺, etc.), de glucose et de deux constituants essentiels de nature protéique; l'hémoglobine et l'ensemble des enzymes érythrocytaires.

L'hémoglobine permet le transport de l'oxygène et du dioxyde de carbone. Elle est formée par quatre chaînes de globine polypeptidique possédant chacune une molécule d'hème contenant du fer. **(Wajcman, 2005)**

Les enzymes érythrocytaires fournissent l'énergie nécessaire à la survie de l'hématie. Elles ont pour rôle, le maintien structural et fonctionnel de la membrane érythrocytaire et la protection de l'hémoglobine de l'oxydation. (Prchal et Gregg, 2005)

II.3.1.2.Mécanisme de la Cytotoxicité

II.3.1.2.1.Cytotoxicité directe

Le premier mécanisme de cytotoxicité des cellules du système hématologique, et plus exactement les érythrocytes, est l'action directe du xénobiotique ou de l'un de ces métabolites. Un des mécanismes de toxicité directe est la mort par apoptose. Dans ce type de mort cellulaire, la membrane cellulaire reste intacte, par opposition à la nécrose. Parmi les agents cytotoxiques; les médicament destinés à la chimiothérapie (les agents alkylant et les inhibiteurs de la topoisomérase).

La toxicité directe peut-être liée à la production de métabolites toxiques comme le cas du benzène, qui se transforme, après métabolisation dans le foie par le cyt p-450, en métabolite (hydroquinone) qui est transformée dans la moelle osseuse en radical phénoxy, très réactif, responsable de la destruction des cellules de cette dernière. (Vaubourdolle, 2007)

II.3.1.2.2.Cytotoxicité indirecte (Hémolyse oxydative)

Quand l'érythrocyte est soumis à un stresse oxydatif sévère par addition d'un produit oxydant, il en résulte une hémolyse toxique. L'hémolyse est liée à une lipopéroxydation de la membrane cellulaire, une oxydation des protéines membranaires et une destruction de la membrane de l'érythrocyte. (Vaubourdolle, 2007)

I. Matériel et méthodes

I.1. Matériel végétal

I.1.1. Collecte du matériel végétal

Les graines fraîches de *Nigella damascena* ont été importées à partir d'une source commerciale en France. Une fois réceptionnées, les graines ont été soigneusement nettoyées et conservées à l'abri de la lumière dans un endroit sec. Après avoir séché à l'étuve pendant 72h à 30°C, les graines ont été gardées dans des récipients fermés avant l'utilisation.

I.1.2. Extraction des alcaloïdes totaux

L'extraction a été effectuée à partir de la poudre de graine selon le protocole décrit par Ewin (1912).

30 grammes de la poudre fine de la graine est extraite par 250ml d'éther de pétrole par macération pendant 72h. L'extrait éthérique est évaporé puis mélangé à une solution HCl (5%). Ce mélange subit une délipidation par le chloroforme puis basification par le carbonate de potassium. Le précipité formé est finalement extrait par le chloroforme et évaporé, par la suite, on récupère sur des boîtes de Pétri (pesées avant et après) les alcaloïdes totaux. Le rendement de l'extrait a été calculé par rapport à la masse initiale de la matière sèche.

$$\text{Rendement (R}_d\text{)} = \left(\frac{m}{m_i} \right) \times 100$$

- m : masse de l'extrait brut
- m_i : masse de la matière sèche initiale
- R_d : rendement massique

I.2. Matériel animal

Toutes les étapes qui suivent ont été menées conformément aux directives de l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economiques), Guideline-407, adopté le 03 octobre, 2008.

I.2.1. Animaux

Cette étude a été effectuée sur des souris adultes *Swiss albinos*, blanches mâles et femelles, de poids moyen de 25g, provenant de L'institut Pasteur d'Alger.

Les animaux sont identifiés individuellement et distribués aléatoirement sur 04 groupes de 12 souris, noté de G1 jusqu'à G4. Chaque groupe est reparti sur deux cages contenant 6 mâles et 6 femelles chacune.

Les groupes ont été subdivisés en:

- ❖ Groupe témoin positif: reçoit le véhicule (eau physiologique + DMSO (10%)).
- ❖ Groupe témoin négatif: reçoit l'eau physiologique uniquement.
- ❖ Deux groupes tests: reçoivent des doses (20 et 100 mg/kg d'alcaloïdes totaux).

Les souris ont été retirées 7 jours avant le début de l'expérience afin qu'ils s'habituent au nouvel environnement du laboratoire (température à 26°C, humidité relative de 45 à 60%), et aux manipulations (injection d'eau physiologique 0.25ml *ip*, et au contact avec le personnel du laboratoire). Elles ont été soumises à un rythme nyctéméral (12h d'éclairage et 12h d'obscurité). Les animaux sont nourris avec des granulés provenant de l'ENAB El-Kseur, et de l'eau de robinet "*ad libitum*" (**Figure 4**). La sciure est renouvelée chaque jour pour assurer une bonne hygiène aux souris.



Figure 4: Conditions d'installation des souris au niveau du laboratoire.

I.3.Évaluation de la toxicité des alcaloïdes totaux *in vivo*

I.3.1.Choix des doses et voie d'administration

Les alcaloïdes totaux ont été solubilisé dans du DMSO-Eau physiologique (1:9 (v/v)), les groupes tests (G1 et G2) reçoivent respectivement : 20mg/kg et 100mg/kg. Chaque semaine, la dose est ajustée selon le poids moyens de chaque groupe mâle et femelle. Le groupe témoin positif a reçu de l'eau physiologique + DMSO, quant au groupe témoin négatif, reçoit strictement de l'eau physiologique provenant toujours du même lot.

L'administration des alcaloïdes, par voie intra péritonéale (**Figure 5**), a été faite à heure fixe (9:00 am) durant 28 jours . Le choix de la voie d'administration tient compte de la voie utilisée pour l'emploi thérapeutique et des possibilités de résorption.(**Manahan, 2002**). En effet les alcaloïdes de *Nigella damascena* sont moins actifs par voie orale (**Bekemeier et al., 1967**).

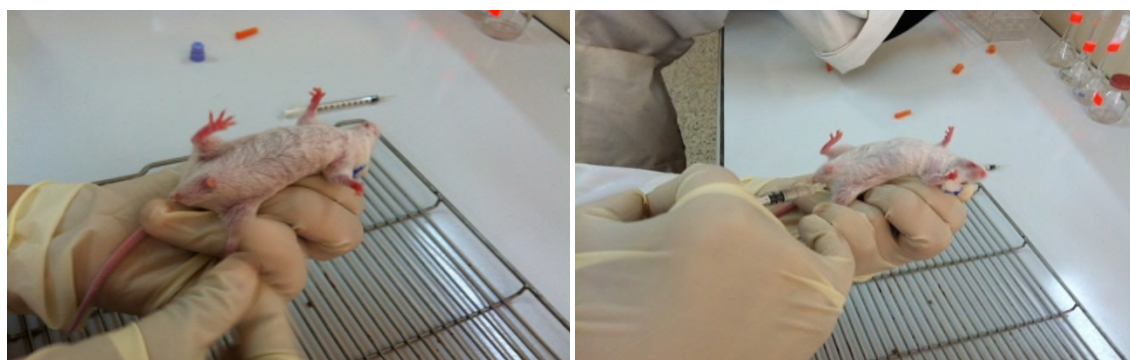


Figure 5: Administration de l'extrait "alcaloïdes totaux" par voie intra-péritonéale.

II.3.2. Suivre quotidien et observation comportementale

L'observation comportementale et l'examen morphologique des souris, sont tous deux des paramètres non négligeables dans une étude toxicologique.

- Observations comportementales

Les observations sont effectuées quotidiennement sur toutes les souris, d'un point de vue comportemental. Elles sont réalisées avant et après administration de l'extrait "alcaloïdes totaux" de *Nigella Damascena*. Suivant plusieurs critères proposés par **Mr CHADER**, appliqués au niveau de l'animalerie du LNCPP d'Alger, pour les études pré clinique. (**Annexe I**)

- Température, Poids et alimentation

La prise de température s'est faite d'une façon hebdomadaire, par voie rectale.

Le poids corporel des souris ainsi que le poids de leurs alimentation est pesé et noté chaque jour avant l'administration de l'extrait, et cela durant toute la période de l'étude.

I.3.3. Études biochimique

Les souris ont été privées de nourriture, mais pas d'eau, le jour qui précède le sacrifice.

- Prélèvement sanguin et analyses biochimiques

Le prélèvement sanguin est effectué par décapitation sous anesthésie en utilisant la ketamine (**Figure 6**) à l'aide d'une lame de Bistouri. Le sang a été récupéré directement dans des tubes héparines puis centrifugé à 3000 tours/min, pendant 5 min. Après avoir recueilli le sérum, des dosages biochimiques cliniques ont été réalisés afin de déterminer un bilan hépatique (Transaminases: ALT et AST, bilirubine) et rénal (Urée, Créatinine) ainsi que de la glycémie.



Figure 6: A droite: une souris anesthésiée; A gauche: Prélèvement de la kétamine.

1.3.4. Étude histopathologique

- Prélèvement d'organes et fixation

Après prélèvement sanguin, les souris ont été déposées sur une surface plane (**Figure 7**), et sacrifiées par dislocation cervicale. Les souris sacrifiées sont posées face dorsal contre le liège; les membres sont étirés et fixés en extension par des épingles piquées obliquement dans les mains et les pieds.

Puis on effectue une boutonnière dans la peau de l'abdomen en avant de l'orifice urinaire. On y introduit une sonde cannelée en décollant la peau et la coupant avec un scalpel, la peau est écartée. Une petite incision est pratiquée dans la paroi musculaire de l'abdomen jusqu'au sternum. Suite à ça, on procède au prélèvement des deux organes, rein et foie, et les isolés afin d'observer des changements macroscopiques et microscopiques. Une fois isolés, ces organes sont immergés dans une solution de formol 10% pour fixation.

Les étapes qui suivent la fixation : inclusion, coupe et coloration, ont été effectuées au niveau du laboratoire d'anatomo-pathologie du CHU de Sétif.

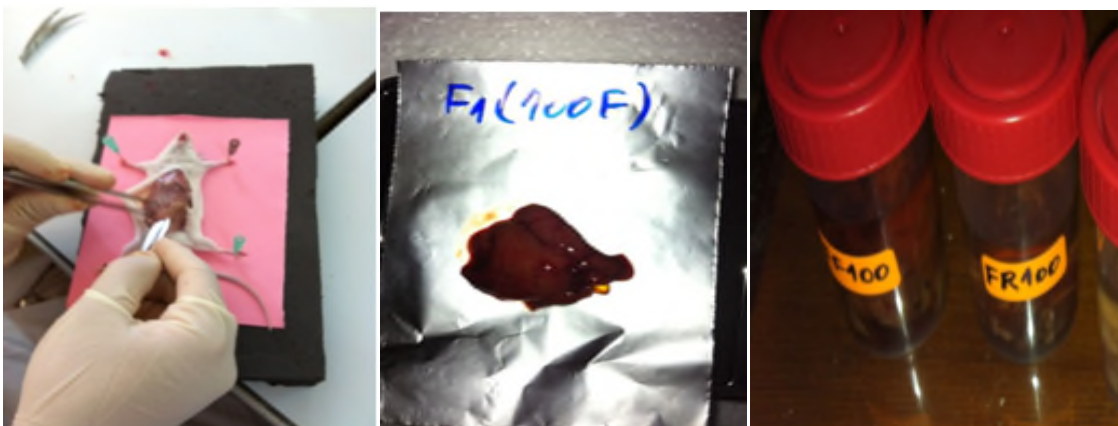


Figure 7: Dissection, prélèvement et fixation.

I.4.Évaluation de la cytotoxicité des alcaloïdes *in vitro*

I.4.1.Etude hémolytique

I.4.1.1.Principe

Le principe de ce test est d'évaluer la lyse des hématies ainsi la libération d'hémoglobine en présence d'une substance toxique. Les hématies qui restent intactes sédimentent.

I.4.1.2.Isolement des érythrocytes

Protocole expérimentale

Le sang frais, de plusieurs volontaires humains, (qui ne sont sous aucun traitement, étudiant ou personnel de laboratoire) est prélevé à chaque essai, au niveau de l'infirmier de l'université, par la veine du pli du coude directement dans des tubes héparinés.

Après centrifugation à 3000 *rpm* durant 10 minutes, le surnageant est éliminé et le culot est lavé trois fois à un même volume d'eau physiologique froide. Le culot obtenu au troisième lavage forme la totalité des hématies.

I.4.2.Préparation des solutions

- Préparation de la solution Triton X-100^[1]

Afin d'évaluer l'hémolyse totale, on a choisi le triton X-100, pour cela, un volume de 0.1 ml de triton X-100 est dilué dans 0.9 ml d'eau physiologique, et conservé à 4°C.

- Préparation de la solution mère d'alcaloïde

L'extrait "alcaloïdes totaux" de la graine de *Nigella damascena*, est solubilisé dans du DMSO à 2% à température ambiante, sous agitation énergique.

^[1] Le triton X-100 est un détergent doux qui permet d'isoler et de purifier les protéines dont l'activité peut être ensuite analysée. Il est utilisé pour déstabiliser la membrane érythrocytaire et de ce fait libérer son contenu en hémoglobine.

1.4.3. Étude de l'hémolyse

Protocole expérimentale

Ce test est évalué selon la méthode de Tramer et al en 2012. A partir de la solution mère à une concentration de 2 mg/ml, une série de tubes à essai à différentes concentrations est préparée, par dilution avec de l'eau physiologique, la gamme des concentrations en extrait est comprise entre 1 et 0.01562 mg/ml.

L'analyse est réalisée dans 10 tubes. Un volume de 800 µl (eau physiologique, alcaloïdes totaux (solubilisés dans DMSO à 2%)), est mélangé avec 200 µl du culot érythrocytaire;

- Un témoin négatif est préparé avec du DMSO(2%) et de l'eau physiologique.
- Un témoin positif est préparé avec de l'eau physiologique et du triton X.
- Une gamme de concentration en alcaloïdes comprise entre 1 et 0.01562 mg/ml .

Les tubes sont incubés pendant 30min à 37°C puis centrifugés à 9000g pendant 5 min, le degré d'hémolyse est déterminé en mesurant l'absorbance de l'hémoglobine à 415 nm avec un spectrophotomètre UV visible de type analytica.

1.4.4. Observation microscopique

Pour identifier d'éventuels effets toxiques ou autres changements morphologiques, que les alcaloïdes totaux de *Nigella damascena* pourraient exercer sur les globules rouges, des frottis sont réalisés à concentrations différentes d'extrait et observés sous microscope optique à différents grossissements;

- une dose à 125 µl/ml
- une dose à 1000 µl/ml

1.4.5. Analyse statistique

Les données obtenues ont été analysées statistiquement en utilisant le test ANOVA/MANOVA pour les comparaisons multiples. Les valeurs de $p \leq 0.05$ sont considérées statistiquement significatives.

II.1. Matériel végétal

II.1.1. Rendement d'extraction

Le taux d'extraction des alcaloïdes de *Nigella damascena* a été calculé par rapport à la masse de la poudre initiale et représente 0,1%. En Effet, **Mohan (1960)**, rapporte que la damascenine, l'alcaloïde majoritaire de la graine de *Nigella damascena*, représente près de 0.1 à 0.7 % du poids de la graine. Notre rendement est approximativement dans l'intervalle des concentrations citées par cet auteur. Toutefois, le rendement semble être lié à plusieurs paramètres : aux propriétés génétiques des graines ainsi qu'à l'origine géographique, aux conditions et à la durée de stockage, de la récolte, aux solvants utilisés ainsi qu'aux méthodes d'extraction appliquées.

II.2. Toxicité sub-chronique

II.2.1. Paramètres physiques

II.2.1.1. Évolution du poids corporel

Les résultats de l'évolution du poids corporel après traitement sub-chronique par voie intrapéritonéale des alcaloïdes de *Nigella damascena* pendant 28 jours des groupes traités (véhicule : DMSO (10%), 20mg/kg et 100mg/kg d'alcaloïdes totaux) sont représentées sur la **figure 8**. Aucune variation significative n'a été observée pour les groupes traités par rapport aux groupes témoins (recevant l'eau physiologique) pour les deux sexes ($P > 0.05$).

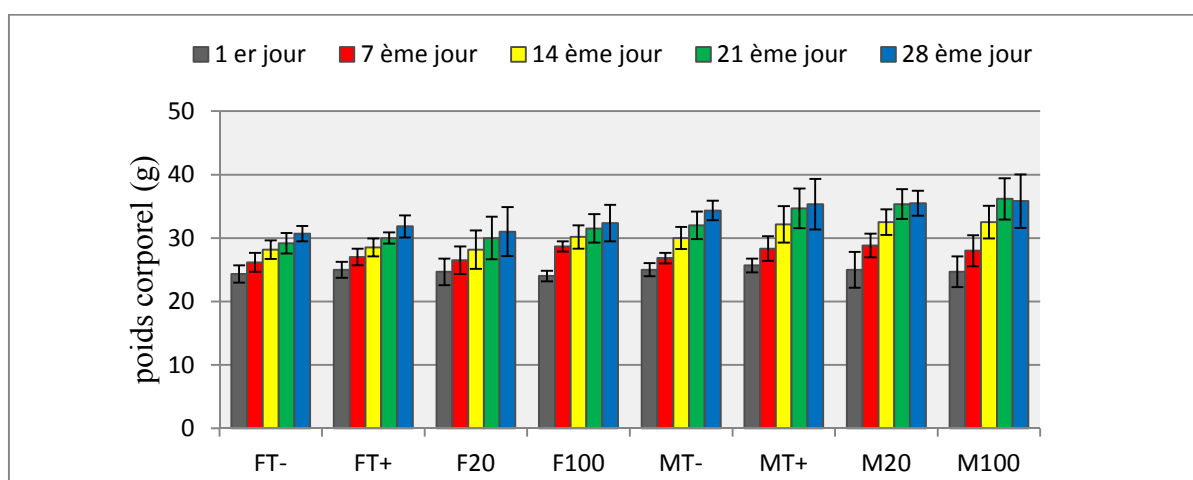


Figure 8 : Variation du poids corporel des différents groupes au cours de l'évaluation de la toxicité sub-chronique. (FT- et MT- : 0mg/kg reçoivent l'eau physiologique; FT+ et MT+ : reçoivent 10% de DMSO-Eau physiologique (v/v); F20 et M20: 20mg/Kg ; F100 et M100: 100mg/Kg d'Alc T. Les données sont exprimées par moyenne \pm écart-type ($P \leq 0.05$ est considéré comme résultat significatif ; $n = 6$)).

II.2.1.2.Évolution de la prise alimentaire

Les résultats de l'évolution de la prise alimentaire après traitement sub-chronique par voie intrapéritonéale des alcaloïdes de *Nigella damascena* pendant 28 jours des groupes traités (véhicule : DMSO (10%), 20mg/kg et 100mg/kg d'alcaloïdes totaux) sont représentés sur la **figure 9**. La prise alimentaire est plus importante chez les mâles que chez les femelles mais aucune variation significative n'a été observée pour les groupes traités par rapport aux groupes témoins (recevant l'eau physiologique) pour les deux sexes ($P > 0.05$).

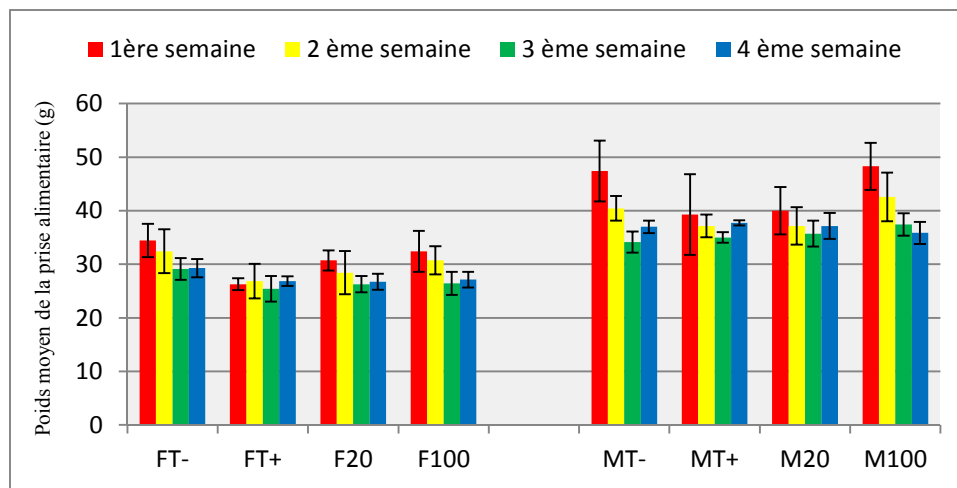


Figure 9 :L'évolution de la prise alimentaire des différents groupes traités et témoin dans les conditions de la toxicité sub-chronique par doses (FT- et MT- : 0mg/kg reçoivent l'eau physiologique; FT+ et MT+ : reçoivent 10% de DMSO-Eau physiologique (v/v) ; F20 et M20: 20mg/Kg ; F100 et M100: 100mg/Kg d'Alc T. Les données sont exprimées par moyenne \pm écart-type ($P \leq 0.05$ est considéré comme résultat significatif ; (n = 6)).

II.2.1.3. Evolution de la température corporelle centrale (température rectale)

Les résultats de l'évolution de la température corporelle centrale, prise par voie rectale après traitement sub-chronique par voie intrapéritonéale des alcaloïdes de *Nigella damascena* pendant 28 jours des groupes traités (véhicule : DMSO (10%), 20mg/kg et 100mg/kg d'alcaloïdes totaux) sont représentés sur la **figure 10**. Ces valeurs sont dans l'intervalle de normalité qui varie entre 36 et 39 °C chez les souris. Aucune variation significative n'a été observée pour les groupes traités par rapport aux groupes témoins (recevant l'eau physiologique) pour les deux sexes ($P > 0.05$).

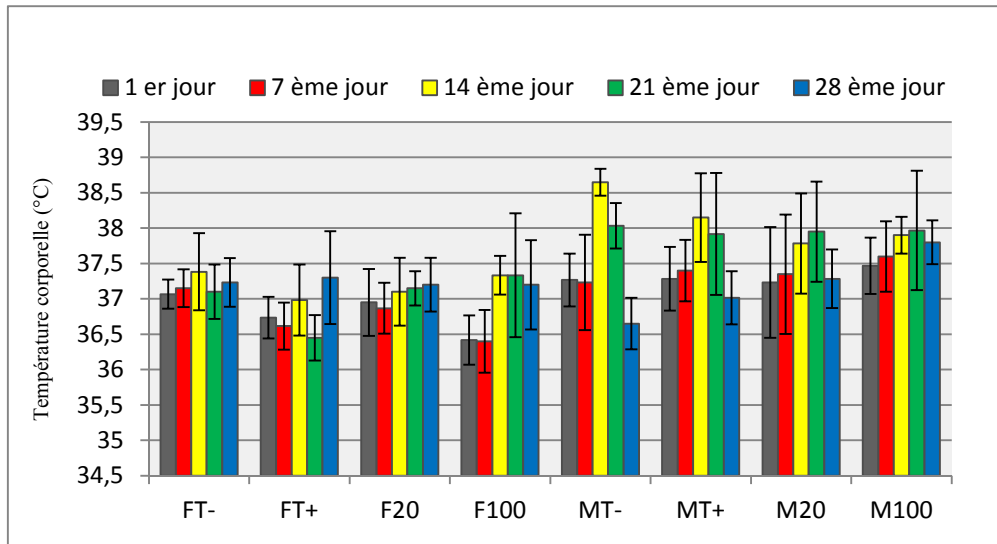
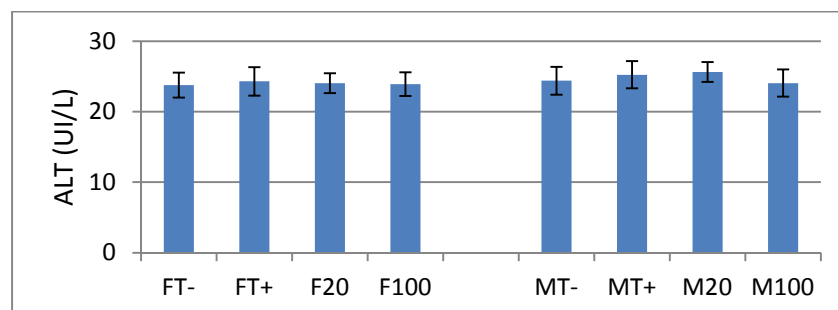


Figure10 : Variation de la température corporelle centrale prise par voie rectale des différents groupes traités au cours de l'évaluation de la toxicité sub-chronique. (FT- et MT- : 0mg/kg reçoivent l'eau physiologique; FT+ et MT+ : reçoivent 10% de DMSO-Eau physiologique (v/v); F20 et M20: 20mg/Kg ; F100 et M100: 100mg/Kg d'Alc T. Les données sont exprimées par moyenne \pm écart-type ($P \leq 0.05$ est considéré comme résultat significatif ; (n = 6)).

II.2.2. Paramètres biochimiques

II.2.2.1. Paramètres hépatiques

Les résultats du dosage de la bilirubine et des transaminases ALT et AST après traitement sub-chronique par voie intrapéritoniale des alcaloïdes de *Nigella damascena* pendant 28 jours des groupes traités (véhicule : DMSO (10%), 20mg/kg et 100mg/kg d'alcaloïdes totaux) sont représentées sur la **figure11**. Aucune variation significative n'a été observée pour les groupes traités par rapport aux groupes témoins (recevant l'eau physiologique) pour les deux sexes ($P > 0.05$).



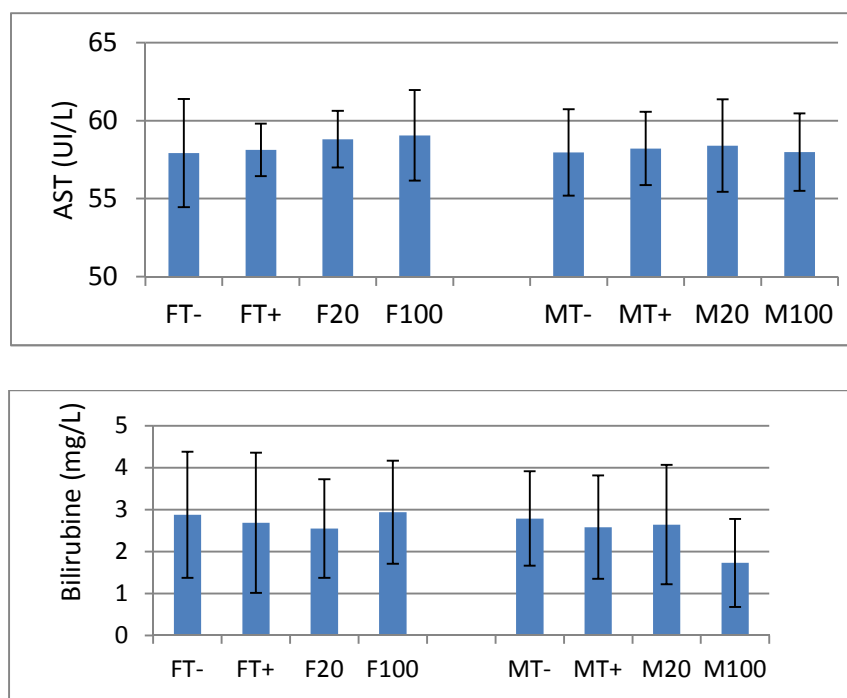
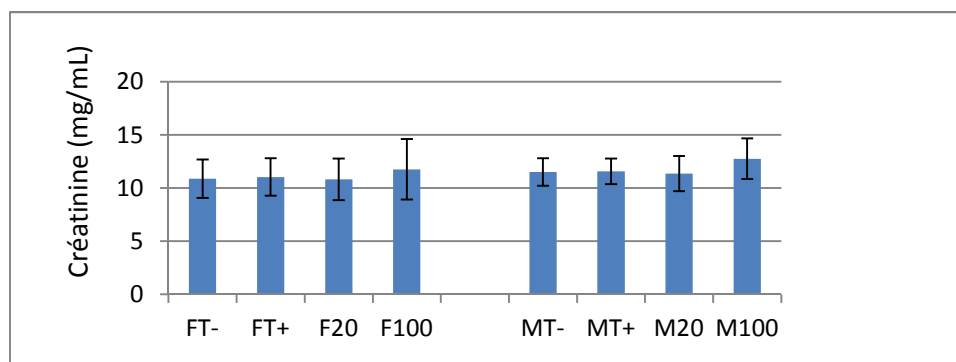


Figure 11 : Dosage des transaminases ALT et AST et de la bilirubine des différents groupes traités et témoin dans les conditions de la toxicité sub-chronique traité par des doses (FT- et MT- : 0mg/kg reçoivent l'eau physiologique; FT+ et MT+ : reçoivent 10% de DMSO-Eau physiologique (v/v) ; F20 et M20: 20mg/Kg ; F100 et M100: 100mg/Kg d'Alc T. Les données sont exprimées par moyenne \pm écart-type ($P \leq 0.05$ est considéré comme résultat significatif ; $n = 6$).

II.2.2.2. Paramètres néphrétiques

Les résultats du dosage de la créatinine et de l'urée après traitement sub-chronique par voie intrapéritonéale des alcaloïdes de *Nigella damascena* pendant 28 jours des groupes traités (véhicule : DMSO (10%), 20mg/kg et 100mg/kg d'alcaloïdes totaux) sont représentées sur la **figure 12** Aucune variation significative n'a été observée pour les groupes traités par rapport aux groupes témoins (recevant l'eau physiologique) pour les deux sexes ($P > 0.05$).



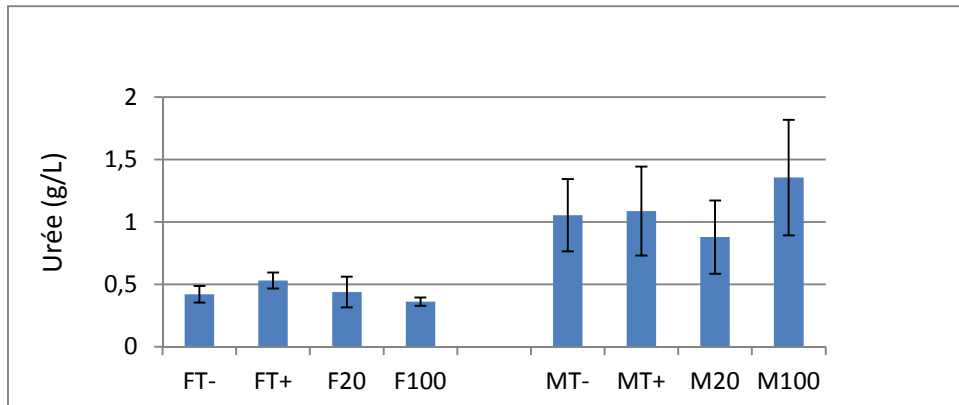


Figure 12: Dosage de la créatinine et de l'urée des différents groupes traités et témoin dans les conditions de la toxicité sub-chronique par des doses (FT- et MT- : 0mg/kg reçoivent l'eau physiologique; FT+ et MT+ : reçoivent 10% de DMSO-Eau physiologique (v/v) ; F20 et M20: 20mg/Kg ; F100 et M100: 100mg/Kg d'Alc T. Les données sont exprimées par moyenne \pm écart-type ($P \leq 0.05$ est considéré comme résultat significatif ; (n = 6)).

II.2.2.3. Paramètres d'équilibre homéostatique

Les résultats du dosage du glucose (glycémie) après traitement sub-chronique par voie intrapéritonéale des alcaloïdes de *Nigella damascena* pendant 28 jours des groupes traités (véhicule : DMSO (10%), 20mg/kg et 100mg/kg d'alcaloïdes totaux) sont représentées sur la **figure 13**. La glycémie est plus importante chez les femelles que chez les mâles, mais aucune variation significative n'a été observée pour les groupes traités par rapport aux groupes témoins (recevant l'eau physiologique) pour les deux sexes ($P > 0.05$).

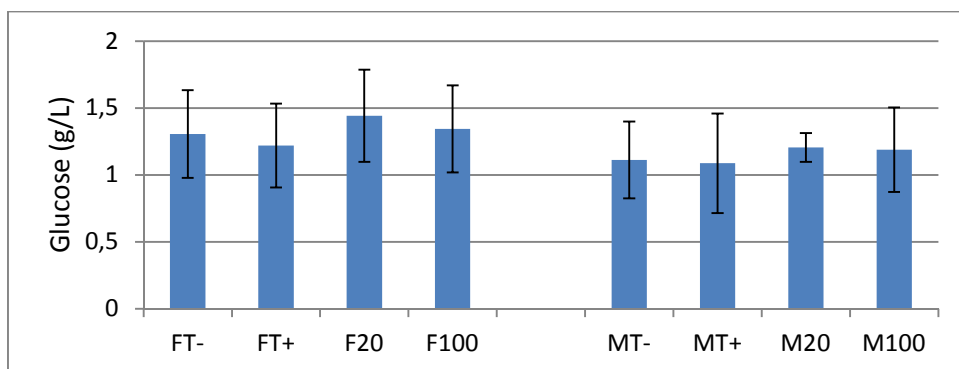


Figure 13 : Dosage du glucose (glycémie) des différents groupes traités et témoin dans les conditions de la toxicité sub-chronique par des doses (FT- et MT- : 0mg/kg reçoivent l'eau physiologique; FT+ et MT+ : reçoivent 10% de DMSO-Eau physiologique (v/v) ; F20 et M20: 20mg/Kg ; F100 et M100: 100mg/Kg d'Alc T. Les données sont exprimées par moyenne \pm écart-type ($P \leq 0.05$ est considéré comme résultat significatif ; (n = 6)).

II.2.3. Examen histopathologique

II.2.3.1. Poids final des organes internes (Foie et reins)

Les résultats du poids final des organes après traitement sub-chronique par voie intrapéritonéale des alcaloïdes de *Nigella damascena* pendant 28 jours des groupes traités (véhicule : DMSO (10%), 20mg/kg et 100mg/kg d'alcaloïdes totaux) sont représentées sur la **figure 14**. Aucune variation significative n'a été observée pour les groupes traités par rapport aux groupes témoins (recevant l'eau physiologique) pour les deux sexes ($P > 0.05$).

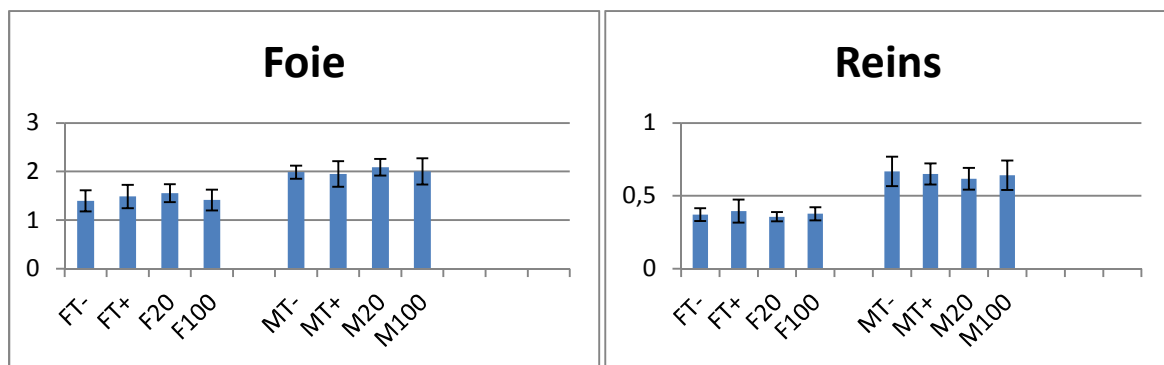


Figure 14 : Poids des organes internes (Foie et reins) des différents groupes traités et témoins dans les conditions de la toxicité sub-chronique par doses (FT- et MT- : 0mg/kg reçoivent l'eau physiologique; FT+ et MT+ : reçoivent 10% de DMSO-Eau physiologique (v/v) ; F20 et M20: 20mg/Kg ; F100 et M100: 100mg/Kg d'Alc T. Les données sont exprimées par moyenne \pm écart-type ($P \leq 0.05$ est considéré comme résultat significatif ; (n = 6)).

II.2.3.2. Histologie hépatique

La **figure 15** montre une micrographie optique (GX40) du parenchyme hépatique des souris des deux sexes de tous les groupes traités et témoins.

Sur ces coupes histologiques le foie présente une structure typique normale. Le foie est entouré par une couche de tissu conjonctif (la capsule de Glisson). Cette capsule entoure le parenchyme hépatique, qui a une organisation polygonale formée de plusieurs lobes hépatiques, qui sont séparés les uns des autres par du tissu conjonctif. Chaque lobe est constitué d'hépatocytes, disposées en anastomosés. Dans le centre du lobe hépatique se trouve la veine Centro-lobulaire, qui reçoit le sang à partir du parenchyme hépatique. Les hépatocytes sont des cellules de forme polygonale.

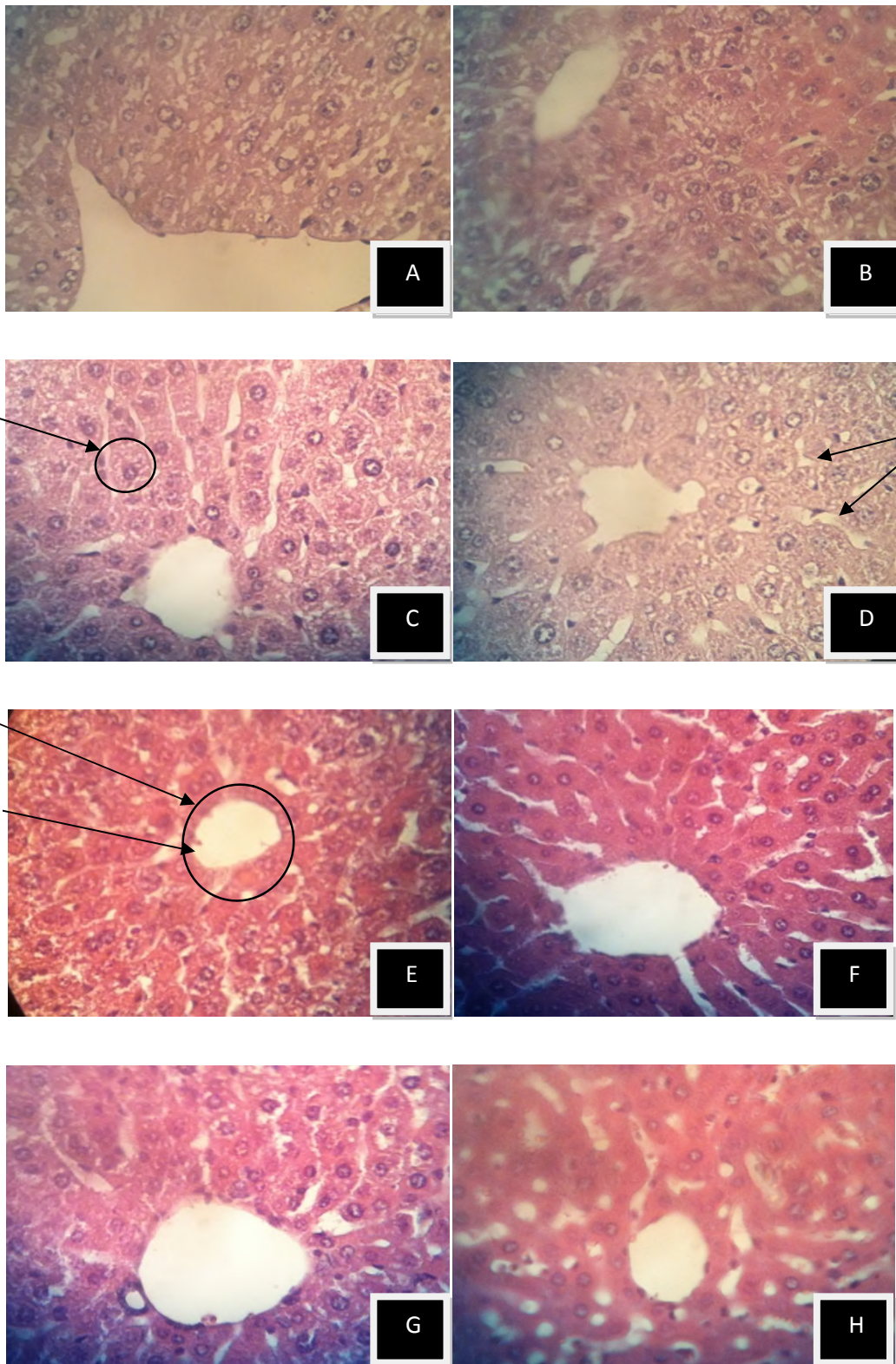
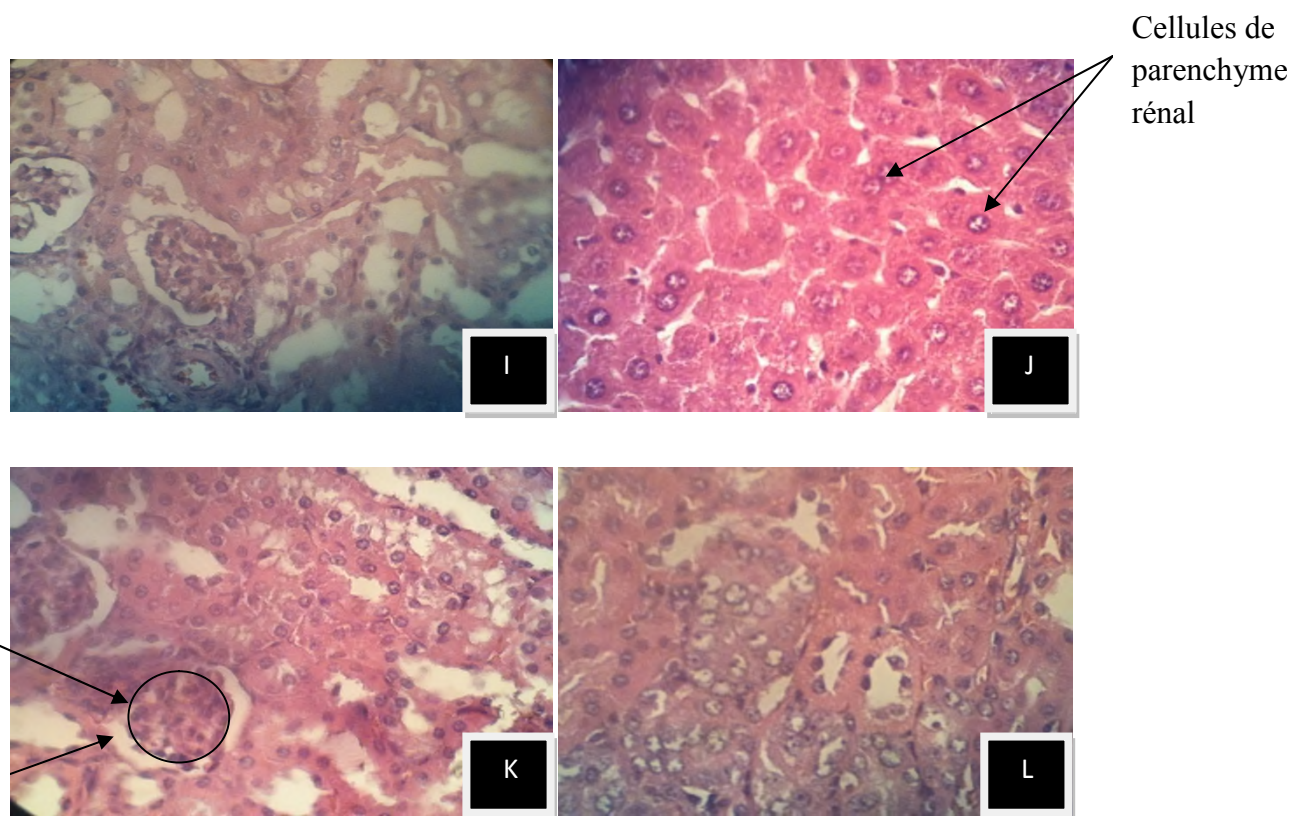


Figure 15 : Micrographie du parenchyme hépatique des souris des deux sexes des groupes traités (Témoin : Eau physiologique : G(M), H(F) ; véhicule : DMSO (10%) : E(M), F(F), 20mg/kg: C(M), D(F) et 100mg/kg A(M), B(F) d'alcaloïdes totaux) (Gx40). M : mâles ; F : femelles.

II.2.3.3. Histologie rénale

La **figure 16** montre une micrographie optique (GX40) du parenchyme rénal des souris des deux sexes de tous les groupes traités et témoins.

Sur ces coupes histologiques le rein présente une structure typique normale. Le parenchyme rénal est entouré d'une capsule fibreuse appelée cortex. On distingue deux zones principales au niveau du rein : une croute externe (cortex rénale) et une médullaire interne. Le cortex rénal comprend un parenchyme composé de différents tubules, au milieu de ces tubes sont observés les corpuscules rénaux composés de capsules de Bowman et de glomérules. La médullaire rénal est d'un aspect strié. Elle est constituée de pyramides de Malpighi. Elle contient la plus grande partie du tube urinaire, notamment les anses de Henlé et les canaux collecteurs, ainsi que les vaisseaux sanguins et lymphatiques.



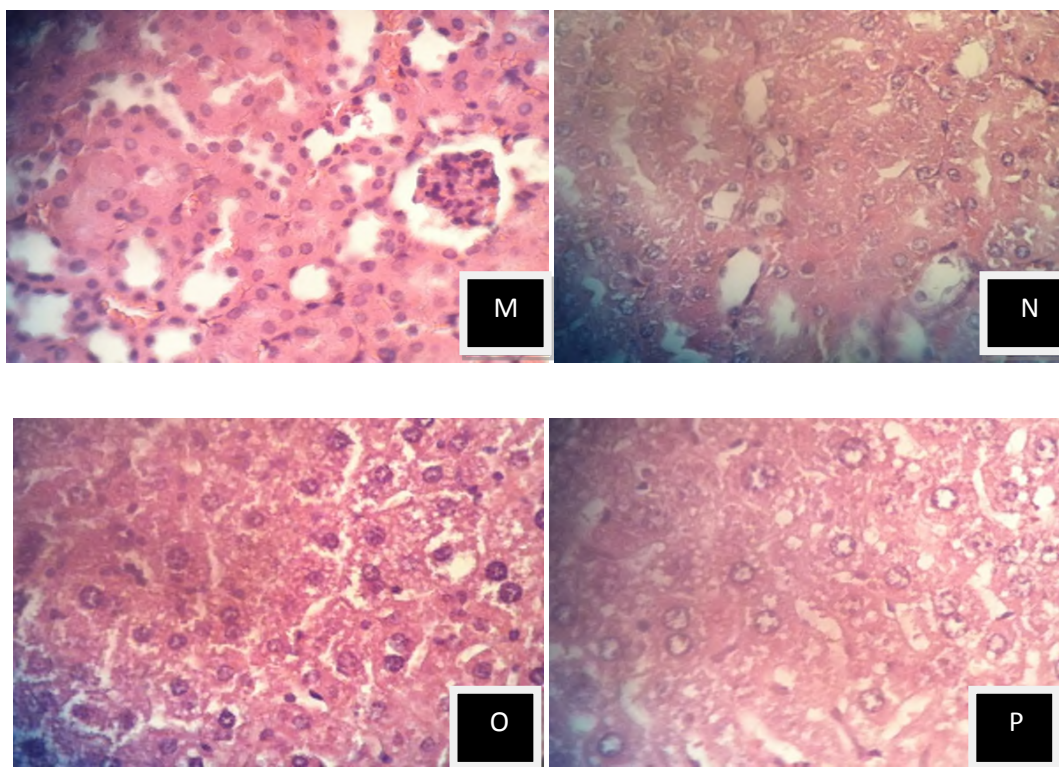


Figure 16: Micrographie du parenchyme rénal des souris des deux sexes des groupes traités (Témoin : Eau physiologique : O(M), P(F) ; véhicule : DMSO (10%) : M(M), N(F), 20mg/kg: K(M), L(F) et 100mg/kg I(M), J(F) d'alcaloïdes totaux) (Gx40). M : males ; F : femelles.

II.3. Etude *in vitro* de la cytotoxicité érythrocytaire

II.3.1. Dosage de l'hémoglobine et pourcentage d'hémolyse

Les observations faites au cours de notre évaluation révèlent que 1000 μg d'alcaloïdes totaux pendant un temps d'incubation de 30min est une dose qui n'affecte pas l'intégrité cellulaire. D'ailleurs, les résultats obtenus en calculant le pourcentage d'hémolyse ainsi que par dosage spectrophotométrique de l'hémoglobine déversée par les érythrocytes au cours du processus hémolytique ne montrent aucune différence d'absorbance significative (**Figure 17**) par rapport au témoin ($P > 0.05$). Le plus grand pourcentage d'hémolyse a été obtenu en présence de 1000 μg d'alcaloïdes totaux, qui est représenté par 5,54% d'hémolyse avec 5,72% de celui du control (**Figure 17**).

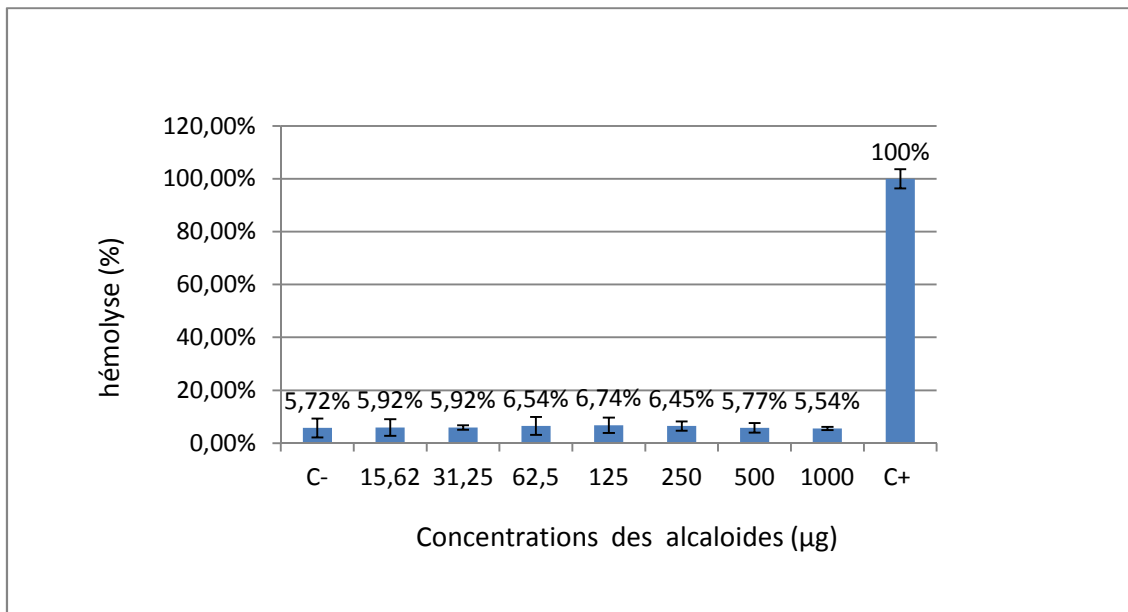
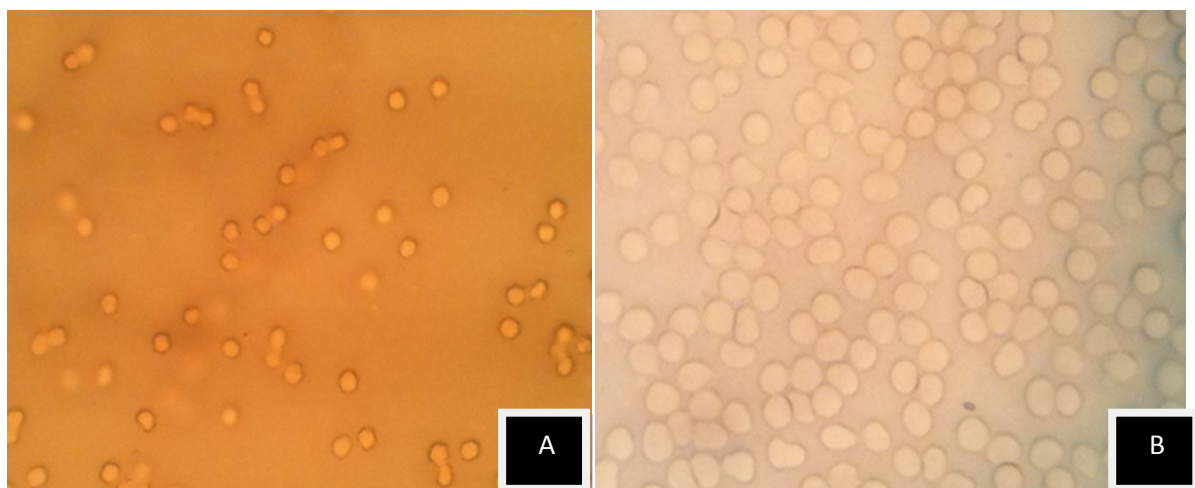


Figure 17: Pourcentage d'hémolyse érythrocytaire en présence et en absence des différentes concentrations d'alcaloïdes et du Triton X-100 ($P > 0.05$).

II.3. 2. Observation microscopique

Les observations par microscopie optique ne révèlent aucun signe d'affection morphologique des cellules érythrocytaires. Les frottis sanguins observés à grossissement X40 (**Figure 18**) montrent que les membranes cellulaires sont intactes aussi bien au niveau du control qu'en présence des différentes concentrations d'alcaloïdes contrairement à celui en présence du Triton-X où le nombre d'érythrocytes à diminuer et les membranes paraissent affectées.



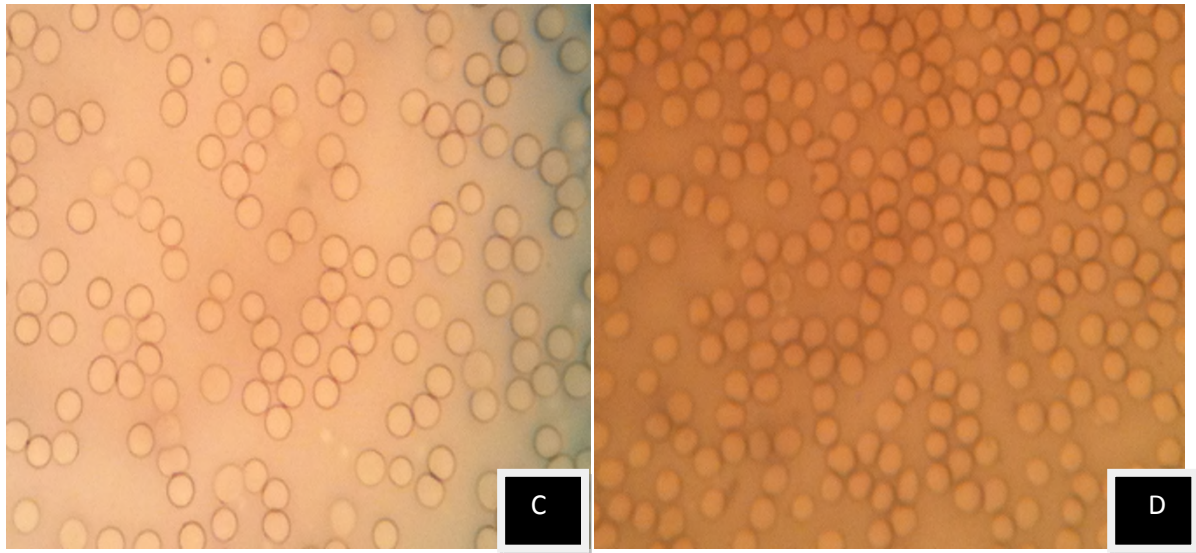


Figure 18 : Images par Microscopie optique de la morphologie érythrocytaire en absence et en présence des alcaloïdes totaux de la graine de *Nigella damascena*. (A) Cellules control positif ; (B) Cellules control négatif; (C) Cellules incubées avec 125 µg/ml ; (D) Cellules incubées avec 1000 µg/ml (Gx40).

II.4. Discussion générale

L'exposition aux drogues ou aux composés chimiques résultant de la toxicité se manifeste au niveau des organes spécifiques, connus par les organes cibles de la toxicité. Les facteurs qui contribuent à la susceptibilité d'un organe à la toxicité incluent, la pharmacocinétique, le métabolisme des drogues ou des composés chimiques, et la capacité de réponse d'un organe à des composés toxiques. Les tests de toxicité permettent non seulement une compréhension des mécanismes de la toxicité mais nous informent aussi sur la potentielle dangerosité de ces substances sur la santé de l'Homme. Ce travail a pour but de réaliser un profil toxicologique *in vivo* et *in vitro* des alcaloïdes de *Nigella damascena*.

Afin de déceler un ou plusieurs signes de toxicité probable, le comportement des souris des différents groupes expérimentaux ont été suivie chaque jour avant et après injection en suivant les signes de toxicité cités en annexe recommandés par le LNCPP mais aucun de ces signes n'a été décelé.

Généralement, les altérations du poids corporel et des organes internes, la prise alimentaire ainsi que la température centrale des souris reflètent une toxicité après exposition aux agents toxiques. Notre étude montre qu'aucune variation significative ($P > 0.05$) de l'un

de ces paramètres n'a été observée pour les groupes traités par rapport au groupe témoin pour les deux sexes qui marque probablement une intégrité structurale et/ou fonctionnelle normale.

Contrairement aux travaux d'**Azadeh et al (2013)**, sur la toxicité sub-chronique de la mitraginine, un alcaloïde extrait à partir de *Mitragyna speciosa* pendant 28 jours, qui montrent qu'il y'a une diminution des poids des femelles ainsi que la prise alimentaire à une dose de 100 mg/Kg/jour.

Le foie est la première cible des substances absorbées au niveau de l'intestin. L'élévation des taux des transaminases ALT et AST ainsi que de la bilirubine est un indicateur des fonctions hépatiques (**Martin et al., 1981**). L'ALT est une enzyme qui se trouve à une concentration élevée au niveau du cytoplasme hépatique, et l'augmentation sérique du taux de cette enzyme reflète des dommages hépatocellulaire (**Tennekoon et al., 1991**). Cependant l'AST est une enzyme non spécifique, qui se trouve également dans d'autres cellules telles que les cellules cardiaque, musculaire et sanguine (**Nyblom et al., 2002**). De ce fait, l'AST est un indicateur hépatique moins spécifique que l'ALT. La bilirubine est utilisée comme marqueur hépatique, car son taux élevé dans le corps suggère une anomalie hépatique (**Hughes et Jefferson, 2009**).

Le dosage des paramètres hépatiques à savoir, les transaminases ALT et AST ainsi que de la bilirubine montre qu'aucune altération n'a affecté les taux de ces paramètres pour les groupes traités par rapport aux groupes témoins pour les deux sexes ($P > 0.05$). Nos résultats marquent donc une fonction hépatique normale.

Les cellules rénales sont exposées à des concentrations plus élevées en toxique vu qu'elles assurent le processus de filtration des déchets sanguins. La fonction rénale est appréciée par le dosage de la créatinine et de l'urée sériques. La créatinine est le marqueur biochimique le plus fiable de la fonction glomérulaire. Elle est le produit final du catabolisme de la créatine et sa concentration plasmatique est relative à la masse musculaire (**Hughes et Jefferson, 2009**).

Notre étude montre qu'aucune altération n'a affecté les taux de la créatinine et de l'urée des groupes traités par rapport aux groupes témoins pour les deux sexes ($P > 0.05$). Nos résultats marquent donc une fonction rénale normale.

Les résultats de notre évaluation biochimique sont comparables aux travaux de **Marcelo et al (2009)** sur la toxicité sub-chronique de l'alcaloïde *p-synephrine* à une dose de 30 et de 300

mg/Kg/jour pendant 28 jours, qui montrent que le dosage des paramètres biochimiques, AST, ALT et créatinine ne présentent pas de différence significative par rapport aux témoins. Par contre, **d’Azadeh et al (2013)** ont constaté une augmentation significative d’AST, d’ALT, créatinine et urée lors de l’étude de la toxicité sub-chronique de la mitraginine, un alcaloïde extrait à partir de *Mitragynaspeciosa* à des doses de 1, 10, 100 mg/Kg/jour pendant 28 jours.

L’étude histopathologique faite sur le foie et les reins montre non seulement un aspect morphologique normal mais aussi une structure histologique typique normale du parenchyme hépatique et rénal des souris traitées et témoins des deux sexes. Ces résultats sont similaires aux travaux de **Marcelo et al (2009)** sur la toxicité sub-chronique de *p-synephrine* à une dose de 30 et de 300 mg/Kg/jour pendant 28 jours, qui ne démontre aucun changement des poids des organes ni altérations histologiques.

Les résultats histopathologiques apportent donc un appui corrélatif avec les résultats de l’analyse biochimique, ce qui confirme que les souris sont saines et ne présentent aucune anomalie hépatique et rénale.

Le pourcentage d’hémolyse observé avec une concentration élevée telle que 1000 µg n’a presque aucun effet ($P > 0.05$). Les observations microscopiques ainsi que le taux d’hémolyse sont en parfaite corrélation, car aucun effet sur la morphologie érythrocytaire n’a été détecté. On constate donc que nos alcaloïdes sont loin d’être toxiques. Ces résultats sont comparables à ceux de **Lin et al (1998)** qui ont démontré que la berbérine, un alcaloïde de *Coptis chinensis* ne provoque pas d’hémolyse. De même **Bribi et al (2013)** ont démontré que 1000 µg d’alcaloïdes de *Fumaria capréolata* n’ont aucun effet sur l’hémolyse.

Conclusion et perspectives

Nigella damascena est connue par ses effets bénéfiques et son utilisation traditionnelle pour plusieurs vertus thérapeutiques.

L'étude de la toxicité sub-chronique des alcaloïdes de *Nigella damascena* sur des souris *Swiss albinos*, avec deux doses ; 20 et 100 mg/kg, n'a révélé aucune toxicité, suite à l'étude comportementale et des paramètres physiologiques (l'évolution du poids et la température), au dosage des paramètres biochimiques (les transaminases AST/ALT, bilirubine, urée, créatinine, et glucose) et à l'étude histopathologique du foie et des reins.

La juxtaposition des différents résultats du bilan hépatique, néphrétique et ceux de l'étude histopathologique, indique que l'administration par voie *ip* des alcaloïdes des graines de *Nigella damascena* pendant 28 jours à des doses de 20 et 100 mg/Kg/jour, ne présente pas d'effet toxique sur les deux organes étudiés.

L'étude *in vitro* de la cytotoxicité, sur des érythrocytes humains, des alcaloïdes de *Nigella damascena*, à des doses qui varient de 1 à 0.01562mg/ml, n'a pas révélée aucune toxicité, ce qui se traduit par une absence d'hémolyse.

En plus de l'étude de la toxicité sub-chronique et de la cytotoxicité réalisée, il sera très important en perspectives, d'établir un profil toxicologique complet des alcaloïdes de cette plante, à savoir l'étude de la toxicité chronique afin d'évaluer sa toxicité à long terme, et de voir ses effets toxiques -s'ils existent- à l'échelle cellulaire et moléculaire.

Annexe

Annexe 1: Test comportementales établie par le Dr CHADER, de l'Institut nationale de contrôle des produits pharmaceutiques.

Observation comportementale		
Dans la cage	A la manipulation	Réflexes
- fermeture palpébrale - mouvement clonique - mouvement tonique	- facilité d'enlèvement de la cage - réactivité au maniement - larmolement - fermeture palpébrale - pilo-érection - exophtalmie - salivation	- à l'approche - touché - claquement - pincement de la queue - occulo-palpébrale - redressement
Observation comportementale		
Réponse autonome	Activité motrice	Système nerveux Centrale
- miction - défécation - contorsion(courbure)	- tétanie - reflexe De Redressement	- queue en S - tremblement - agressivité - convulsion - excitation et hyperactivité - stéréotypie - démangeaison

Résumé:

Nigella damascena est une plante annuelle herbacée, utilisée en phytothérapie orientale pour le traitement des affections catarrhales, l'aménorrhée et comme diurétique, les graines réduites en poudre sont utilisées comme sternutatoire. Aucune étude systématique de la toxicité potentielle des alcaloïdes de cette plante n'a été menée. Cette étude vise à déterminer le profil de toxicité des alcaloïdes de l'extrait des graines de *Nigella damascena* chez la souris. Dans l'étude de toxicité sub-chronique, un total de 48 souris adultes suisses albinos mâles et femelles ont été utilisés. Aucune mortalité ou comportement anormal n'a été observé. Dans l'étude de la toxicité sub-chronique avec deux doses 20 et 100mg/kg, aucune différence significative n'a été observée concernant les paramètres biochimiques ; le glucose, la bilirubine, l'aspartate aminotransférase (AST), l'alanine aminotransférase (ALT), l'urée, la créatinine. De la même manière, aucunes modifications histopathologiques n'ont été observées dans les reins et les structures du foie. D'autre part, l'étude de la cytotoxicité des érythrocytes, en utilisant deux concentrations (125 et 1000 µg / ml) d'alcaloïdes totaux, n'a révélé aucun hémolyse.

Mots clés : *Nigella damascena*, alcaloïdes, toxicité sub-chronique, cytotoxicité.

Summary:

Nigella damascena is an herbaceous annual plant used in oriental herbal medicine for the treatment of catarrhal affections, amenorrhea and as a diuretic; powdered seeds are used as sternutatory. No systematic study of the potential toxicity of the plant alkaloids has been described. This study aimed to determine the toxicity profile of seed alkaloids extract from *Nigella damascena* in mice. In sub-chronic toxicity study, a total of 48 adult male and female Swiss albino mice were used. No mortality or abnormal behavior was observed. In sub-chronic toxicity study when working at 20 and 100mg/kg respectively, no significant differences were observed concerning glucose, bilirubine, aspartate transaminase (AST), alanine aminotransferase (ALT), urea, creatinine, parameters. In the same manner, no histopathological alterations had been observed in the kidney and liver structures. On the other hand, the study of erythrocyte cytotoxicity, using two concentrations (125 and 1000µg/ml) of total alkaloids, has revealed no hemolysis.

Keywords : *Nigella damascena*, alkaloids, sub-chronic toxicity, cytotoxicity.

Références Bibliographiques

- **Abayomi, S.** (2010). *Plante médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique*. Nigeria: Karthala, 212p.
- **Agradi, E., Fico, G., Cillo, F., Francischi, C and Tomé, F.** (2002). Estrogenic activity of *Nigella damascena* extracts, evaluated using a recombinant yeast screen. *Phytother. Res*, 16 (5), pp 414–416.
- **Agradi, E., Fico, G., Gillo, F., Francischi, C and Tomé, F.** (2001). Estrogenic Activity of phenolic compounds from *Nigella damascena*, evaluated using a recombinant yeast screen, *Planta Med*, 67 (6), pp 553-555.
- **Alan, S., Lowe, J.** (2006). *Histologie humaine*. Paris : Elsevier SAS, pp 215-275.
- **Andrade, R.J., Robles, M and Lucena, M.I.** (2009). Rechallenge in drug-induced liver injury: the attractive hazard. *Expert Opin Drug Saf*, 8(6), pp709-14.
- **Andreas, G.H., Oeggl, K.** (2005). The oldest evidence of *Nigella damascena* L. (Ranunculaceae) and its possible introduction to central Europe. *Veget Hist.Archaeobot*, pp 562–570.
- **Arbo, M .D ., Schmitt, G.C ., Limberger, F.M , Charão, M.F ., Moro A.M ., Ribeiro, G.L ., Dallegrave, E., Garcia,S.C ., Leal, M.B , Limberger,R.P .**(2009). Subchronic toxicity of *Citrus aurantium* L. (Rutaceae) extract and p-synephrine in mice. *Regulatory toxicology and pharmacology* ,54 ,pp114–117.
- **Assis, D.N., Navarro, V.J.** (2009). Human drug hepatotoxicity: a contemporary clinical perspective. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 5(5), 73p.
- **Atul, B.M., Hoffbrand, A.V.** (2004). *Hématologie*. Paris : De Boeck, p 14.

- **Badiagra.M** .(2011). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse de doctorat. Université de Bamako.8p.
- **Bonnier, G., Douin, R.** (1990). *La grande flore en couleurs*. Paris : Edition Belin, pp 23-24.
- **Bory de Saint-Vincent, M.** (1827). *Dictionnaire classique d'histoire naturelle*. Paris: Rey et Gravier, 565p.
- **Bouguezza, Y., Bribi, N., Tacharfiout, M., Amara, S ., and khttal, B.** (2012). acute and sub-chronic toxicity study of *Nigella damascena* methanolic seed extract in mice. *International journal of pharma and bio science* ,4(2), pp 413-419.
- **Boulard,B.** (2001). *Plantes médicinales du monde*. Paris : ESTEM , pp 190-193.
- **Bruneton, J.** (1999). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Paris : Technique et Documentation Lavoisier, pp 784-873.
- **Bruneton, J.** (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Paris : *Technique et Documentation Lavoisier*. 558p.
- **Cartier,O., Roux,D.** (2007). *Botanique pharmacognosie phytothérapie*. Paris: Wolters Kluwer, 89p.
- **Daly, A.** (2010). Drug-induced liver injury: past, present and future. *Pharmacogenomics*, 11, pp 607-611.
- **Dausset, J.** (1976). Le complexe HLA, les associations entre HLA et maladies. *Presse Méd*, 5, pp 1477-1482.
- **David, J.M., Arditti-Djiane, J.** (1999). *Intoxications par les plantes* dans : Danel V, Barriot P, Eds. *Intoxications aiguës en reanimation*. Paris: Arnette, pp 573-574.
- **Delaney, K.A.** (2006). Hepatic principles. In: *Goldfrank's toxicologic emergencies*. New York: McGraw-Hill, pp 216-30.

- **Dopke, W., Fritsch, G.** (1970). The alkaloid of *Nigella damascena*. *Pharmazi*, 25(1), pp 69-70.
- **Edelstein, C.L., Faubel, S.** (2011). *Biomarkers of kidney diseases: biomarkers in acute kidney injury*. London: Elsevier, p 177.
- **Elaine, N.M.** (2008). *Biologie humaine*. Paris : Edition du renouveau pédagogique, pp 425p.
- **Ewins, A.J.** (1912). The construction and synthesis of damascenine, the alkaloid of *Nigella damascena*. *Journal of Chemical Society, Transactions*, 101 (0), pp 544-552.
- **Fattorusso, E., Taglialatela-Scafati, O.** (2007). Modern alkaloids. Napoli: Wiley-VCH, pp 1-689.
- **Fico, G., Braca, A., Tomè, F., and Morelli, I.** (2001). A new phenolic compound from *Nigella damascena* seeds. *Fitoterapia*, 72(0), pp 462-463.
- **Fico, G., Panizzi, L., Flamini, G., Braca, A., Morelli, I., Tomè, F., and Cioni, P.L.** (2004). Biological screening of *Nigella damascena* for antimicrobial and molluscicidal activities. *Phytother*, 18(0), pp 468–470.
- **Fico, G., Panizzi, L., Flamini, G., Braca, A., Morelli, I., Tomè, F., and Cioni, P.L.** (2004). Biological screening of *Nigella damascena* for antimicrobial and molluscicidal activities. *Phytother*, 18(6), pp 468–470.
- **Fromenty, B.** (2010). *Mécanismes de l'hépatotoxicité médicamenteuse*. Paris: Elsevier-Masson, pp 2-7.
- **Gaw, A., Murphy, M.J., Cowan, R.A., O'Reilly, D.J., Stewart, M.J., and Shepherd, J.** (2008). *Clinical Biochemistry: Investigation of renal function*. Churchill-Livingstone-Elsevier, pp 28-30.
- **Gildemeister, E., Schimmel, M.** (2011). The Volatile Oils. *Read Books Design*. 2(0), 750p.

- **Guignard, J.L.** (2001). *Botanique systématique moléculaire*. Paris : Masson, p 304.
- **Hughes, J., Jefferson, A.** (2009). *Le bilan biochimique facile*. Elsevier-Masson, pp 45-60.
- **Jaeschke, H., Gores, G.J., Cederbaum, A.I., Hinson, J.A., Pessayre, D., and Lemasters, J.J.** (2002). Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol.Sci*, 65(2), pp 166-76.
- **Kaplowitz, N.** (2011). *Gastroenterology Liver Division*. Los Angeles: Keck School of Medicine, University of Southern California, p 38.
- **Keeffe, E.B., Friedman, L.M.** (2004). *Handbook of liver diseases*. Edinburgh: Churchill Livingstone, London, pp 104-123.
- **Knowles, S., Uetrecht, J., and Shear, N.** (2000). Idiosyncratic drug reactions: the reactive metabolite syndrome. *Lancet*, 91p.
- **Larrey, D.** (2007). *Complementary and alternative medicine hepatotoxicity*. Barcelona: Parmanyer Publications, 125p.
- **Lauber, K., Wagner, G., and Gyax, A.** (2012). *Flora Helvetica*. Berne, Stuttgart, Vienne : Haupt Verlag, p 122.
- **Lauwerys, R.R.** (2003). *Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles*. Paris : Masson, 961p.
- **Loyral, G., Vierling, E.** (2007). *Microbiologie et toxicologie des aliments*. Aquitaine: doin, 245p.
- **Manske, R.H.F.** (1973). *The alkaloids*. London: Elsevier, 544p.
- **Marshall, W.J., Bangert, S.K.** (2004). *Clinical chemistry*, Edinburgh: Mosby, 810p.
- **Mohan, L.V., Mothes, K., Engelbrecht, L., and Schroter, H.B.** (1965). Biosynthesis of damascenine in *Nigella damascena L.* *Nature*, 12, pp 1421-1428.

- **Moretti, A., D'Antuono, L.F., and Elementi, S.** (2004). Essential oils of *Nigella sativa* L. and *Nigella damascena* L. Seed. *Journal of Essential Oil Research*. 16, pp182-183.
- **Mumoli, N., Cei, M., and Cosimi, A.** (2006). Drug related hepatotoxicity. *N.Engl.J.Med*, 354(20), pp 2191-2193.
- **Munsche, D., Mothes, K.** (1965). Fütterungsversuche zur biosynthese des damascenins in *Nigella damascena* L. *Phytochemistry*, 4, pp 705-712.
- **Navarro, V.J., Senior, J.R.** (2006). Drug-related hepatotoxicity. *N Engl J Med*. 354(7), pp 731-739.
- **Nguyen, H.N., Bourouina, R.** (2008). *Manuel d'anatomie et de physiologie*. France: LAMARRE, pp 55p.
- **Nickavar, B., Amin, G., and Parhami, S.** (2003). Volatile constituents of the fruit and leaf oils of *Thuja orientalis* L. grown in Iran. *Z Naturforsch*. 58 (3-4), pp171-172.
- **Nyblom, H., Berggren, U., Balldin, J and Olsson, R.** (2002). High AST/ALT ratio may indicate advanced alcoholic liver disease rather than heavy drinking Alcohol. *Oxford journals*. 39(4), pp 336–339.
- **Poortmans,J.R.,Boisseau,N.** (2003). *Biochimie des activités physiques*. Bruxelles : De boeck : pp 165-168.
- **Prchal, J.T., Gregg, X.T.** (2005). Red cell enzymes. *ASH Education Program Book*, (1), p19-23.
- **Raven, H. P., Evert, R.F., and Eichhorn, S.E.** (2000). *Biologie végétale*. Paris: de boec, 32p.
- **Robin, M.A., Le Roy, M., Descatoire, V., and Pessayre, D.** (1997). Plasma membrane cytochromes 450 as neoantigens and autoimmune targets in drug-induced hepatitis. *J Hepatol*, 26(1), pp 23-30.

- **Sabetghadam ,A ., Ramanathan,S ., Sasidharan,S ., Mansor S.M . (2013).** Subchronic exposure to mitragynine, the principal alkaloid of *Mitragyna speciosa*, in rats, *Journal of ethnopharmacology*. 146(3), pp 815–823.
- **Schmauder,H. P.,Doebel,P. (1991).** *In vitro* culture, regeneration, and the formation of secondary metabolites. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* , 15, 311-336.
- **Sherwood, L. (2006).** *Physiologie humaine*. Bruxelles: de boeck, 405p.
- **Stellman, J.M. (2000).** *Encyclopédie de sécurité et de santé au travail*. Genève, pp 49-55p.
- **Stengel, B., Simon, P. (1997).** *Néphrotoxicité d'origine iatrogène, professionnelle ou environnementale: Insuffisance rénale chronique*. inserm, p 141-146.
- **Stevens, A., Lowe, J. (1997).** *Histologie humaine*. Paris : De Boeck, pp 99-105.
- **Stickel, F., Patsenker, E., and Schuppan, D. (2005).** Herbal hepatotoxicity. *J Hepatol*. 43, pp 901-910.
- **Tacherfiout, M. (2008).** Caractérisation physico-chimique et profils des protéines de réserve des graines de *Nigelle sativa* et *Nigella damascena*. Mémoire de magister. Université de Bejaia.
- **Tanis, H., Aygan, A., and Digrak, M. (2009).** Antimicrobial Activity of Four *Nigella* Species Grown in Southern Turkey. *International Journal of Agriculture and biology*. 11(6): pp 771–774.
- **Teuscher, E., Anton, R., and Lobstein, A. (2005).** *Plantes aromatiques*. Paris : Tec and Doc Lavoisier, 522p.
- **Toma, C., Hanganu, D., Olah, N.K ., and Popescu, H. (2003).** The determination of rutoside From *Nigella damascena L.* (Ranunculaceae) by TLC-densitometry. *Ovidius University Annals of Medical Science-Pharmacy*, 1(2), pp 57-60.

- **Tramer, F., Da Rose, T., and Passamonti, S.** (2013). Screening of fullerene toxicity by hemolysis assay . In *Nanotoxicity*. pp 203-213.
- **Valensi, F.** (2005). Morphologie des cellules sanguines normales. *EMC-Hématologie*, 2(1), pp 1-13.
- **Van Pelt, F., Straub, P., and Manns, M.P.** (1995). *Molecular basis of drug-induced immunological liver injury*. *Semin Liver Dis* .15, pp 283-300.
- **Vaubourdolle, M.** (2007). *Toxicologie, Sciences mathématiques, Physiques et Chimiques*. Paris: Wolters Kluwer SA, pp136-139.
- **Wajcman, H.** (2005). Hémoglobines : structure et fonction. Paris : *EMC-Hématologie*, 2(3), pp 145-157.
- **William, G.H.** (2003). *Physiologie végétale*. Bruxelles: De Boeck Université, 268p.
- **Yoshimitsu, H., Nishida, M., Okawa, M., and Nohara, T.** (2007). *Chemical and pharmaceutical bulletin*. (55)3, pp 488-491.
- **Zurlo, J.** (2000). *Encyclopédie de sécurité et de santé au travail : Tests de toxicité in vitro*. Genève, pp 33-50.

DÉDICACE

À mes chers parents

Vous avez comblés ma vie de tendresse d'affection et de compréhension, rien au monde ne pourrait compenser les efforts et les sacrifices que vous avez consentis pour mon bien être. Aucune dédicace, ne saurait exprimer à sa juste valeur le profond amour que je vous porte.

À mes frères

Souvenez-vous, c'était hier, nos jeux, nos bêtises, et nous voilà des années plus tard toujours aussi proches, moins gamins mais éternellement liés.

À toi Anis, tu es et tu resteras mon petit frère adorable et ambitieux. Je te souhaite un avenir plein d'amour et de réussite. Tous les mots que je pourrais utiliser seraient insuffisants pour vous témoigner l'amour que je vous porte.

À toi Sarah

Bien plus qu'une cousine, tu es ma sœur et ma meilleure amie, tu as toujours été là pour moi, on a tous partagé : Les fou rires (loune garoune), les moments difficiles (tes parties mais pour moi tu seras toujours là). Je te dédicace ce travail en témoignage de ma gratitude, mon estime et mon profond amour.

À mes chères amies

Ces dédicaces ne seraient pas complètes sans vous remercier toutes du fond du cœur,

À toi Yasmine ; Cinq ans sont passés et je n'imagine plus être loin de toi, aucun mot ne peut qualifier la beauté de ton esprit. Merci à toi et à ta famille pour tous ce que vous avez fait pour moi.

À toi Meriem ; Exceptionnelle que tu es, par ta modestie, ton grand cœur et ta personnalité, tu m'as beaucoup appris. Je te remercie infiniment toi et ta famille pour m'avoir ouvert vos bras.

À toi chahinez ; Je t'admire et je te respecte, pour ton courage, ton acharnement et ton éternelle joie de vivre. Merci d'avoir été là quand j'avais le plus besoin.

À toi Souad ; Ce mémoire à été le lien qui nous a rapproché durant plus de 7mois, j'espère avoir été à la hauteur de tes attentes. Je reste en admiration devant ta gentillesse et ta grandeur d'âme, puisses-tu un jour atteindre tous tes objectifs et tes rêves.

En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble, je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

Lydia

Dédicaces

Je dédie ce travail

A ma très chère mère SAMIA,

Affable, honorable, aimable, tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

A mon très cher père Noureddine,

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai pour toi.

A ma grande sœur OUMSAAD

A mon petit frère YOUBA

A MON ONCLE SOULEYMENE,

Qui était d'une grande aide tout le long de notre travail.

A tous les membres de ma famille

A mon ami HAMZA qui m'a beaucoup aidé et de sa précieuse présence dans mes moments difficiles.

Et enfin à mes fidèles amies RAHMA, LYDIA, YASMINE, CHAHINEZ, MERIEM & LYDIA.

SOUAD

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

*Université ABDERRAHMANE MIRA-Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique*

MÉMOIRE DE MASTER

Filière : BIOLOGIE

Option : *PHARMACOLOGIE MOLÉCULAIRE*

Thème :

**Profil toxicologique *in vivo* et *in vitro* des alcaloïdes de la
graine de *Nigella damascena***

Présenté par :

M^{lle} BOUDRIOUA Souad et M^{lle} TIR Lydia

Promoteur : M^r BOUGUEZZA Y MAA UAMB

Membres de jury :

Présidente : M^{elle} KHETTAL B MCA UAMB

Examineur : M^r BRIBI N MAA UAMB

Examinatrice : M^{elle} LOUNIS H MAA UAMB

Année : 2012/2013

Remerciements

La première personne que nous tenons à remercier est notre promoteur M^r BOUGUEZZA, pour son aide et son encouragement.

On remercie également les membres de jury Dr KHETTAL, M^{lle} LOUNIS, et M^r BRIBI, qui ont acceptés d'examiner ce travail.

Un grand merci à monsieur D^r CHADER et D^r AMMI, qui nous ont accueillis dans l'enceinte de l'annexe de toxico-pharmacologie du Laboratoire national de contrôle des produits pharmaceutiques.

Nos remerciement et notre gratitude vont à toute l'équipe de résidents en pharmacie, pour leur aide précieuse, et grâce aux quels on a puent travailler dans un cadre particulièrement agréable.

Un grand merci au staff du laboratoire d'anatomie pathologique du CHU de Sétif pour leur aide et leur soutien éternel.

Nos remerciements s'étendent également aux techniciennes (Saïda et Habiba) du laboratoire pédagogique d'enzymologie qui ont toujours été présentes pour nous guider.

Enfin, on remercie tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Lydia et Souad

Sommaire

Remerciements	
Listes des figures.....	i
Listedes tableaux.....	iii
Liste des abreviation.....	vi
Introduction.....	1

*****Partie théorique*****

Chapitre I : Généralité sur *Nigella damascena*

I.1.Description botanique.....	2
I.2.Classification de <i>Nigella damascena</i>	3
I.3.Généralités sur les alcaloïdes.....	3
I.3.1.Origines des alcaloïdes.....	3
I.3.1.1.Origine végétales.....	3
I.3.1.2.Origine animale.....	4
I.3.1.3.Origines bactériennes.....	4
I.3.1.4.Origine fongique.....	4
I.3.2.Classification des alcaloïdes.....	5
I.3.3.Propriété physico-chimique des alcaloïdes.....	6
I.3.4.Caractérisation des alcaloïdes.....	7
I.3.5.Propriété pharmacologique des alcaloïdes.....	7

I.4. Les alcaloïdes de <i>Nigella damascena</i>	8
I.5. Propriétés thérapeutiques de <i>Nigella damascena</i>	9
I.5.1. Propriété analgésique.....	9
I.5.2. Propriété antibactérienne et antiparasitaire.....	9
I.5.3. Propriété emménagogue.....	9
I.5.4. Propriété anti-oxydante.....	9

Chapitre II : Hépatotoxicité, Néphrotoxicité et Cytotoxicité

II.1. Généralité sur la toxicité.....	10
II.1.1. Types de toxicité.....	10
II.1.1.1. Toxicité aiguë.....	10
II.1.1.2. Toxicité subaiguë ou sub-chronique.....	10
II.1.1.3. Toxicité chronique.....	11
II.2. Étude de toxicité <i>in vivo</i>	11
II.2.1. Hépatotoxicité.....	11
II.2.1.1. Généralité sur le foie.....	11
II.2.1.2. Hépatotoxicité.....	11
II.2.1.3. Mécanismes de l'hépatotoxicité.....	12
II.2.1.4. Hépatotoxicité directe.....	12
II.2.1.5. Hépatotoxicité indirecte (immunologique).....	13
II.2.1.6. Évaluation de l'hépatotoxicité.....	13
II.2.2. Néphrotoxicité.....	14
II.2.2.1. Généralité sur les reins.....	14
II.2.2.2. Néphrotoxicité.....	15

II.2.2.3. Vulnérabilité des reins aux toxiques.....	15
II.2.2.4. Néphrotoxicité liée au toxique.....	15
II.2.2.5. Évaluation de la néphrotoxicité.....	16
II.2.2.6. Marqueurs de l'équilibre homéostatique.....	16
II.3. Étude de toxicité <i>in vitro</i>	17
II.3.1. Cytotoxicité.....	17
II.3.1.1. Le système hématologique.....	17
II.3.1.2. Mécanisme de la Cytotoxicité.....	19
II.3.1.2.1. Cytotoxicité directe.....	19
II.3.1.2.2. Cytotoxicité indirecte (Hémolyse oxydative).....	19

****Partie pratique****

Chapitre I : Matériels et méthode

I. Matériels et méthode.....	20
I.1. Matériel végétal.....	20
I.1.1. Obtention du matériel végétal.....	20
I.1.2. Extraction des alcaloïdes totaux.....	20
I.2. Matériel animal.....	21
I.2.1. Animaux.....	21
I.3. Evaluation de la toxicité des alcaloïdes totaux <i>in vivo</i>	22
I.3.1. Choix des doses et voie d'administration.....	22
I.3.2. Suivi quotidien et observation comportementale.....	22
I.3.3. Études biochimique.....	23

I.3.4.Étude histopathologique.....	23
I.4.Évaluation de la cytotoxicité des alcaloïdes <i>in vitro</i>	24
I.4.1.Etude hémolytique.....	24
I.4.1.1.Principe.....	24
I.4.1.2.Isolement des érythrocytes.....	25
I.4.2.Préparation des solutions.....	25
I.4.3.Etude de l'hémolyse.....	25
I.4.4.Observation microscopique.....	26
I.4.5.Analyse statistique.....	26

Chapitre II : Résultats et discussion

II.1. Matériel végétal	27
II.1.1. Rendement d'extraction.....	27
II.2. Toxicité sub-chronique	27
II.2.1. Paramètres physiques.....	27
II.2.1.1. Evolution du poids corporel	27
II.2.1.2. Evolution de la prise alimentaire.....	28
II.2.1.3. Evolution de la température corporelle centrale (température rectale).....	28
II.2.2. Paramètres biochimiques.....	29
II.2.2.1. Paramètres hépatiques.....	29
II.2.2.2. Paramètres néphrétiques.....	30
II.2.2.3. Paramètres d'équilibre homéostatique.....	31
II.2.3. Examen histopathologique.....	32
II.2.3.1. Poids final des organes internes (Foie et reins).....	32

II.2.3.2. Histologie hépatique.....	32
II.2.3.3. Histologie rénale.....	34
II.3. Étude <i>in vitro</i> de la cytotoxicité érythrocytaire.....	35
II.3.1. Dosage de l'hémoglobine et pourcentage d'hémolyse.....	35
II.3. 2. Observation microscopique.....	36
II.4. Discussion générale	37
Conclusion.....	40
Références bibliographique.....	41
Annexe.....	I

Liste des figures

Figure 1: <i>Nigella damascena</i> à gauche, aspect intérieure de la gousse à graines de <i>Nigella damascena</i> à droite.....	2
Figure 2: Structure chimique de la damascenine (1) et damascinine (2).....	8
Figure 3: Réaction de biosynthèse de la damascenine.....	8
Figure 4: Conditions d'installation des souris au niveau du laboratoire.....	21
Figure 5: Administration de l'extrait "alcaloïdes totaux" par voie intra-péritonéale.....	22
Figure 6: A droite : une souris anesthésiée; A gauche : Prélèvement de la kétamine.....	23
Figure 7: Dissection, prélèvement et fixation.....	24
Figure 8 : Variation du poids corporel des différents groupes de souris	27
Figure 9 : Poids des organes (Foie et reins) des différents groupes de souris.....	28
Figure 10 : Variation de la température corporelle centrale prise par voie rectale des différents groupes de souris.....	29
Figure 11 : Dosage des transaminases ALT et AST et de la bilirubine des différents groupes de souris	29
Figure 12 : Dosage de la créatinine et de l'urée des différents groupe de souris	30
Figure 13 : Dosage du glucose des différents groupes des souris	31
Figure 14 : Poids des organes internes (Foie et reins) des différents groupes des souris.....	32
Figure 15 : Micrographie du parenchyme hépatique des souris des deux sexes des groupes traités.....	33
Figure 16 : Micrographie du parenchyme rénale des souris des deux sexes	34

Figure 17 : Pourcentage d'hémolyse érythrocytaire en présence et en absence des différentes concentrations d'alcaloïdes et du Triton X-10036

Figure 18 : Images par Microscopie optique de la morphologie érythrocytaire en absence et en présence des alcaloïdes totaux de la graine de *Nigella damascena*.....36

Liste des tableaux

Tableau I : Classification de <i>Nigella damascena</i>	3
Tableau II: Exemple d'alcaloïdes d'origine animale et fongique.....	4
Tableau III: Principaux hétérocycle des alcaloïdes.....	5
Tableau IV: Quelques activités pharmacologiques des alcaloïdes.....	7

Liste des abréviations

- **mM** : milli molaire
- **UV** : ultras violet
- **cyt p-450** : cytochrome p-450
- **DMSO** : Diméthyle sulfoxyde.
- **Ip** : intrapéritonéale
- **LNCPP** : laboratoire national de contrôle de produits pharmaceutiques.
- **MT+** : mâle témoin positif.
- **MT** : mâle témoin négatif.
- **FT+** : femelle témoin positif.
- **FT-** : femelle témoin négatif.
- **F** : femelle.
- **M** : mâle.
- **Alc T** :alcaloïdes totaux.
- **ALT** : alanine amino-transférase.
- **AST** :aspartate amino-transférase.
- **Rpm** :Rotation par minute.
- **GX40** : Grossissement foie 40.

Introduction

Employées depuis l'antiquité, les plantes médicinales sont reconnues pour leurs effets thérapeutiques. Leurs propriétés réelles ont, à toute époque, été exagérées, ou ignorées, selon les connaissances en vigueur. Les progrès des sciences biologiques, ont permis de mettre en évidence les propriétés des plantes, dites médicinales, quelle soit thérapeutiques ou toxiques (**Boullard, 2001**).

Nigella damascena est une plante annuelle herbacée, de la famille des Renonculacée rencontrée dans les régions du pourtour du bassin méditerranéen (**Schmauder et Doebel, 1991**). Elle est douée de plusieurs propriétés thérapeutiques ; tels que les effets : oestrogénique, emménagogue, antipyrétique, analgésique, anti-inflammatoire, anti-oxydante, antiparasitaire, antibactérienne (**Fico et al, 2004**).

Néanmoins, les données toxicologiques concernant *Nigella damascena*, reste à ce jour peu connues et le peu d'informations disponibles provient d'études non référenciées. Seuls les travaux de **Bouhezza et al (2013)** ont fait l'objet de l'étude de la toxicité aigüe et subchronique de l'extrait méthanolique de la graine de cette plante. Quand à la toxicité des alcaloïdes totaux de *Nigella damascena*, aucune étude de ce genre n'a été faite à ce jour.

Les études toxicologiques, tels que les essais précliniques et cytotoxiques, sont autant de méthodes qui nous permettent de déterminer la toxicité potentielle ou l'innocuité d'une plante, et permettent de fournir des informations sur la potentielle dangerosité de ces remèdes.

Notre étude porte sur l'évaluation de la toxicité sub-chronique des alcaloïdes totaux de la graine de *Nigella damascena* sur des souris *Swiss albinos* mâles et femelles. Pour cela une évaluation de certains paramètres biochimiques de la fonction hépatique et rénale ainsi qu'une étude histopathologique ont été réalisés pour permettre de confirmer ou d'affirmer le potentiel effet toxicologique de nos alcaloïdes. Un deuxième aspect a été réalisé pour évaluer *in vitro* la cytotoxicité de ces alcaloïdes en prenant comme model cellulaire, des érythrocytes humains.

I.1.Description botanique

Les nigelles sont des plantes dicotylédones, de la famille des renonculacées (Agradi et al, 2001), du genre *nigella*, autre fois, appelées; *Melanthium*. Elles sont réparties en vingt espèces dont *Nigella sativa*, *Nigella arvensis*, *Nigella hispanica*, *Nigella damascena*, *Nigella gallica* et *Nigella orientalis*, qui poussent au niveau des régions méditerranéennes. (Nickavar et al, 2003)

Nigella Damascena est une plante considérée comme ornementale, cultivée dans les jardins et fleurit dans la période allant de mars jusqu'à juillet. (Andreas et Oeggli, 2005)

Communément, appelée cheveux d'anges ou pattes d'araignée, est une plante herbacée annuelle, présente une hauteur de 50cm, avec des feuilles allongées à lanières fines et enchevêtrées. Les fleurs sont de couleur blanche ou bleu pâle (Toma et al, 2003). Elles sont bordées d'une collerette de cinq feuilles longues et minces avec des fruits de forme ovale et globuleuse qui renferment les graines de *Nigella damascena* (d'une forme ovoïde et aplanie) (Figure 1). (Tacherfiout, 2008)

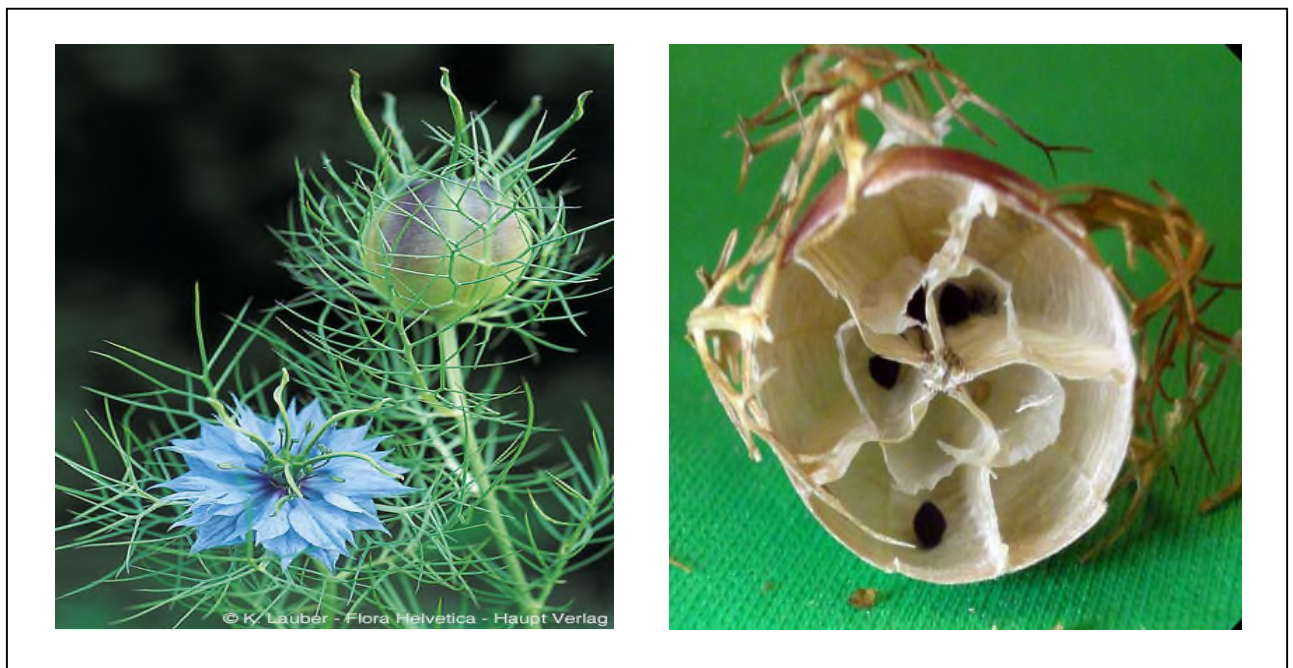


Figure 1: *Nigella damascena* à gauche, aspect intérieure de la gousse à graines de *Nigella damascena* à droite. (Lauber, 2012)

I.2. Classification de *Nigella damascena*

Selon la classification Linnéenne, *Nigella damascena* est classée comme suite;

Tableau I : Classification de *Nigella damascena*. (Guignard, 2001)

Rang taxonomique	Nomenclature
Règne	Végétale
Sous règne	Cormophyte
Supra embranchement	Rhizophytes
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Dialypétales
Série	Thalamiflores
Ordre	Ranales
Famille	Renonculaceae
Genre	<i>Nigella</i>
Espèce	<i>Nigella damascena</i>

I.3. Généralités sur les alcaloïdes

Les alcaloïdes représentent un ensemble de molécules d'origine naturelle, renfermant du carbone, de l'hydrogène et de l'azote qui leur confère leur caractère alcalin. La plupart possèdent une activité biologique marquée qui a suscité un intérêt thérapeutique. (Bruneton, 1999; Cartier et Roux, 2007)

I.3.1. Origines des alcaloïdes

On estime que le nombre d'alcaloïdes découverts à ce jour est de 10 000. Ils font partie de quatre origines différentes ; végétales, animales, fongiques et bactériennes.

I.3.1.1. Origine végétales

Les alcaloïdes se trouvent essentiellement dans les plantes supérieures telles que les angiospermes, aussi bien dans les monocotylédones (Amaryllidacée, Liliacée) qu'aux niveaux des dicotylédones (Annonacée, Apocynacée, Fumariacée, Renonculaceae, Papavéracée, etc.). (Bruneton, 2009)

1.3.1.2. Origine animale

Les alcaloïdes retrouvées chez les animaux sont, pour la plus part, des métabolites produits à partir des alcaloïdes contenus dans l'alimentation de type végétale de l'animal en question. On prend pour exemple la castoramine, un alcaloïde issue du castor, qui est également retrouvé chez les nénuphars. (**Tableau II**)

D'autres animaux possèdent des alcaloïdes tels que les batraciens, salamandres et les insectes (fourmis, cochenilles, les mille-pattes) (**Tableau II**) et certains organismes marins (éponges de mère et les unicellulaires). (**Manske, 1973**)

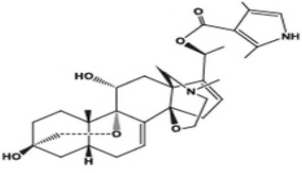
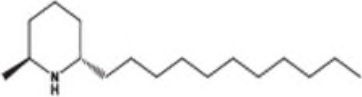
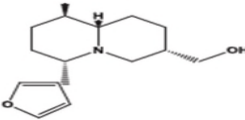
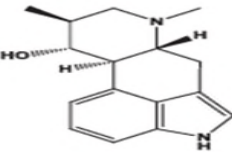
1.3.1.3. Origines bactériennes

Des substances de nature alcaloïdique se retrouvent également chez quelques bactéries *Pseudomonas aeruginosa*. (**William, 2003**)

1.3.1.4. Origine fongique

Les champignons, peu utilisés pour les études et la recherche d'alcaloïdes, ont donné toutefois des résultats. C'est le cas du Chanoclavine; alcaloïde extrait de l'ergot de seigle (*Claviceps purpurea*). (**Tableau II**)

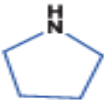
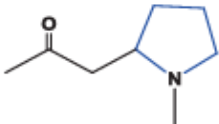

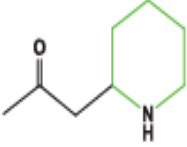
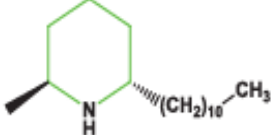
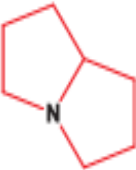
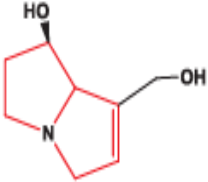
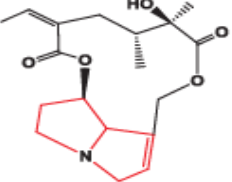
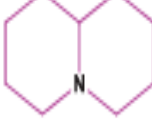
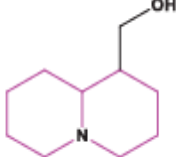
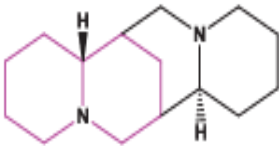
Tableau II: Exemple d'alcaloïdes d'origine animale et fongique. (**Badiaga, 2011**)


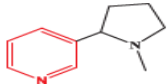
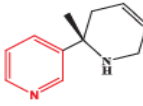
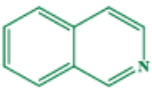
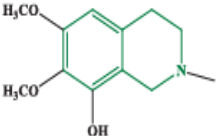
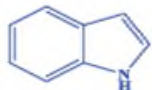
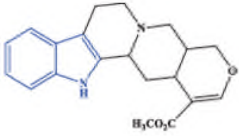
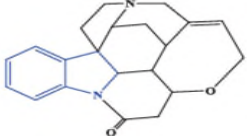
Dénomination	Structure	Origine
Batrachotoxine		Type d'alcaloïde extrait à partir des peaux de certains batraciens (<i>Dendrobates</i>).
Solenopsine		Type d'alcaloïde isolé de la fourmi (<i>Solenopes invicta</i>).
Castoramine		Type d'alcaloïde isolé du castor.
Chanoclavine		Alcaloïde indolique isolé d'un champignon de type <i>Claviceps purpurea</i> .

I.3.2. Classification des alcaloïdes

La classification des alcaloïdes est assez complexe, vue leur nombre important et leur hétérogénéité. La classification la plus utilisée est basée essentiellement sur la nature du cycle. Les alcaloïdes possèdent un squelette hétérocyclique azoté, à l'exception de certaines substances où l'azote est extra-cyclique (colchicine, éphédrine). (Bruneton, 1999; Badiaga, 2011)

Tableau III: Principaux hétérocycle des alcaloïdes. (Badiaga, 2011)

Un seul cycle contenant l'atome d'azote		Exemples		
	Cycle pyrrolidinique			
		Exemples		
	Cycle pipéridinique		Isopelletiérine	Solenopsine A
Deux cycles contenant l'atome d'azote		Exemples		
	Cycle pyrrolizidinique		Retronecine	sénecionine
		Exemples		
Cycle quinolizidinique	Lupinine		Sparteine	

Hétérocycles aromatiques		Exemples		
	Cycle pyridinique		Nicotine	Anatabine
			Cycle isoquinoleique	
	Cycle isoquinoleique		Pellotine	Papaverine
				
	Cycle indolique		Ajmaline	Strychnine

I.3.3. Propriété physico-chimique des alcaloïdes

La masse moléculaire des alcaloïdes varie de 100 à 900 MM. La plupart des alcaloïdes non oxygénés sont liquides et volatils, alors que les alcaloïdes oxygénés sont plutôt solides, cristallisables. Sous forme basique, ils sont peu ou pas solubles dans l'eau, mais solubles dans les alcools de titre élevé, ainsi que dans les solvants organiques apolaires (ou peu polaires).

La basicité des alcaloïdes repose sur la disponibilité du doublet libre de l'azote. Les groupements électro-donneurs adjacents à l'azote augmentent la basicité, et le groupe électro-attracteurs la diminuent. **(Cartier and Roux, 2007)**

La couleur des alcaloïdes résulte du spectre d'absorption de la lumière, ils sont souvent incolores en raison de leurs absorption dans le spectre proche de l'U.V, mais dans de rare cas cette absorption déborde sur le spectre visible attribuant une couleur aux alcaloïdes, comme La berbérine et l'ellipticine qui sont de couleur jaune à orangé et la sanguinarine qui est rouge. **(Manske, 1973)**

I.3.4. Caractérisation des alcaloïdes

De nombreuses réactions sont possibles avec les alcaloïdes. Elles permettent la caractérisation des composés. Ces réactions sont le plus souvent des réactions de précipitation, ou de coloration, réalisées grâce à des réactifs. Les réactions de précipitation se font par la combinaison de l'alcaloïde avec des métaux ou métalloïdes tels que l'iode, le bismuth, ou le mercure. (Abayomi, 2010)

La réaction avec le tétraiodomercurate de potassium (réactif de Mayer) donne un précipité blanc-jaunâtre. La réaction avec le tétraiodobismuthate de potassium (réactif de Dragendorff) donne un précipité orange à rouge.

Cette méthode de détection présente des limites, car elle n'est pas totalement spécifique aux alcaloïdes. Certaines substances telles que des protéines, coumarines, hydroxyflavones, et autres composés peuvent donner de faux résultats positifs. (Abayomi, 2010)

I.3.5. Propriété pharmacologique des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont particulièrement intéressants pour leurs activités pharmacologiques, en effet ils constituent le principe actif de plusieurs médicaments. (Bruneton, 1999)

Tableau IV: Quelques activités pharmacologiques des alcaloïdes. (Fattorusso et Tagliatalata-Scafati, 2007)

Alcaloïdes	Plantes	Effet biologiques
Vinblastine	<i>Catharansus roseus</i>	Anticancéreux
Quinidine	<i>Cinchona pubescens</i>	Antiarythmétique
Berbérine	<i>Coptis japonica</i>	Antifongique-Antibactérien
Sanguinarine	<i>Sanguinaria canadensis</i>	Antiseptique
Morphine	<i>Papaver somniferum</i>	Analgésique
Caféine	<i>Coffea arabica</i>	Stimulant du SNC
Boldine	<i>Peumus boldus</i>	Cholérétique et Cholagogue

I.4. Les alcaloïdes de *Nigella damascena*

En 1830, Schneider isole pour la première fois la damascenine, l'alcaloïde majoritaire de la graine de *Nigella damascena* et lui attribue la composition chimique $C_{10}H_{15}O_3N$. Ewins reprit les travaux de Schneider et définie la formule constitutionnelle de la damascenine par sa synthèse, démontrant ainsi sa structure $C_9H_{11}O_3N$ et sa formule détaillée 2-méthylamino 3-methoxy benzoic acid methyl ester (**Figure 2**). (**Ewins, 1912**)

En 1970, Deopke et Fitsch, ont démontrés la présence d'un deuxième alcaloïde dans les graines de *Nigella damascena*, la damascinine de formule chimique 2-méthylamino-3-hydroxy benzoic acid methyl ester (**Figure 2**), qui se trouve à de faible taux dans la graine. (**Dopke et Fritsch, 1970; Manske, 1973**)

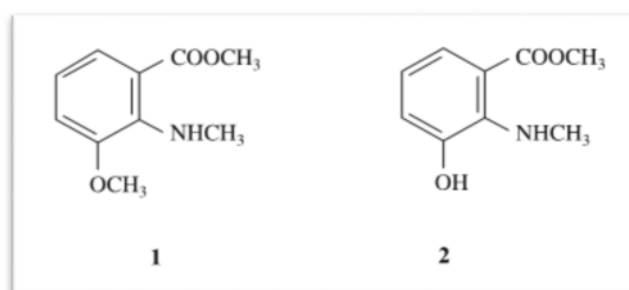


Figure 2: Structure chimique de la damascenine (1) et damascinine (2). (**Fico et al, 2004**)

La damascenine est l'alcaloïde principal des graines de *Nigella damascena*, il représente 0.1 à 0.7 % du poids de la graine, elle atteint sa valeur maximale lorsque les graines sont à maturité. A un stade avancé de développement les valeurs en damascenine sont de 0,15% dans les graines, 0,013% dans les feuilles, 0,0001 % dans les tiges et de 0,0002 % au niveau des racines. (**Mohan et al, 1965**)

L'étude des réactions de biosynthèses de la damascenine montre qu'elle est synthétisée à partir de la méthionine (**Munsche et Mothes, 1965**), bien que les réactions de biosynthèse ne soient pas bien élucidées à ce jour.

Autres composés

En plus des alcaloïdes, la graine de *Nigella damascena* contient d'autres substances telles que les flavonoïdes, sesquiterpènes, stérols, saponines, composés phénoliques, polyols et des acides gras. (Yoshimitsu et al, 2007)

I.5. Propriété thérapeutiques de *Nigella damascena*

On attribue aux graines de *Nigella damascena* plusieurs propriétés thérapeutiques ;

I.5.1. Propriété analgésique

L'activité analgésique des graines de *Nigella damascena* provient de l'huile fixe, qui contient un principe actif opioïde responsable de l'effet analgésique. (Teuscher et al, 2005)

I.5.2. Propriété antibactérienne et antiparasitaire

L'étude de Tanis et al en 2009 a déterminé que les extraits des graines (chloroformique, méthanolique et acétonique) de *Nigella damascena*, possèdent un effet sur les bactéries à gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), néanmoins son activité reste faible comparée à l'Ampicilline. (Tanis, 2009)

I.5.3. Propriété emménagogue

L'activité oestrogénique de *Nigella damascena* a été déterminée, en utilisant la levure YES, contenant un récepteur d'œstrogène humain et l'extrait méthanolique de *Nigella damascena*. Une forte activité oestrogénique a été observée, elle est dû à deux composés: 3,4-dihydroxy-B-phénethyl alcool et l'acide 2,4-dihydroxyphénylacétique qui sont agonistes aux œstrogènes. Elles se fixent aux récepteurs d'œstrogène et régule le cycle menstruel. (Agradi et al, 2001; Agradi et al, 2002), elle est également galactagogue, cette effet peut être dû aux huiles essentielles et aux saponines. (Brukner, 1993; Ficoet al, 2001)

I.5.4. Propriété anti-oxydante

Les graines de *Nigella damascena* possèdent un effet antioxydant grâce aux huiles fixes, qui captent les radicaux libres, mais aussi elles inhibent la peroxydation non enzymatique. (Teuscher et al, 2005)

II.1.Généralité sur la toxicité

La toxicité d'un composé chimique ou organique (xénobiotique) est une caractéristique biologique qui dépend de la structure atomique ou moléculaire de ce dernier et de son interaction avec la matière vivante, qui au contact ou après pénétration dans l'organisme provoque un dysfonctionnement à l'échelle moléculaire, cellulaire, ou organique. Cette toxicité dépend aussi de la dose du xénobiotique nécessaire pour produire un effet toxique. (Claverie et Hedde, 2008)

II.1.1.Types de toxicité

Les signes de toxicités, leurs sévérités, apparitions, progressions et réversibilités sont déterminés suite à des études toxicologiques indispensables à toute substance destinée à l'utilisation humaine.

On distingue trois formes de toxicité; la toxicité aiguë, la toxicité à court terme (subaiguë ou subchronique) et la toxicité à long terme (chronique). (Leyral et Vierling, 2007)

II.1.1.1.Toxicité aiguë

La toxicité aiguë est évaluée après administration d'une dose forte et unique, à concentration croissante sur différents groupes d'animaux homogènes.

Pour déterminer la toxicité aiguë, l'étude de la DL50 (dose létale à 50 %) est indispensable, sa mise en évidence est réalisée avec des tests qui durent de 24h à 14jours, elle dépend de la voie d'administration, de l'espèce, des quantités limites à utilisées lors des autres tests, et des organes cibles. (Leyral et Vierling, 2007)

II.1.1.2.Toxicité subaiguë ou sub-chronique

La substance testée est administrée de façons répétées, pendant une durée qui n'excède pas quatre-vingt-dix jours, elle a pour but d'établir une corrélation entre la dose administrée et les effets toxiques observés, et donc d'estimer la dose sans effet, qui servira à déterminer la dose admissible chez l'homme. (Claverie et Hedde, 2008)

II.1.1.3.Toxicité chronique

La substance est administrée de manière répétée, pendant une période qui dépasse quatre-vingt-dix jours. L'étude de la toxicité chronique permet d'une part, de déterminer un niveau de dose sans effets toxiques, et d'autre part, elle détermine leurs temps d'apparition et leurs possibles réversibilités. (Leyral et Vierling, 2007)

II.2.Étude de toxicité *in vivo*

Les essais de toxicité *in vivo*, par opposition à *in vitro*, qualifient toute étude toxicologique effectuée pour un organisme vivant. Les essais cliniques sont une forme de recherche *in vivo*. (Stellman, 2000)

II.2.1.Hépatotoxicité

II.2.1.1.Généralité sur le foie

Le foie joue un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie du milieu intérieur. Interposé entre le système digestif et la circulation sanguine systémique, il est le premier organe atteint par les substances endogènes et exogènes amenées par la veine porte.

Le foie reçoit également du sang de la circulation systémique et participe à la détoxification et l'élimination de substances ayant pénétré l'organisme par d'autres voies, comme les voies cutanées et respiratoires.

Le foie est le principal site de biotransformation et de détoxification des xénobiotique. Les voies biliaires constituent une voie d'excrétion importante pour les produits du métabolisme endogène et les substances étrangères et leurs métabolites. (Delaney, 2006)

II.2.1.2.Hépatotoxicité

L'Hépatotoxicité est définie comme le pouvoir qu'a une substance de provoquer des dommages au niveau du foie, qui peut être associés à une déficience de la fonction hépatique, mais aussi aux médicaments, produits chimiques et plantes médicinales qui sont, l'une des causes croissantes d'atteintes hépatiques, du fait de leur réputation d'innocuité. (Navarro et Senior, 2006; Stickel et al, 2005; Larrey, 2007)

L'hépatotoxicité se manifeste sous forme d'inflammation (hépatite), de nécrose hépatique ou encore de maladie veino-occlusive. Divers mécanismes peuvent provoquer des lésions allant de l'augmentation des taux enzymatiques à une dysfonction sévère de la fonction hépatique. (Assis et Navarro, 2009)

II.2.1.3.Mécanismes de l'hépatotoxicité

De nombreux travaux expérimentaux ont été réalisés avec quelques molécules (paracétamol, acide valproïque, halothane, analogues nucléosidiques antirétroviraux), afin de déterminer les mécanismes de l'hépatotoxicité, ces investigations ont permis d'avoir un schéma générale des atteintes hépatotoxiques et leurs mécanisme d'action. (Andrade et al, 2009; Daly, 2010)

L'hépatotoxicité peut résulter de l'action directe du xénobiotique, ou peut découler indirectement des interactions avec d'autre molécules, de nature intrinsèque ou extrinsèque qui peuvent modifier les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques du xénobiotique en le rendant toxique pour les cellules du foie. (Mumoli et al, 2006)

II.2.1.4.Hépatotoxicité directe

- Hépatotoxicité liée au xénobiotique

Ce type de toxicité résulte de l'action de la molécule mère directement sur les hépatocytes en provoquant la nécrose cellulaire. (Andrade et al, 2009)

- Hépatotoxicité des métabolites réactifs

La formation de métabolites réactifs par l'intermédiaire de la biotransformation de la molécule mère est l'une des premiers mécanismes d'hépatotoxicité connue. Les métabolites réactifs formés lors de la transformation de la molécule dans l'hépatocyte peuvent interagir directement sur les protéines, les lipides ou les acides nucléiques, entraînant un stress oxydant, une peroxydation des lipides et des altérations de la perméabilité des membranes mitochondriales qui, induiront la mort cellulaire, par nécrose ou apoptose. (Andrade et al, 2009; Daly, 2010)

II.2.1.5. Hépatotoxicité indirecte (immunologique)

- Activation du système immunitaire

L'atteinte hépatique d'origine immunitaire, est initiée par des molécules à bas poids moléculaire. Appelées haptènes elles sont non immunogènes, mais peuvent acquérir une immunogénécité en se liant à une macromolécule porteuse, telle qu'une protéine. La protéine altérée sera alors perçue comme étrangère par le système immunitaire. (**Knowles et al, 2000; Robin et al, 2000**)

Le complexe haptène-macromolécule déclenche l'activation des cellules T auxiliaires qui, par la production de cytokines, activant les lymphocytes T cytotoxiques. Les cellules Natural killer et les lymphocytes B (producteurs d'anticorps) entraînant une attaque auto-immune contre les constituants des cellules hépatiques normales. (**Jaeschke et al, 2004**)

II.2.1.6. Évaluation de l'hépatotoxicité

L'hépatotoxicité peut être identifié suite à un bilan hépatique. La bilirubine, l'ALT, l'AST, la LDH sont des marqueurs qui peuvent mettre en évidence des lésions hépatiques ou des altérations fonctionnelles. (**Hughes et Jefferson, 2009**)

- Alanine Amino Transférase

L'alanine aminotransférase appelé ALAT, est une enzyme produite par les hépatocytes. (**Poortmans et Boisseau, 2003**) Le taux d'ALAT contenu dans le sang augmente lorsque les hépatocytes sont endommagés ou détruits à un rythme plus élevé que la normale. Les drogues, l'alcool, les toxines, les virus et d'autres substances causent des dommages aux cellules hépatiques qui peuvent contribuer à l'élévation du taux d'ALAT.

Le niveau d'ALAT est utilisé pour évaluer le degré d'inflammation et de l'atteinte au foie. Les valeurs dites normales d'ALAT, peuvent varier d'un laboratoire à un autre, Toutefois, les taux habituellement rapportés se situent entre 0 et 40 UI/L. (**Hughes et Jefferson, 2009**)

- Aspartate aminotransférase

Aspartate aminotransférase (ASAT) également appelé sérum glutamique, est une enzyme non spécifique, elle se trouve également dans d'autres cellules telles que les cellules cardiaques, musculaires et sanguines. Son taux élevé peut être dû à une hépatite aigüe. D'autres tests biochimiques sont nécessaires pour confirmer ce diagnostic. **(Nyblom et al, 2002)**

- La Bilirubine

La bilirubine est le produit du catabolisme de l'hème, provient de la destruction des globules rouges vieillissants. La bilirubine est libérée dans le sang ou elle se lie à l'albumine, qui la transporte vers le foie. Contrairement à la bilirubine liée à l'albumine, la forme libre est neurotoxique. **(Alan et Lowe, 2006)**

La bilirubine est utilisée comme marqueur hépatique, car son taux élevé dans le corps suggère une anomalie hépatique. Généralement des ictères qui se manifestent par la pigmentation jaune de la peau et des muqueuses. La quantité totale normale de bilirubine est de 0,1 à 1,2 mg/dL. **(Hughes et Jefferson; 2009)**

II.2.2.Néphrotoxicité

II.2.2.1.Généralité sur les reins

Les reins, en nombre de deux, sont situés dans la région rétro-péritonéale, de part et d'autre de la colonne vertébrale. **(Alan et Lowe, 2006)** C'est un organe excréteur, il assure plusieurs fonctions vitales, dont l'élimination et la conservation des composants du sang. Il assure notamment l'évacuation des déchets du métabolisme, le contrôle de la pression osmotique, mais aussi de la composition électrolytique du milieu intérieur et du volume de sang. Le rein assure également le maintien de la constance du pH du milieu. C'est l'organe principal de régulation et de contrôle de la composition de l'organisme. **(Elaine, 2008; Nguyen et Bourouina, 2008)**

Durant le processus de filtration des déchets sanguins, les reins, sont la cible des substances toxiques d'origine endogène et exogène. Les cellules rénales sont donc exposées à des concentrations plus élevées en toxique que les cellules sanguines. **(Elaine, 2008)**

II.2.2.2.Néphrotoxicité

La néphrotoxicité est l'ensemble des altérations fonctionnelles ou structurelles rénales, induites par des toxiques endogène (immunologiques) ou exogène (xénobiotiques). Les manifestations des atteintes rénales toxiques sont très nombreuses, et les symptômes ne sont pas différents de ceux des maladies rénales connues. Les toxiques rénaux peuvent donner presque toutes les formes de syndrome néphrologique. **(Stengel et Simon, 1997)**

II.2.2.3.Vulnérabilité des reins aux toxiques

La vulnérabilité du rein vis-à-vis des agressions toxiques, s'explique par plusieurs facteurs liée à des paramètres anatomo-fonctionnels de cet organe. **(Sherwood, 2006)**

- Débit vasculaire et surface d'échange

Les reins reçoivent environ 1/5 du débit cardiaque et la surface d'échange endothéliale entre le sang et les tissus rénaux est très importante. Les cellules endothéliales sont en contact permanent avec les toxiques à plus forte concentration, D'où le risque élevé de toxicité

- Phénomène de réabsorption et de concentration

Une partie des xénobiotiques subissent une réabsorption tubulaire, ajouter à cela, le phénomène de concentration, qui augmente l'accumulation des substances toxiques et provoque une cytotoxicité.

II.2.2.4.Néphrotoxicité liée au toxique

L'Atteinte rénale peut découler directement de la molécule toxique, soit par une action directe, qui dépend de la nature du toxique ou de ses dérivés et leur mode d'action, ou par action indirecte dites d'hypersensibilité. **(Edelstein et faubel, 2011)**

La toxicité rénale directe, affecte les cellules en contact avec le toxique, elle est dose-dépendante et prévisible. Elle provoque la dégénérescence et la nécrose des cellules épithéliales tubulaires, et déficience des tubules rénaux, ce qui engendre une insuffisance rénale aigüe.

La toxicité rénale indirecte "hypersensibilité" survient suite au contact répété avec le toxique. Elle est indépendante de la dose et imprévisible mais nécessite une sensibilisation préalable, ce qui explique l'enclenchement du système immunitaire et de l'hypersensibilité.

La néphropathie interstitielle et le syndrome néphrétique sont les manifestations les plus courantes d'une réaction d'hypersensibilité à un toxique. **(Edelstein et faubel, 2011)**

II.2.2.5.Évaluation de la néphrotoxicité

De nombreux marqueurs rénaux ont été développés, dans le but de détecter des atteintes fonctionnelles ou structurelles rénales d'origine toxique à un stade précoce. **(Marshall et Bangert, 2004)**

- Créatinine

La créatinine est le marqueur biochimique le plus fiable de la fonction glomérulaire, elle est le produit final du catabolisme de la créatine, sa concentration plasmatique est relative à la masse musculaire et varie d'un individu à l'autre (60-120 $\mu\text{mol/l}$). Cette molécule est évaluée pour estimer le taux de filtration glomérulaire; elle est strictement éliminée par les reins, L'augmentation de la concentration de la créatinine dans le sang indique un dysfonctionnement au niveau du néphron. **(Hughes et Jefferson, 2009)**

- L'urée

L'urée est synthétisée dans le foie et résulte des réactions de désamination des acides aminés. Elle est éliminée principalement dans les urines qui sont la voie d'élimination des nitrogènes. Cette molécule est filtrée aussi par le glomérule mais elle est réabsorbée par les tubules par diffusion passive. L'intervalle de référence de l'urée est 2,5-6,6 mmol/l. Les concentrations plasmatiques indiquent généralement une atteinte de la fonction glomérulaire mais aussi elles peuvent être modifiées par une alimentation inadéquate, d'une hémorragie gastro-intestinale, etc. **(Hughes et Jefferson, 2009)**

II.2.2.6. Marqueurs de l'équilibre homéostatique

➤ Le glucose

La concentration normale en glucose à jeun est estimée entre 0.7g /l à 1.05g/l. lorsque le taux du glucose est élevé, il favorise le stockage des molécules énergétiques issues du métabolisme, tandis que la diminution du taux sanguin du glucose, stimule la libération du glucagon par les cellules alpha du pancréas. Une déficience en ces deux derniers entraîne une diminution ou augmentation du glucose sanguin. (Gaw et al, 2008)

II.3. Étude de toxicité *in vitro*

Les études *in vitro*, sont menées sur des cellules ou des tissus d'origine animale ou humaine, en dehors de l'organisme vivant. Les études *in vitro* livrent une grande quantité d'informations sur la toxicité intrinsèque d'un produit ou sur son mécanisme de toxicité cellulaire et moléculaire. De plus, elles offrent de nombreux avantages sur les études *in vivo*, car elles sont généralement moins coûteuses et peuvent être réalisées dans des conditions mieux contrôlables. (Zurlo, 2000)

II.3.1. Cytotoxicité

La Cytotoxicité est la propriété qu'a un agent chimique ou biologique d'altérer des cellules, et provoquée une apoptose. L'altération des cellules sanguines se traduit par une hémolyse cellulaire. (Dausset, 1976)

II.3.1.1. Le système hématologique

Le sang est un tissu liquide, circulant à l'intérieur d'un système vasculaire clos. Il assure le transport des cellules spécialisées mais aussi d'éléments dissous: protéines, nutriments, hormones, vitamines, minéraux, déchets, médicaments. Le sang est composé de deux parties, le plasma et les cellules. (Valensi, 2005)

- Le plasma et le sérum

La phase liquide du sang, le plasma, est composée d'eau (90 %) et de substances solubles : protéines (albumine, globulines), glucides, lipides, sels minéraux. Sorti du système vasculaire ou sous l'effet de certains stimuli, le plasma coagule: l'une de ses protéines, le fibrinogène, soluble, se transforme en une molécule insoluble; la fibrine et provoque la coagulation. **(Atul et Hoffbrand, 2004)**

- Les cellules du sang

Le sang contient des cellules anucléées; les hématies (érythrocytes), des cellules nucléées; les leucocytes (ou globules blancs), des fragments de cytoplasme et les plaquettes (ou thrombocytes). Leur origine est la médullaire, ils proviennent d'une même cellule souche hématopoïétique totipotente. **(Stevens et Lowe, 1997)**

➤ Les hématies

Les hématies également nommées globules rouges ou érythrocytes, sont des cellules anucléées, biconcave. Formées dans la moelle osseuse, Leur production est régulée par une hormone, l'érythropoïétine. Elle a pour fonction, le transport de l'oxygène dans l'organisme. **(Prchal et Gregg, 2005)**

➤ Structure des hématies

L'érythrocyte se compose d'une membrane, et d'un cytoplasme (enzymes et hémoglobine). La membrane cellulaire, composée d'une bicouche lipidique, de glycoprotéines membranaires, elle assure le maintien de la forme en disque biconcave, et permet les échanges entre plasma et cytoplasme qui se compose d'eau, d'ions minéraux (K⁺, Na⁺, Ca⁺⁺, etc.), de glucose et de deux constituants essentiels de nature protéique; l'hémoglobine et l'ensemble des enzymes érythrocytaires.

L'hémoglobine permet le transport de l'oxygène et du dioxyde de carbone. Elle est formée par quatre chaînes de globine polypeptidique possédant chacune une molécule d'hème contenant du fer. **(Wajcman, 2005)**

Les enzymes érythrocytaires fournissent l'énergie nécessaire à la survie de l'hématie. Elles ont pour rôle, le maintien structural et fonctionnel de la membrane érythrocytaire et la protection de l'hémoglobine de l'oxydation. (Prchal et Gregg, 2005)

II.3.1.2.Mécanisme de la Cytotoxicité

II.3.1.2.1.Cytotoxicité directe

Le premier mécanisme de cytotoxicité des cellules du système hématologique, et plus exactement les érythrocytes, est l'action directe du xénobiotique ou de l'un de ces métabolites. Un des mécanismes de toxicité directe est la mort par apoptose. Dans ce type de mort cellulaire, la membrane cellulaire reste intacte, par opposition à la nécrose. Parmi les agents cytotoxiques; les médicament destinés à la chimiothérapie (les agents alkylant et les inhibiteurs de la topoisomérase).

La toxicité directe peut-être liée à la production de métabolites toxiques comme le cas du benzène, qui se transforme, après métabolisation dans le foie par le cyt p-450, en métabolite (hydroquinone) qui est transformée dans la moelle osseuse en radical phénoxy, très réactif, responsable de la destruction des cellules de cette dernière. (Vaubourdolle, 2007)

II.3.1.2.2.Cytotoxicité indirecte (Hémolyse oxydative)

Quand l'érythrocyte est soumis à un stresse oxydatif sévère par addition d'un produit oxydant, il en résulte une hémolyse toxique. L'hémolyse est liée à une lipopéroxydation de la membrane cellulaire, une oxydation des protéines membranaires et une destruction de la membrane de l'érythrocyte. (Vaubourdolle, 2007)

I. Matériel et méthodes

I.1. Matériel végétal

I.1.1. Collecte du matériel végétal

Les graines fraîches de *Nigella damascena* ont été importées à partir d'une source commerciale en France. Une fois réceptionnées, les graines ont été soigneusement nettoyées et conservées à l'abri de la lumière dans un endroit sec. Après avoir séché à l'étuve pendant 72h à 30°C, les graines ont été gardées dans des récipients fermés avant l'utilisation.

I.1.2. Extraction des alcaloïdes totaux

L'extraction a été effectuée à partir de la poudre de graine selon le protocole décrit par Ewin (1912).

30 grammes de la poudre fine de la graine est extraite par 250ml d'éther de pétrole par macération pendant 72h. L'extrait éthérique est évaporé puis mélangé à une solution HCl (5%). Ce mélange subit une délipidation par le chloroforme puis basification par le carbonate de potassium. Le précipité formé est finalement extrait par le chloroforme et évaporé, par la suite, on récupère sur des boîtes de Pétri (pesées avant et après) les alcaloïdes totaux. Le rendement de l'extrait a été calculé par rapport à la masse initiale de la matière sèche.

$$\text{Rendement (R}_d\text{)} = \left(\frac{m}{m_i} \right) \times 100$$

- m : masse de l'extrait brut
- m_i : masse de la matière sèche initiale
- R_d : rendement massique

I.2. Matériel animal

Toutes les étapes qui suivent ont été menées conformément aux directives de l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economiques), Guideline-407, adopté le 03 octobre, 2008.

I.2.1. Animaux

Cette étude a été effectuée sur des souris adultes *Swiss albinos*, blanches mâles et femelles, de poids moyen de 25g, provenant de L'institut Pasteur d'Alger.

Les animaux sont identifiés individuellement et distribués aléatoirement sur 04 groupes de 12 souris, noté de G1 jusqu'à G4. Chaque groupe est reparti sur deux cages contenant 6 mâles et 6 femelles chacune.

Les groupes ont été subdivisés en:

- ❖ Groupe témoin positif: reçoit le véhicule (eau physiologique + DMSO (10%)).
- ❖ Groupe témoin négatif: reçoit l'eau physiologique uniquement.
- ❖ Deux groupes tests: reçoivent des doses (20 et 100 mg/kg d'alcaloïdes totaux).

Les souris ont été retirées 7 jours avant le début de l'expérience afin qu'ils s'habituent au nouvel environnement du laboratoire (température à 26°C, humidité relative de 45 à 60%), et aux manipulations (injection d'eau physiologique 0.25ml *ip*, et au contact avec le personnel du laboratoire). Elles ont été soumises à un rythme nyctéméral (12h d'éclairage et 12h d'obscurité). Les animaux sont nourris avec des granulés provenant de l'ENAB El-Kseur, et de l'eau de robinet "*ad libitum*" (**Figure 4**). La sciure est renouvelée chaque jour pour assurer une bonne hygiène aux souris.



Figure 4: Conditions d'installation des souris au niveau du laboratoire.

I.3.Évaluation de la toxicité des alcaloïdes totaux *in vivo*

I.3.1.Choix des doses et voie d'administration

Les alcaloïdes totaux ont été solubilisé dans du DMSO-Eau physiologique (1:9 (v/v)), les groupes tests (G1 et G2) reçoivent respectivement : 20mg/kg et 100mg/kg. Chaque semaine, la dose est ajustée selon le poids moyens de chaque groupe mâle et femelle. Le groupe témoin positif a reçu de l'eau physiologique + DMSO, quant au groupe témoin négatif, reçoit strictement de l'eau physiologique provenant toujours du même lot.

L'administration des alcaloïdes, par voie intra péritonéale (**Figure 5**), a été faite à heure fixe (9:00 am) durant 28 jours . Le choix de la voie d'administration tient compte de la voie utilisée pour l'emploi thérapeutique et des possibilités de résorption.(**Manahan, 2002**). En effet les alcaloïdes de *Nigella damascena* sont moins actifs par voie orale (**Bekemeier et al., 1967**).

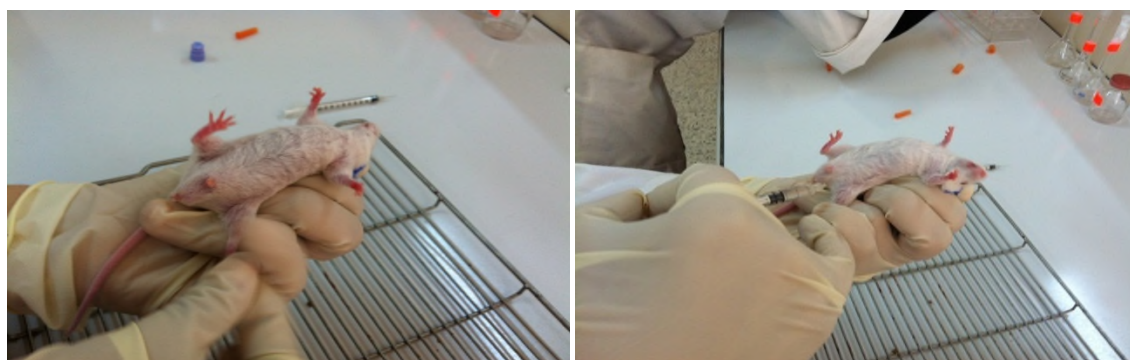


Figure 5: Administration de l'extrait "alcaloïdes totaux" par voie intra-péritonéale.

II.3.2. Suivre quotidien et observation comportementale

L'observation comportementale et l'examen morphologique des souris, sont tous deux des paramètres non négligeables dans une étude toxicologique.

- Observations comportementales

Les observations sont effectuées quotidiennement sur toutes les souris, d'un point de vue comportemental. Elles sont réalisées avant et après administration de l'extrait "alcaloïdes totaux" de *Nigella Damascena*. Suivant plusieurs critères proposés par **Mr CHADER**, appliqués au niveau de l'animalerie du LNCPP d'Alger, pour les études pré clinique. (**Annexe I**)

- Température, Poids et alimentation

La prise de température s'est faite d'une façon hebdomadaire, par voie rectale.

Le poids corporel des souris ainsi que le poids de leurs alimentation est pesé et noté chaque jour avant l'administration de l'extrait, et cela durant toute la période de l'étude.

I.3.3. Études biochimique

Les souris ont été privées de nourriture, mais pas d'eau, le jour qui précède le sacrifice.

- Prélèvement sanguin et analyses biochimiques

Le prélèvement sanguin est effectué par décapitation sous anesthésie en utilisant la ketamine (**Figure 6**) à l'aide d'une lame de Bistouri. Le sang a été récupéré directement dans des tubes héparines puis centrifugé à 3000 tours/min, pendant 5 min. Après avoir recueilli le sérum, des dosages biochimiques cliniques ont été réalisés afin de déterminer un bilan hépatique (Transaminases: ALT et AST, bilirubine) et rénal (Urée, Créatinine) ainsi que de la glycémie.



Figure 6: A droite: une souris anesthésiée; A gauche: Prélèvement de la kétamine.

1.3.4. Étude histopathologique

- Prélèvement d'organes et fixation

Après prélèvement sanguin, les souris ont été déposées sur une surface plane (**Figure 7**), et sacrifiées par dislocation cervicale. Les souris sacrifiées sont posées face dorsal contre le liège; les membres sont étirés et fixés en extension par des épingles piquées obliquement dans les mains et les pieds.

Puis on effectue une boutonnière dans la peau de l'abdomen en avant de l'orifice urinaire. On y introduit une sonde cannelée en décollant la peau et la coupant avec un scalpel, la peau est écartée. Une petite incision est pratiquée dans la paroi musculaire de l'abdomen jusqu'au sternum. Suite à ça, on procède au prélèvement des deux organes, rein et foie, et les isolés afin d'observer des changements macroscopiques et microscopiques. Une fois isolés, ces organes sont immergés dans une solution de formol 10% pour fixation.

Les étapes qui suivent la fixation : inclusion, coupe et coloration, ont été effectuées au niveau du laboratoire d'anatomo-pathologie du CHU de Sétif.

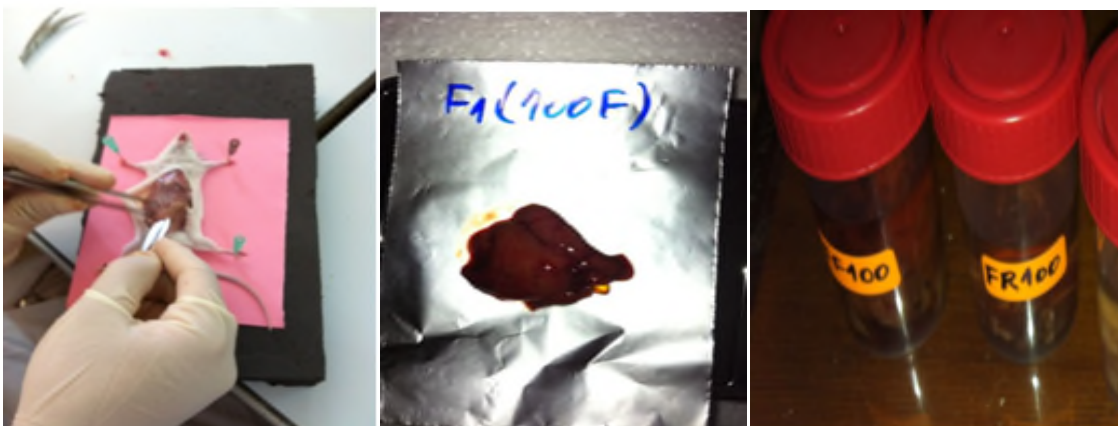


Figure 7: Dissection, prélèvement et fixation.

I.4.Évaluation de la cytotoxicité des alcaloïdes *in vitro*

I.4.1.Etude hémolytique

I.4.1.1.Principe

Le principe de ce test est d'évaluer la lyse des hématies ainsi la libération d'hémoglobine en présence d'une substance toxique. Les hématies qui restent intactes sédimentent.

I.4.1.2.Isolement des érythrocytes

Protocole expérimentale

Le sang frais, de plusieurs volontaires humains, (qui ne sont sous aucun traitement, étudiant ou personnel de laboratoire) est prélevé à chaque essai, au niveau de l'infirmier de l'université, par la veine du pli du coude directement dans des tubes héparinés.

Après centrifugation à 3000 *rpm* durant 10 minutes, le surnageant est éliminé et le culot est lavé trois fois à un même volume d'eau physiologique froide. Le culot obtenu au troisième lavage forme la totalité des hématies.

I.4.2.Préparation des solutions

- Préparation de la solution Triton X-100^[1]

Afin d'évaluer l'hémolyse totale, on a choisi le Triton X-100, pour cela, un volume de 0.1 ml de Triton X-100 est dilué dans 0.9 ml d'eau physiologique, et conservé à 4°C.

- Préparation de la solution mère d'alcaloïde

L'extrait "alcaloïdes totaux" de la graine de *Nigella damascena*, est solubilisé dans du DMSO à 2% à température ambiante, sous agitation énergique.

^[1] Le Triton X-100 est un détergent doux qui permet d'isoler et de purifier les protéines dont l'activité peut être ensuite analysée. Il est utilisé pour déstabiliser la membrane érythrocytaire et de ce fait libérer son contenu en hémoglobine.

1.4.3. Étude de l'hémolyse

Protocole expérimentale

Ce test est évalué selon la méthode de tramer et *al* en 2012. A partir de la solution mère à une concentration de 2 mg/ml, une série de tube à essai à différentes concentrations est préparée, par dilution avec de l'eau physiologique, la gamme des concentrations en extrait est comprise entre 1 et 0.01562 mg/ml.

L'analyse est réalisée dans 10 tubes. Un volume de 800 µl (eau physiologique, alcaloïdes totaux (solubilisés dans DMSO à 2%)), est mélangé avec 200µl du culot érythrocytaire;

- Un témoin négatif est préparé avec du DMSO(2%) et de l'eau physiologique.
- Un témoin positif est préparé avec de l'eau physiologique et du triton X.
- Une gamme de concentration en alcaloïdes comprise entre 1 et 0.01562 mg/ml .

Les tubes sont incubés pendant 30min à 37°C puis centrifugé à 9000g pendant 5 min, le degré d'hémolyse est déterminé en mesurant l'absorbance de l'hémoglobine à 415 nm avec un spectrophotomètre UV visible de type analytica.

1.4.4. Observation microscopique

Pour identifier d'éventuels effets toxiques ou autre changements morphologiques, que les alcaloïdes totaux de *Nigella damascena* pourrait exercer sur les globules rouges, des frottis sont réalisés à concentrations différentes d'extrait et observés sous microscope optique à différents grossissements;

- une dose à 125µl/ml
- une dose à 1000µl/ml

1.4.5. Analyse statistique

Les données obtenues ont été analysé statistiquement en utilisant le test ANOVA/MANOVA pour les comparaisons multiples. Les valeurs de $p \leq 0.05$ sont considérées statistiquement significatives.

II.1. Matériel végétal

II.1.1. Rendement d'extraction

Le taux d'extraction des alcaloïdes de *Nigella damascena* a été calculé par rapport à la masse de la poudre initiale et représente 0,1%. En Effet, **Mohan (1960)**, rapporte que la damascenine, l'alcaloïde majoritaire de la graine de *Nigella damascena*, représente près de 0.1 à 0.7 % du poids de la graine. Notre rendement est approximativement dans l'intervalle des concentrations citées par cet auteur. Toutefois, le rendement semble être lié à plusieurs paramètres : aux propriétés génétiques des graines ainsi qu'à l'origine géographique, aux conditions et à la durée de stockage, de la récolte, aux solvants utilisés ainsi qu'aux méthodes d'extraction appliquées.

II.2. Toxicité sub-chronique

II.2.1. Paramètres physiques

II.2.1.1. Évolution du poids corporel

Les résultats de l'évolution du poids corporel après traitement sub-chronique par voie intrapéritonéale des alcaloïdes de *Nigella damascena* pendant 28 jours des groupes traités (véhicule : DMSO (10%), 20mg/kg et 100mg/kg d'alcaloïdes totaux) sont représentées sur la **figure 8**. Aucune variation significative n'a été observée pour les groupes traités par rapport aux groupes témoins (recevant l'eau physiologique) pour les deux sexes ($P > 0.05$).

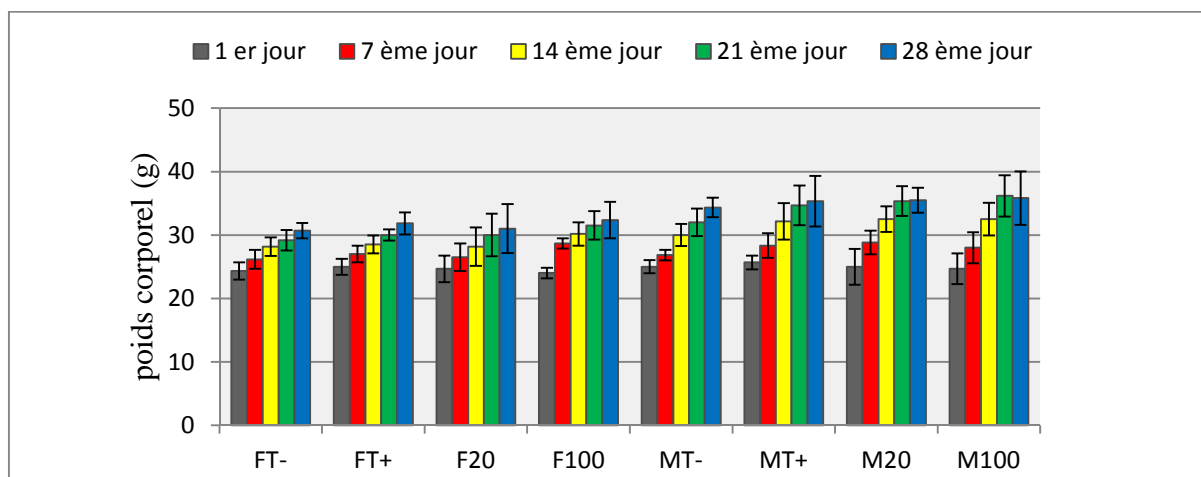


Figure 8 : Variation du poids corporel des différents groupes au cours de l'évaluation de la toxicité sub-chronique. (FT- et MT- : 0mg/kg reçoivent l'eau physiologique; FT+ et MT+ : reçoivent 10% de DMSO-Eau physiologique (v/v); F20 et M20: 20mg/Kg ; F100 et M100: 100mg/Kg d'Alc T. Les données sont exprimées par moyenne \pm écart-type ($P \leq 0.05$ est considéré comme résultat significatif ; (n = 6)).

II.2.1.2.Évolution de la prise alimentaire

Les résultats de l'évolution de la prise alimentaire après traitement sub-chronique par voie intrapéritonéale des alcaloïdes de *Nigella damascena* pendant 28 jours des groupes traités (véhicule : DMSO (10%), 20mg/kg et 100mg/kg d'alcaloïdes totaux) sont représentés sur la **figure 9**. La prise alimentaire est plus importante chez les mâles que chez les femelles mais aucune variation significative n'a été observée pour les groupes traités par rapport aux groupes témoins (recevant l'eau physiologique) pour les deux sexes ($P > 0.05$).

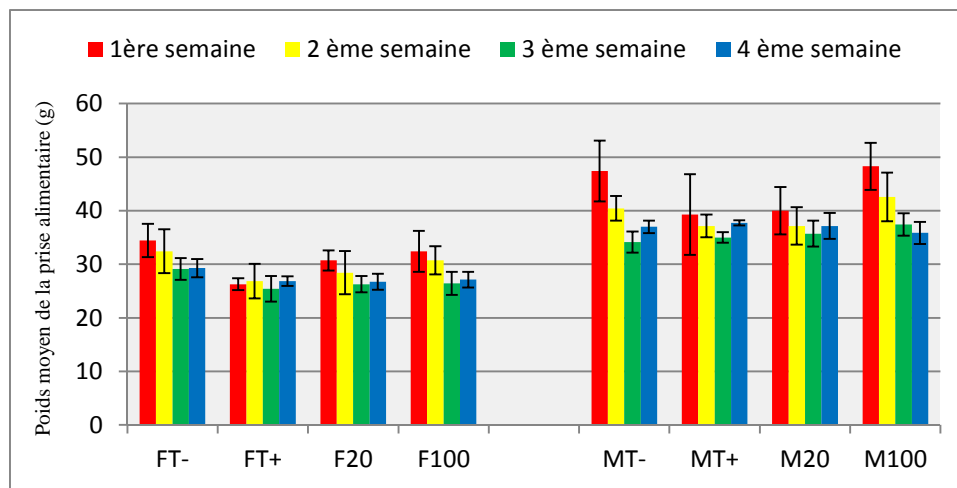


Figure 9 :L'évolution de la prise alimentaire des différents groupes traités et témoin dans les conditions de la toxicité sub-chronique par doses (FT- et MT- : 0mg/kg reçoivent l'eau physiologique; FT+ et MT+ : reçoivent 10% de DMSO-Eau physiologique (v/v) ; F20 et M20: 20mg/Kg ; F100 et M100: 100mg/Kg d'Alc T. Les données sont exprimées par moyenne \pm écart-type ($P \leq 0.05$ est considéré comme résultat significatif ; (n = 6)).

II.2.1.3. Evolution de la température corporelle centrale (température rectale)

Les résultats de l'évolution de la température corporelle centrale, prise par voie rectale après traitement sub-chronique par voie intrapéritonéale des alcaloïdes de *Nigella damascena* pendant 28 jours des groupes traités (véhicule : DMSO (10%), 20mg/kg et 100mg/kg d'alcaloïdes totaux) sont représentés sur la **figure 10**. Ces valeurs sont dans l'intervalle de normalité qui varie entre 36 et 39 °C chez les souris. Aucune variation significative n'a été observée pour les groupes traités par rapport aux groupes témoins (recevant l'eau physiologique) pour les deux sexes ($P > 0.05$).

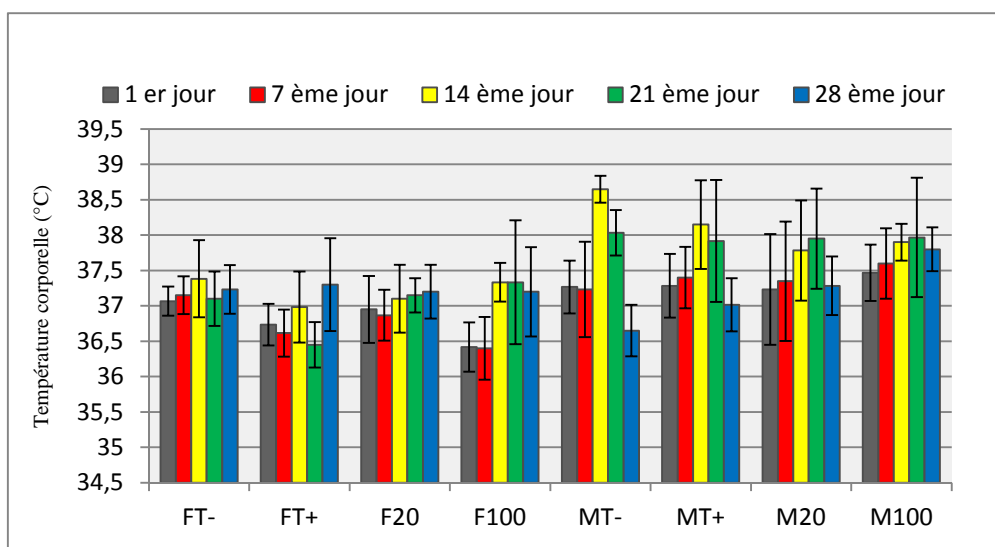
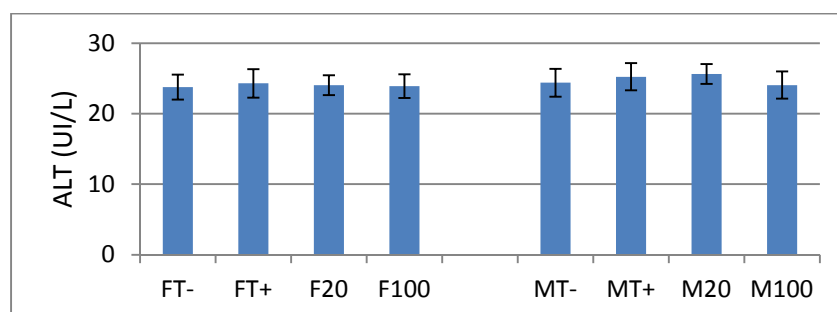


Figure10 : Variation de la température corporelle centrale prise par voie rectale des différents groupes traités au cours de l'évaluation de la toxicité sub-chronique. (FT- et MT- : 0mg/kg reçoivent l'eau physiologique; FT+ et MT+ : reçoivent 10% de DMSO-Eau physiologique (v/v); F20 et M20: 20mg/Kg ; F100 et M100: 100mg/Kg d'Alc T. Les données sont exprimées par moyenne \pm écart-type ($P \leq 0.05$ est considéré comme résultat significatif ; (n = 6)).

II.2.2. Paramètres biochimiques

II.2.2.1. Paramètres hépatiques

Les résultats du dosage de la bilirubine et des transaminases ALT et AST après traitement sub-chronique par voie intrapéritoniale des alcaloïdes de *Nigella damascena* pendant 28 jours des groupes traités (véhicule : DMSO (10%), 20mg/kg et 100mg/kg d'alcaloïdes totaux) sont représentées sur la **figure11**. Aucune variation significative n'a été observée pour les groupes traités par rapport aux groupes témoins (recevant l'eau physiologique) pour les deux sexes ($P > 0.05$).



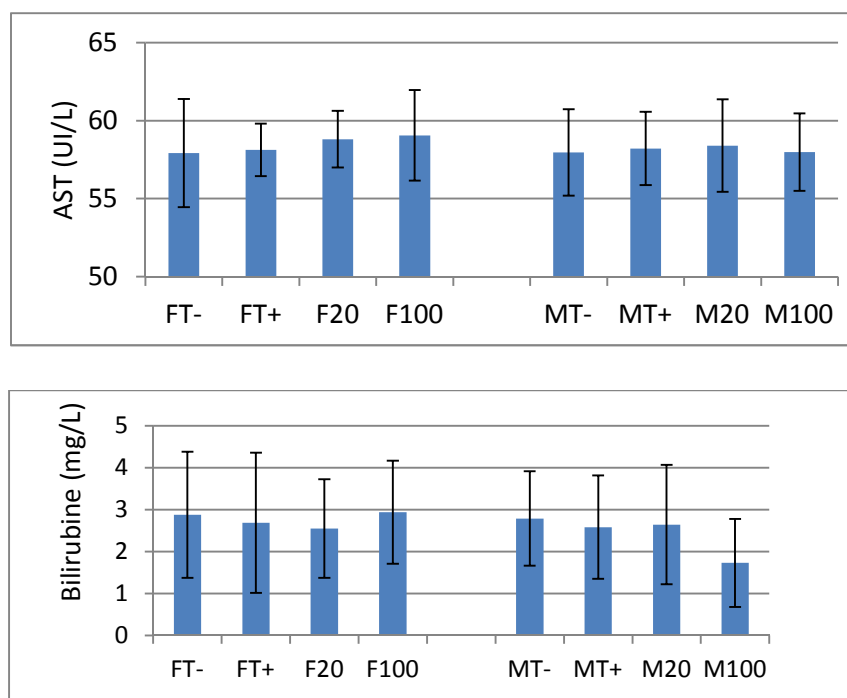
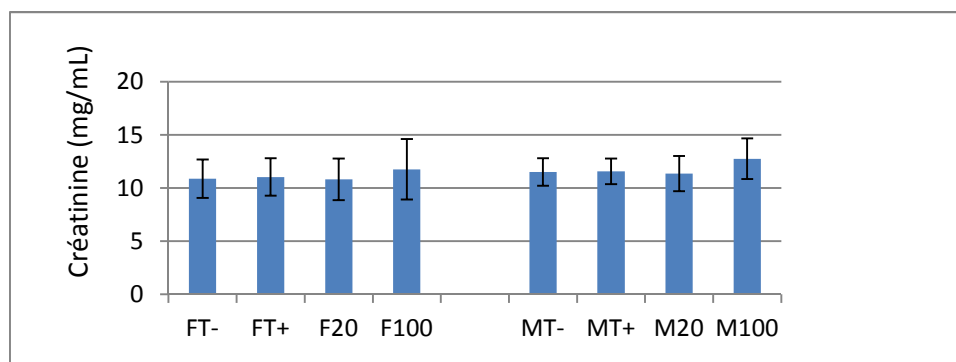


Figure 11 : Dosage des transaminases ALT et AST et de la bilirubine des différents groupes traités et témoin dans les conditions de la toxicité sub-chronique traité par des doses (FT- et MT- : 0mg/kg reçoivent l'eau physiologique; FT+ et MT+ : reçoivent 10% de DMSO-Eau physiologique (v/v) ; F20 et M20: 20mg/Kg ; F100 et M100: 100mg/Kg d'Alc T. Les données sont exprimées par moyenne \pm écart-type ($P \leq 0.05$ est considéré comme résultat significatif ; $n = 6$).

II.2.2.2. Paramètres néphrétiques

Les résultats du dosage de la créatinine et de l'urée après traitement sub-chronique par voie intrapéritonéale des alcaloïdes de *Nigella damascena* pendant 28 jours des groupes traités (véhicule : DMSO (10%), 20mg/kg et 100mg/kg d'alcaloïdes totaux) sont représentées sur la **figure 12** Aucune variation significative n'a été observée pour les groupes traités par rapport aux groupes témoins (recevant l'eau physiologique) pour les deux sexes ($P > 0.05$).



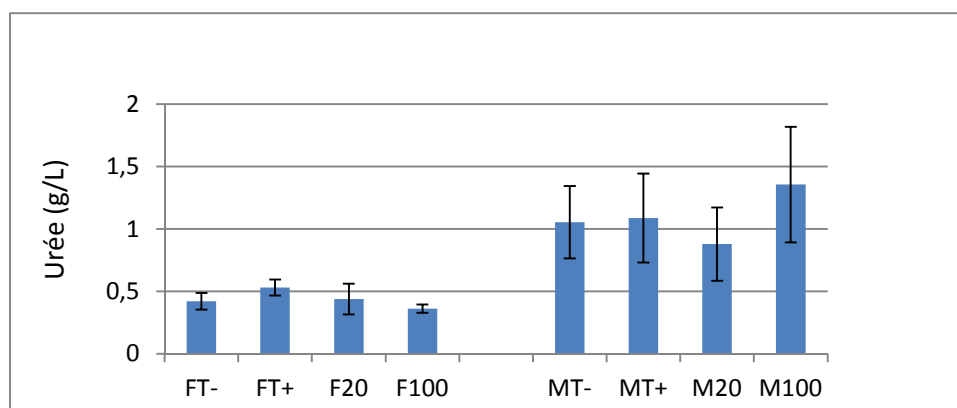


Figure 12: Dosage de la créatinine et de l'urée des différents groupes traités et témoin dans les conditions de la toxicité sub-chronique par des doses (FT- et MT- : 0mg/kg reçoivent l'eau physiologique; FT+ et MT+ : reçoivent 10% de DMSO-Eau physiologique (v/v) ; F20 et M20: 20mg/Kg ; F100 et M100: 100mg/Kg d'Alc T. Les données sont exprimées par moyenne \pm écart-type ($P \leq 0.05$ est considéré comme résultat significatif ; (n = 6)).

II.2.2.3. Paramètres d'équilibre homéostatique

Les résultats du dosage du glucose (glycémie) après traitement sub-chronique par voie intrapéritonéale des alcaloïdes de *Nigella damascena* pendant 28 jours des groupes traités (véhicule : DMSO (10%), 20mg/kg et 100mg/kg d'alcaloïdes totaux) sont représentées sur la **figure 13**. La glycémie est plus importante chez les femelles que chez les mâles, mais aucune variation significative n'a été observée pour les groupes traités par rapport aux groupes témoins (recevant l'eau physiologique) pour les deux sexes ($P > 0.05$).

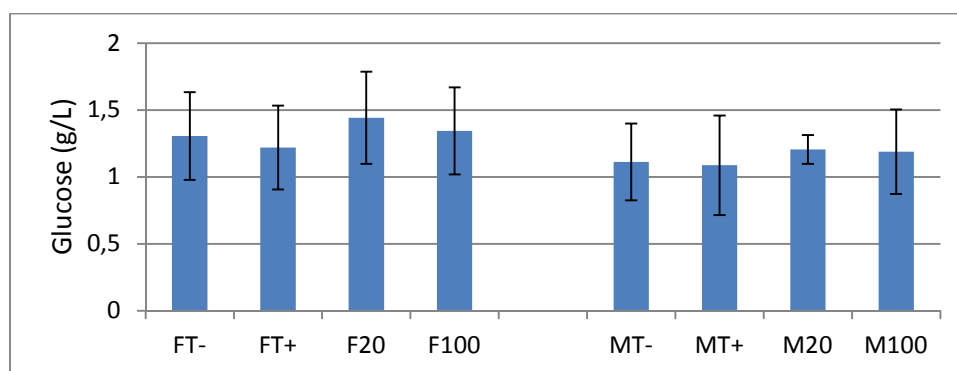


Figure 13 : Dosage du glucose (glycémie) des différents groupes traités et témoin dans les conditions de la toxicité sub-chronique par des doses (FT- et MT- : 0mg/kg reçoivent l'eau physiologique; FT+ et MT+ : reçoivent 10% de DMSO-Eau physiologique (v/v) ; F20 et M20: 20mg/Kg ; F100 et M100: 100mg/Kg d'Alc T. Les données sont exprimées par moyenne \pm écart-type ($P \leq 0.05$ est considéré comme résultat significatif ; (n = 6)).

II.2.3. Examen histopathologique

II.2.3.1. Poids final des organes internes (Foie et reins)

Les résultats du poids final des organes après traitement sub-chronique par voie intrapéritonéale des alcaloïdes de *Nigella damascena* pendant 28 jours des groupes traités (véhicule : DMSO (10%), 20mg/kg et 100mg/kg d'alcaloïdes totaux) sont représentées sur la **figure 14**. Aucune variation significative n'a été observée pour les groupes traités par rapport aux groupes témoins (recevant l'eau physiologique) pour les deux sexes ($P > 0.05$).

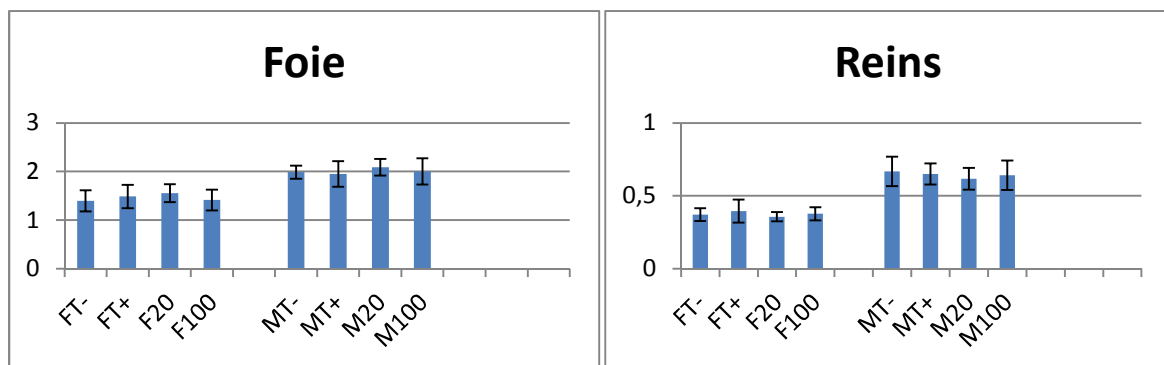


Figure 14 :Poids des organes internes (Foie et reins) des différents groupes traités et témoins dans les conditions de la toxicité sub-chronique par doses (FT- et MT- : 0mg/kg reçoivent l'eau physiologique; FT+ et MT+ : reçoivent 10% de DMSO-Eau physiologique (v/v) ; F20 et M20: 20mg/Kg ; F100 et M100: 100mg/Kg d'Alc T. Les données sont exprimées par moyenne \pm écart-type ($P \leq 0.05$ est considéré comme résultat significatif ; (n = 6)).

II.2.3.2. Histologie hépatique

La **figure 15** montre une micrographie optique (GX40) du parenchyme hépatique des souris des deux sexes de tous les groupes traités et témoins.

Sur ces coupes histologiques le foie présente une structure typique normale. Le foie est entouré par une couche de tissu conjonctif (la capsule de Glisson). Cette capsule entoure le parenchyme hépatique, qui a une organisation polygonale formée de plusieurs lobes hépatiques, qui sont séparés les uns des autres par du tissu conjonctif. Chaque lobe est constitué d'hépatocytes, disposés en anastomosés. Dans le centre du lobe hépatique se trouve la veine Centro-lobulaire, qui reçoit le sang à partir du parenchyme hépatique. Les hépatocytes sont des cellules de forme polygonale.

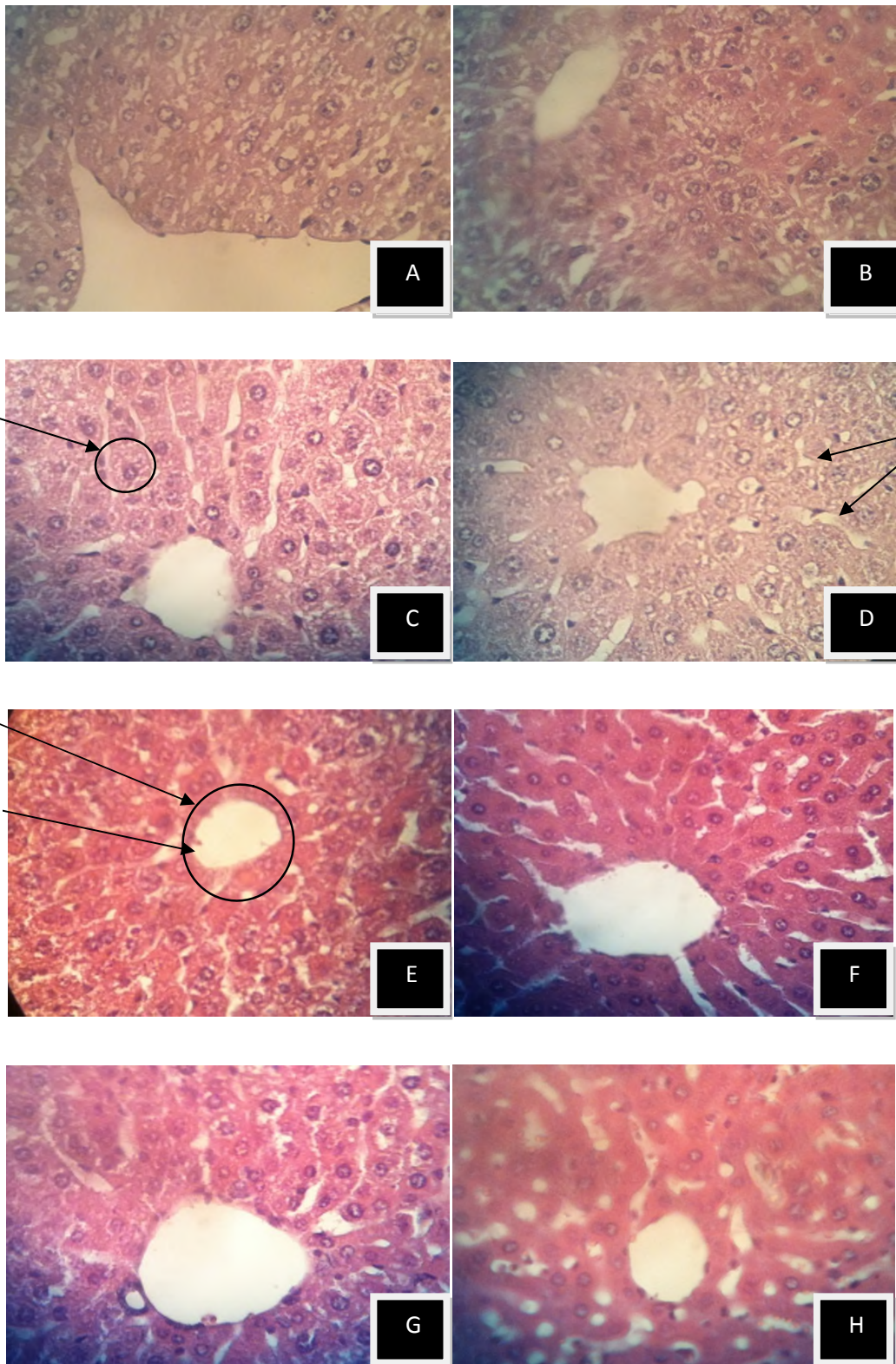
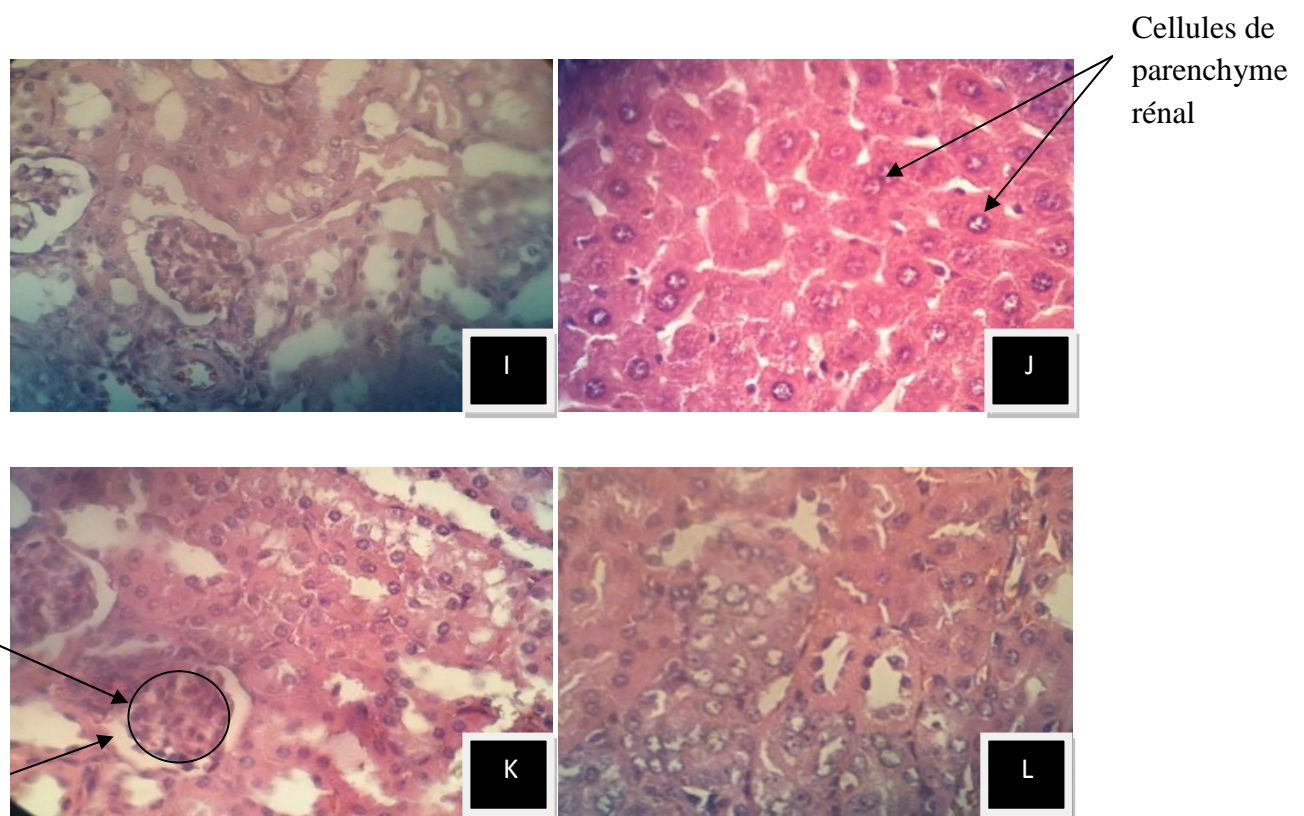


Figure 15 : Micrographie du parenchyme hépatique des souris des deux sexes des groupes traités (Témoin : Eau physiologique : G(M), H(F) ; véhicule : DMSO (10%) : E(M), F(F), 20mg/kg: C(M), D(F) et 100mg/kg A(M), B(F) d'alcaloïdes totaux) (Gx40). M : mâles ; F : femelles.

II.2.3.3. Histologie rénale

La **figure 16** montre une micrographie optique (GX40) du parenchyme rénal des souris des deux sexes de tous les groupes traités et témoins.

Sur ces coupes histologiques le rein présente une structure typique normale. Le parenchyme rénal est entouré d'une capsule fibreuse appelée cortex. On distingue deux zones principales au niveau du rein : une croute externe (cortex rénale) et une médullaire interne. Le cortex rénal comprend un parenchyme composé de différents tubules, au milieu de ces tubes sont observés les corpuscules rénaux composés de capsules de Bowman et de glomérules. La médullaire rénal est d'un aspect strié. Elle est constituée de pyramides de Malpighi. Elle contient la plus grande partie du tube urinifère, notamment les anses de Henlé et les canaux collecteurs, ainsi que les vaisseaux sanguins et lymphatiques.



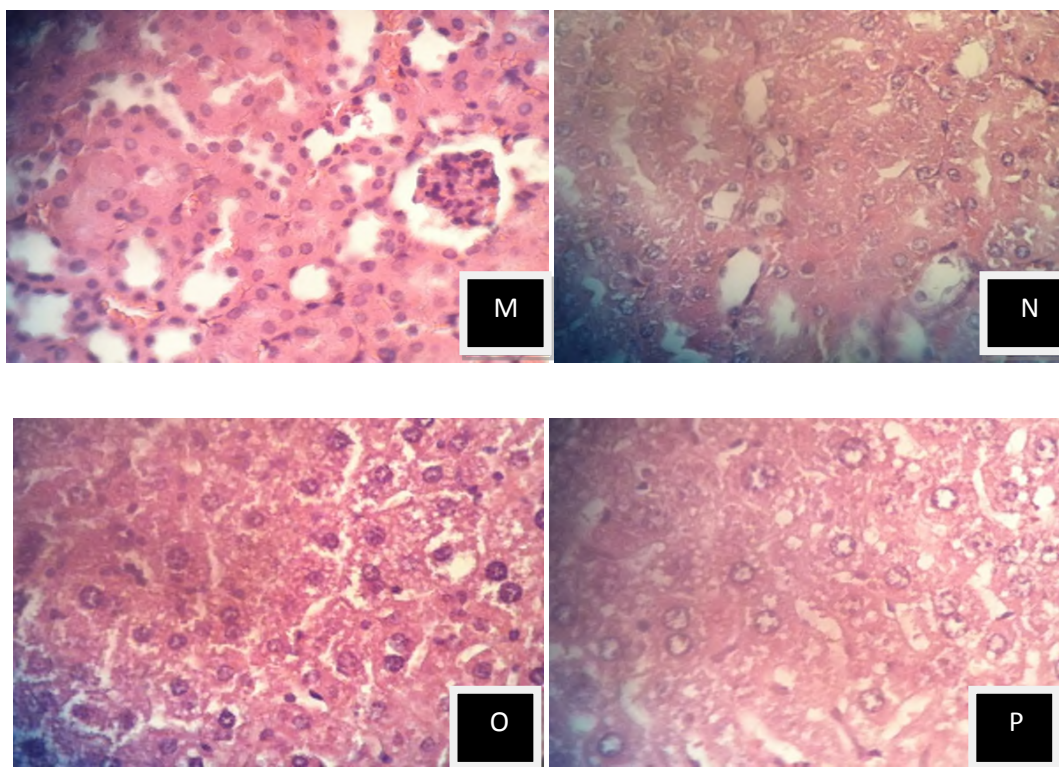


Figure 16: Micrographie du parenchyme rénal des souris des deux sexes des groupes traités (Témoin : Eau physiologique : O(M), P(F) ; véhicule : DMSO (10%) : M(M), N(F), 20mg/kg: K(M), L(F) et 100mg/kg I(M), J(F) d'alcaloïdes totaux) (Gx40). M : males ; F : femelles.

II.3. Etude *in vitro* de la cytotoxicité érythrocytaire

II.3.1. Dosage de l'hémoglobine et pourcentage d'hémolyse

Les observations faites au cours de notre évaluation révèlent que 1000 μg d'alcaloïdes totaux pendant un temps d'incubation de 30min est une dose qui n'affecte pas l'intégrité cellulaire. D'ailleurs, les résultats obtenus en calculant le pourcentage d'hémolyse ainsi que par dosage spectrophotométrique de l'hémoglobine déversée par les érythrocytes au cours du processus hémolytique ne montrent aucune différence d'absorbance significative (**Figure 17**) par rapport au témoin ($P > 0.05$). Le plus grand pourcentage d'hémolyse a été obtenu en présence de 1000 μg d'alcaloïdes totaux, qui est représenté par 5,54% d'hémolyse avec 5,72% de celui du control (**Figure 17**).

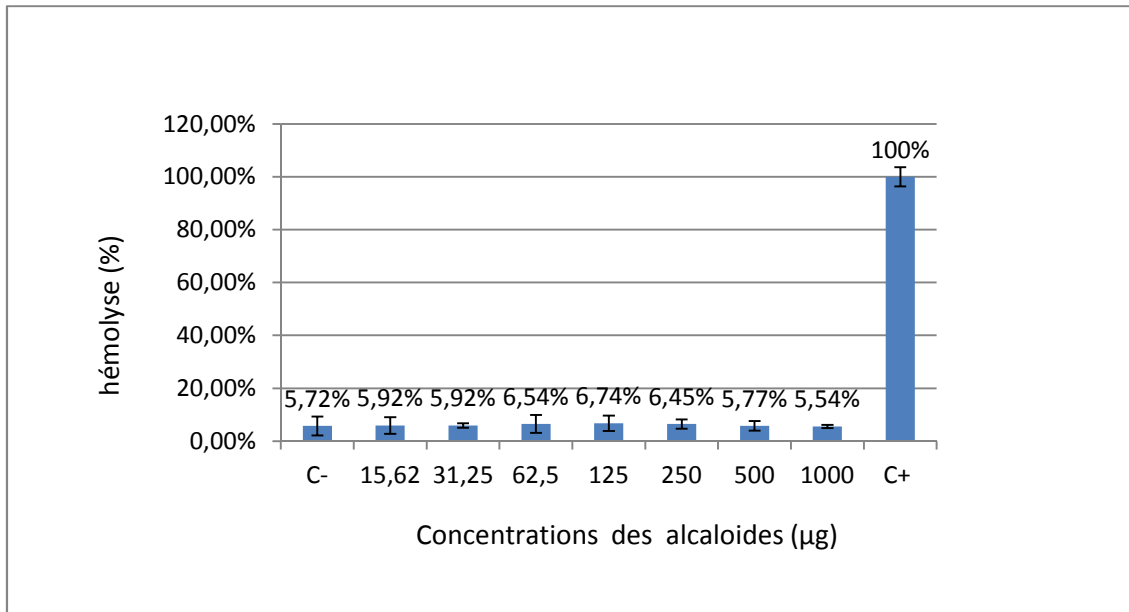
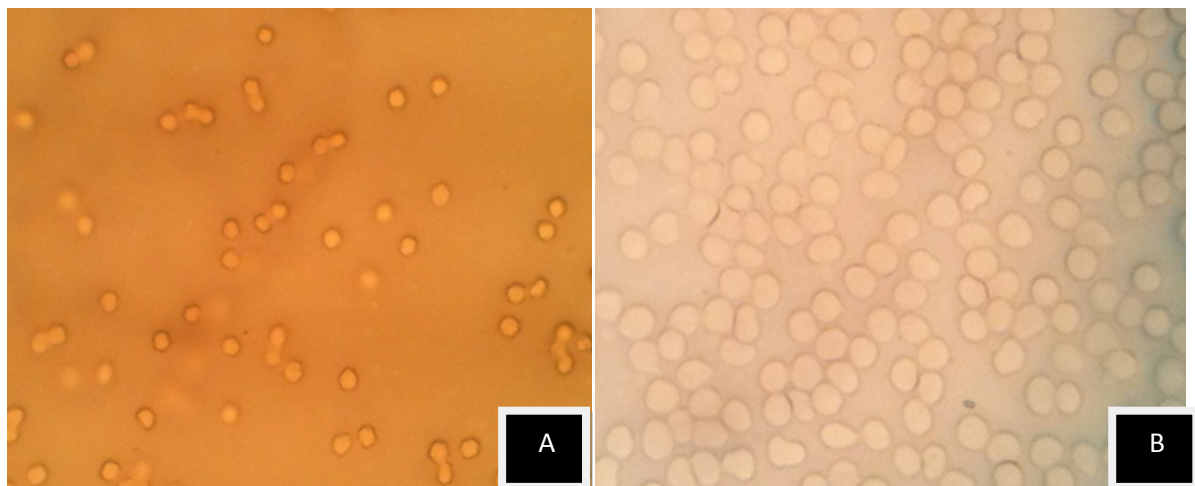


Figure 17: Pourcentage d'hémolyse érythrocytaire en présence et en absence des différentes concentrations d'alcaloïdes et du Triton X-100 ($P > 0.05$).

II.3. 2. Observation microscopique

Les observations par microscopie optique ne révèlent aucun signe d'affection morphologique des cellules érythrocytaires. Les frottis sanguins observés à grossissement X40 (**Figure 18**) montrent que les membranes cellulaires sont intactes aussi bien au niveau du control qu'en présence des différentes concentrations d'alcaloïdes contrairement à celui en présence du Triton-X où le nombre d'érythrocytes à diminuer et les membranes paraissent affectées.



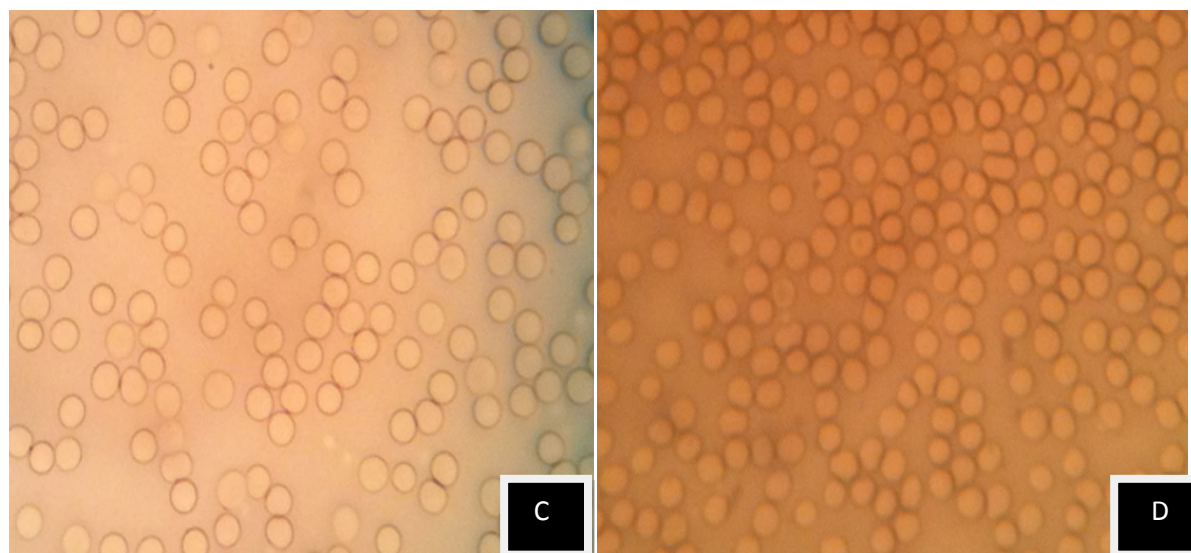


Figure 18 : Images par Microscopie optique de la morphologie érythrocytaire en absence et en présence des alcaloïdes totaux de la graine de *Nigella damascena*. (A) Cellules control positif ; (B) Cellules control négatif; (C) Cellules incubées avec 125 µg/ml ; (D) Cellules incubées avec 1000 µg/ml (Gx40).

II.4. Discussion générale

L'exposition aux drogues ou aux composés chimiques résultant de la toxicité se manifeste au niveau des organes spécifiques, connus par les organes cibles de la toxicité. Les facteurs qui contribuent à la susceptibilité d'un organe à la toxicité incluent, la pharmacocinétique, le métabolisme des drogues ou des composés chimiques, et la capacité de réponse d'un organe à des composés toxiques. Les tests de toxicité permettent non seulement une compréhension des mécanismes de la toxicité mais nous informent aussi sur la potentielle dangerosité de ces substances sur la santé de l'Homme. Ce travail a pour but de réaliser un profil toxicologique *in vivo* et *in vitro* des alcaloïdes de *Nigella damascena*.

Afin de déceler un ou plusieurs signes de toxicité probable, le comportement des souris des différents groupes expérimentaux ont été suivie chaque jour avant et après injection en suivant les signes de toxicité cités en annexe recommandés par le LNCPP mais aucun de ces signes n'a été décelé.

Généralement, les altérations du poids corporel et des organes internes, la prise alimentaire ainsi que la température centrale des souris reflètent une toxicité après exposition aux agents toxiques. Notre étude montre qu'aucune variation significative ($P > 0.05$) de l'un

de ces paramètres n'a été observée pour les groupes traités par rapport au groupe témoin pour les deux sexes qui marque probablement une intégrité structurale et/ou fonctionnelle normale.

Contrairement aux travaux **d'Azadeh et al (2013)**, sur la toxicité sub-chronique de la mitraginine, un alcaloïde extrait à partir de *Mitragyna speciosa* pendant 28 jours, qui montrent qu'il y'a une diminution des poids des femelles ainsi que la prise alimentaire à une dose de 100 mg/Kg/jour.

Le foie est la première cible des substances absorbées au niveau de l'intestin. L'élévation des taux des transaminases ALT et AST ainsi que de la bilirubine est un indicateur des fonctions hépatiques (**Martin et al., 1981**). L'ALT est une enzyme qui se trouve à une concentration élevée au niveau du cytoplasme hépatique, et l'augmentation sérique du taux de cette enzyme reflète des dommages hépatocellulaire (**Tennekoon et al., 1991**). Cependant l'AST est une enzyme non spécifique, qui se trouve également dans d'autres cellules telles que les cellules cardiaque, musculaire et sanguine (**Nyblom et al., 2002**). De ce fait, l'AST est un indicateur hépatique moins spécifique que l'ALT. La bilirubine est utilisée comme marqueur hépatique, car son taux élevé dans le corps suggère une anomalie hépatique (**Hughes et Jefferson, 2009**).

Le dosage des paramètres hépatiques à savoir, les transaminases ALT et AST ainsi que de la bilirubine montre qu'aucune altération n'a affecté les taux de ces paramètres pour les groupes traités par rapport aux groupes témoins pour les deux sexes ($P > 0.05$). Nos résultats marquent donc une fonction hépatique normale.

Les cellules rénales sont exposées à des concentrations plus élevées en toxique vu qu'elles assurent le processus de filtration des déchets sanguins. La fonction rénale est appréciée par le dosage de la créatinine et de l'urée sériques. La créatinine est le marqueur biochimique le plus fiable de la fonction glomérulaire. Elle est le produit final du catabolisme de la créatine et sa concentration plasmatique est relative à la masse musculaire (**Hughes et Jefferson, 2009**).

Notre étude montre qu'aucune altération n'a affecté les taux de la créatinine et de l'urée des groupes traités par rapport aux groupes témoins pour les deux sexes ($P > 0.05$). Nos résultats marquent donc une fonction rénale normale.

Les résultats de notre évaluation biochimique sont comparables aux travaux de **Marcelo et al (2009)** sur la toxicité sub-chronique de l'alcaloïde *p-synephrine* à une dose de 30 et de 300

mg/Kg/jour pendant 28 jours, qui montrent que le dosage des paramètres biochimiques, AST, ALT et créatinine ne présentent pas de différence significative par rapport aux témoins. Par contre, **d’Azadeh et al (2013)** ont constaté une augmentation significative d’AST, d’ALT, créatinine et urée lors de l’étude de la toxicité sub-chronique de la mitraginine, un alcaloïde extrait à partir de *Mitragynaspeciosa* à des doses de 1, 10, 100 mg/Kg/jour pendant 28 jours.

L’étude histopathologique faite sur le foie et les reins montre non seulement un aspect morphologique normal mais aussi une structure histologique typique normale du parenchyme hépatique et rénal des souris traitées et témoins des deux sexes. Ces résultats sont similaires aux travaux de **Marcelo et al (2009)** sur la toxicité sub-chronique de *p-synephrine* à une dose de 30 et de 300 mg/Kg/jour pendant 28 jours, qui ne démontre aucun changement des poids des organes ni altérations histologiques.

Les résultats histopathologiques apportent donc un appui corrélatif avec les résultats de l’analyse biochimique, ce qui confirme que les souris sont saines et ne présentent aucune anomalie hépatique et rénale.

Le pourcentage d’hémolyse observé avec une concentration élevée telle que 1000 µg n’a presque aucun effet ($P > 0.05$). Les observations microscopiques ainsi que le taux d’hémolyse sont en parfaite corrélation, car aucun effet sur la morphologie érythrocytaire n’a été détecté. On constate donc que nos alcaloïdes sont loin d’être toxiques. Ces résultats sont comparables à ceux de **Lin et al (1998)** qui ont démontré que la berbérine, un alcaloïde de *Coptis chinensis* ne provoque pas d’hémolyse. De même **Bribi et al (2013)** ont démontré que 1000 µg d’alcaloïdes de *Fumaria caprêolata* n’ont aucun effet sur l’hémolyse.

Conclusion et perspectives

Nigella damascena est connue par ses effets bénéfiques et son utilisation traditionnelle pour plusieurs vertus thérapeutiques.

L'étude de la toxicité sub-chronique des alcaloïdes de *Nigella damascena* sur des souris *Swiss albinos*, avec deux doses ; 20 et 100 mg/kg, n'a révélé aucune toxicité, suite à l'étude comportementale et des paramètres physiologiques (l'évolution du poids et la température), au dosage des paramètres biochimiques (les transaminases AST/ALT, bilirubine, urée, créatinine, et glucose) et à l'étude histopathologique du foie et des reins.

La juxtaposition des différents résultats du bilan hépatique, néphrétique et ceux de l'étude histopathologique, indique que l'administration par voie *ip* des alcaloïdes des graines de *Nigella damascena* pendant 28 jours à des doses de 20 et 100 mg/Kg/jour, ne présente pas d'effet toxique sur les deux organes étudiés.

L'étude *in vitro* de la cytotoxicité, sur des érythrocytes humains, des alcaloïdes de *Nigella damascena*, à des doses qui varient de 1 à 0.01562mg/ml, n'a pas révélée aucune toxicité, ce qui se traduit par une absence d'hémolyse.

En plus de l'étude de la toxicité sub-chronique et de la cytotoxicité réalisée, il sera très important en perspectives, d'établir un profil toxicologique complet des alcaloïdes de cette plante, à savoir l'étude de la toxicité chronique afin d'évaluer sa toxicité à long terme, et de voir ses effets toxiques -s'ils existent- à l'échelle cellulaire et moléculaire.

Annexe

Annexe 1: Test comportementales établie par le Dr CHADER, de l'Institut nationale de contrôle des produits pharmaceutiques.

Observation comportementale		
Dans la cage	A la manipulation	Réflexes
<ul style="list-style-type: none"> - fermeture palpébrale - mouvement clonique - mouvement tonique 	<ul style="list-style-type: none"> - facilité d'enlèvement de la cage - réactivité au maniement - larmolement - fermeture palpébrale - pilo-érection - exophtalmie - salivation 	<ul style="list-style-type: none"> - à l'approche - touché - claquement - pincement de la queue - occulo-palpébrale - redressement
Observation comportementale		
Réponse autonome	Activité motrice	Système nerveux Centrale
<ul style="list-style-type: none"> - miction - défécation - contorsion(courbure) 	<ul style="list-style-type: none"> - tétanie - reflexe De Redressement 	<ul style="list-style-type: none"> - queue en S - tremblement - agressivité - convulsion - excitation et hyperactivité - stéréotypie - démangeaison

Résumé:

Nigella damascena est une plante annuelle herbacée, utilisée en phytothérapie orientale pour le traitement des affections catarrhales, l'aménorrhée et comme diurétique, les graines réduites en poudre sont utilisées comme sternutatoire. Aucune étude systématique de la toxicité potentielle des alcaloïdes de cette plante n'a été menée. Cette étude vise à déterminer le profil de toxicité des alcaloïdes de l'extrait des graines de *Nigella damascena* chez la souris. Dans l'étude de toxicité sub-chronique, un total de 48 souris adultes suisses albinos mâles et femelles ont été utilisés. Aucune mortalité ou comportement anormal n'a été observé. Dans l'étude de la toxicité sub-chronique avec deux doses 20 et 100mg/kg, aucune différence significative n'a été observée concernant les paramètres biochimiques ; le glucose, la bilirubine, l'aspartate aminotransférase (AST), l'alanine aminotransférase (ALT), l'urée, la créatinine. De la même manière, aucunes modifications histopathologiques n'ont été observées dans les reins et les structures du foie. D'autre part, l'étude de la cytotoxicité des érythrocytes, en utilisant deux concentrations (125 et 1000 µg / ml) d'alcaloïdes totaux, n'a révélé aucun hémolyse.

Mots clés : *Nigella damascena*, alcaloïdes, toxicité sub-chronique, cytotoxicité.

Summary:

Nigella damascena is an herbaceous annual plant used in oriental herbal medicine for the treatment of catarrhal affections, amenorrhea and as a diuretic; powdered seeds are used as sternutatory. No systematic study of the potential toxicity of the plant alkaloids has been described. This study aimed to determine the toxicity profile of seed alkaloids extract from *Nigella damascena* in mice. In sub-chronic toxicity study, a total of 48 adult male and female Swiss albino mice were used. No mortality or abnormal behavior was observed. In sub-chronic toxicity study when working at 20 and 100mg/kg respectively, no significant differences were observed concerning glucose, bilirubine, aspartate transaminase (AST), alanine aminotransferase (ALT), urea, creatinine, parameters. In the same manner, no histopathological alterations had been observed in the kidney and liver structures. On the other hand, the study of erythrocyte cytotoxicity, using two concentrations (125 and 1000µg/ml) of total alkaloids, has revealed no hemolysis.

Keywords : *Nigella damascena*, alkaloids, sub-chronic toxicity, cytotoxicity.

Références Bibliographiques

- **Abayomi, S.** (2010). *Plante médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique*. Nigeria: Karthala, 212p.
- **Agradi, E., Fico, G., Cillo, F., Francischi, C and Tomé, F.** (2002). Estrogenic activity of *Nigella damascena* extracts, evaluated using a recombinant yeast screen. *Phytother. Res*, 16 (5), pp 414–416.
- **Agradi, E., Fico, G., Gillo, F., Francischi, C and Tomé, F.** (2001). Estrogenic Activity of phenolic compounds from *Nigella damascena*, evaluated using a recombinant yeast screen, *Planta Med*, 67 (6), pp 553-555.
- **Alan, S., Lowe, J.** (2006). *Histologie humaine*. Paris : Elsevier SAS, pp 215-275.
- **Andrade, R.J., Robles, M and Lucena, M.I.** (2009). Rechallenge in drug-induced liver injury: the attractive hazard. *Expert Opin Drug Saf*, 8(6), pp709-14.
- **Andreas, G.H., Oegg, K.** (2005). The oldest evidence of *Nigella damascena* L. (Ranunculaceae) and its possible introduction to central Europe. *Veget Hist.Archaeobot*, pp 562–570.
- **Arbo, M .D ., Schmitt, G.C ., Limberger, F.M , Charão, M.F ., Moro A.M ., Ribeiro, G.L ., Dallegrave, E., Garcia,S.C ., Leal, M.B , Limberger,R.P .**(2009). Subchronic toxicity of *Citrus aurantium* L. (Rutaceae) extract and p-synephrine in mice. *Regulatory toxicology and pharmacology* ,54 ,pp114–117.
- **Assis, D.N., Navarro, V.J.** (2009). Human drug hepatotoxicity: a contemporary clinical perspective. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 5(5), 73p.
- **Atul, B.M., Hoffbrand, A.V.** (2004). *Hématologie*. Paris : De Boeck, p 14.

- **Badiagra.M** .(2011). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse de doctorat. Université de Bamako.8p.
- **Bonnier, G., Douin, R.** (1990). *La grande flore en couleurs*. Paris : Edition Belin, pp 23-24.
- **Bory de Saint-Vincent, M.** (1827). *Dictionnaire classique d'histoire naturelle*. Paris: Rey et Gravier, 565p.
- **Bouguezza, Y., Bribi, N., Tacharfiout, M., Amara, S ., and khttal, B.** (2012). acute and sub-chronic toxicity study of *Nigella damascena* methanolic seed extract in mice. *International journal of pharma and bio science* ,4(2), pp 413-419.
- **Boulard,B.** (2001). *Plantes médicinales du monde*. Paris : ESTEM , pp 190-193.
- **Bruneton, J.** (1999). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Paris : Technique et Documentation Lavoisier, pp 784-873.
- **Bruneton, J.** (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Paris : Technique et Documentation Lavoisier. 558p.
- **Cartier,O., Roux,D.** (2007). *Botanique pharmacognosie phytothérapie*. Paris: Wolters Kluwer, 89p.
- **Daly, A.** (2010). Drug-induced liver injury: past, present and future. *Pharmacogenomics*, 11, pp 607-611.
- **Dausset, J.** (1976). Le complexe HLA, les associations entre HLA et maladies. *Presse Méd*, 5, pp 1477-1482.
- **David, J.M., Arditti-Djiane, J.** (1999). *Intoxications par les plantes* dans : Danel V, Barriot P, Eds. *Intoxications aiguës en reanimation*. Paris: Arnette, pp 573-574.
- **Delaney, K.A.** (2006). Hepatic principles. In: *Goldfrank's toxicologic emergencies*. New York: McGraw-Hill, pp 216-30.

- **Dopke, W., Fritsch, G.** (1970). The alkaloid of *Nigella damascena*. *Pharmazi*, 25(1), pp 69-70.
- **Edelstein, C.L., Faubel, S.** (2011). *Biomarkers of kidney diseases: biomarkers in acute kidney injury*. London: Elsevier, p 177.
- **Elaine, N.M.** (2008). *Biologie humaine*. Paris : Edition du renouveau pédagogique, pp 425p.
- **Ewins, A.J.** (1912). The construction and synthesis of damascenine, the alkaloid of *Nigella damascena*. *Journal of Chemical Society, Transactions*, 101 (0), pp 544-552.
- **Fattorusso, E., Tagliatela-Scafati, O.** (2007). *Modern alkaloids*. Napoli: Wiley-VCH, pp 1-689.
- **Fico, G., Braca, A., Tomè, F., and Morelli, I.** (2001). A new phenolic compound from *Nigella damascena* seeds. *Fitoterapia*, 72(0), pp 462-463.
- **Fico, G., Panizzi, L., Flamini, G., Braca, A., Morelli, I., Tomè, F., and Cioni, P.L.** (2004). Biological screening of *Nigella damascena* for antimicrobial and molluscicidal activities. *Phytother*, 18(0), pp 468–470.
- **Fico, G., Panizzi, L., Flamini, G., Braca, A., Morelli, I., Tomè, F., and Cioni, P.L.** (2004). Biological screening of *Nigella damascena* for antimicrobial and molluscicidal activities. *Phytother*, 18(6), pp 468–470.
- **Fromenty, B.** (2010). *Mécanismes de l'hépatotoxicité médicamenteuse*. Paris: Elsevier-Masson, pp 2-7.
- **Gaw, A., Murphy, M.J., Cowan, R.A., O'Reilly, D.J., Stewart, M.J., and Shepherd, J.** (2008). *Clinical Biochemistry: Investigation of renal function*. Churchill-Livingstone-Elsevier, pp 28-30.
- **Gildemeister, E., Schimmel, M.** (2011). *The Volatile Oils*. *Read Books Design*. 2(0), 750p.

- **Guignard, J.L.** (2001). *Botanique systématique moléculaire*. Paris : Masson, p 304.
- **Hughes, J., Jefferson, A.** (2009). *Le bilan biochimique facile*. Elsevier-Masson, pp 45-60.
- **Jaeschke, H., Gores, G.J., Cederbaum, A.I., Hinson, J.A., Pessayre, D., and Lemasters, J.J.** (2002). Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol.Sci*, 65(2), pp 166-76.
- **Kaplowitz, N.** (2011). *Gastroenterology Liver Division*. Los Angeles: Keck School of Medicine, University of Southern California, p 38.
- **Keeffe, E.B., Friedman, L.M.** (2004). *Handbook of liver diseases*. Edinburgh: Churchill Livingstone, London, pp 104-123.
- **Knowles, S., Uetrecht, J., and Shear, N.** (2000). Idiosyncratic drug reactions: the reactive metabolite syndrome. *Lancet*, 91p.
- **Larrey, D.** (2007). *Complementary and alternative medicine hepatotoxicity*. Barcelona: Parmanyer Publications, 125p.
- **Lauber, K., Wagner, G., and Gyax, A.** (2012). *Flora Helvetica*. Berne, Stuttgart, Vienne : Haupt Verlag, p 122.
- **Lauwerys, R.R.** (2003). *Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles*. Paris : Masson, 961p.
- **Loyral, G., Vierling, E.** (2007). *Microbiologie et toxicologie des aliments*. Aquitaine: doin, 245p.
- **Manske, R.H.F.** (1973). *The alkaloids*. London: Elsevier, 544p.
- **Marshall, W.J., Bangert, S.K.** (2004). *Clinical chemistry*, Edinburgh: Mosby, 810p.
- **Mohan, L.V., Mothes, K., Engelbrecht, L., and Schroter, H.B.** (1965). Biosynthesis of damascenine in *Nigella damascena L.* *Nature*, 12, pp 1421-1428.

- **Moretti, A., D'Antuono, L.F., and Elementi, S.** (2004). Essential oils of *Nigella sativa* L. and *Nigella damascena* L. Seed. *Journal of Essential Oil Research*. 16, pp182-183.
- **Mumoli, N., Cei, M., and Cosimi, A.** (2006). Drug related hepatotoxicity. *N.Engl.J.Med*, 354(20), pp 2191-2193.
- **Munsche, D., Mothes, K.** (1965). Fütterungsversuche zur biosynthese des damascenins in *Nigella damascena* L. *Phytochemistry*, 4, pp 705-712.
- **Navarro, V.J., Senior, J.R.** (2006). Drug-related hepatotoxicity. *N Engl J Med*. 354(7), pp 731-739.
- **Nguyen, H.N., Bourouina, R.** (2008). *Manuel d'anatomie et de physiologie*. France: LAMARRE, pp 55p.
- **Nickavar, B., Amin, G., and Parhami, S.** (2003). Volatile constituents of the fruit and leaf oils of *Thuja orientalis* L. grown in Iran. *Z Naturforsch*. 58 (3-4), pp171-172.
- **Nyblom, H., Berggren, U., Balldin, J and Olsson, R.** (2002). High AST/ALT ratio may indicate advanced alcoholic liver disease rather than heavy drinking Alcohol. *Oxford journals*. 39(4), pp 336–339.
- **Poortmans,J.R.,Boisseau,N.** (2003). *Biochimie des activités physiques*. Bruxelles : De boeck : pp 165-168.
- **Prchal, J.T., Gregg, X.T.** (2005). Red cell enzymes. *ASH Education Program Book*, (1), p19-23.
- **Raven, H. P., Evert, R.F., and Eichhorn, S.E.** (2000). *Biologie végétale*. Paris: de boec, 32p.
- **Robin, M.A., Le Roy, M., Descatoire, V., and Pessayre, D.** (1997). Plasma membrane cytochromes 450 as neoantigens and autoimmune targets in drug-induced hepatitis. *J Hepatol*, 26(1), pp 23-30.

- **Sabetghadam ,A ., Ramanathan,S ., Sasidharan,S ., Mansor S.M . (2013).** Subchronic exposure to mitragynine, the principal alkaloid of *Mitragyna speciosa*, in rats, *Journal of ethnopharmacology*. 146(3), pp 815–823.
- **Schmauder,H. P.,Doebel,P. (1991).** *In vitro* culture, regeneration, and the formation of secondary metabolites. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* , 15, 311-336.
- **Sherwood, L. (2006).** *Physiologie humaine*. Bruxelles: de boeck, 405p.
- **Stellman, J.M. (2000).** *Encyclopédie de sécurité et de santé au travail*. Genève, pp 49-55p.
- **Stengel, B., Simon, P. (1997).** *Néphrotoxicité d'origine iatrogène, professionnelle ou environnementale: Insuffisance rénale chronique*. inserm, p 141-146.
- **Stevens, A., Lowe, J. (1997).** *Histologie humaine*. Paris : De Boeck, pp 99-105.
- **Stickel, F., Patsenker, E., and Schuppan, D. (2005).** Herbal hepatotoxicity. *J Hepatol*. 43, pp 901-910.
- **Tacherfiout, M. (2008).** Caractérisation physico-chimique et profils des protéines de réserve des graines de *Nigelle sativa* et *Nigella damascena*. Mémoire de magister. Université de Bejaia.
- **Tanis, H., Aygan, A., and Digrak, M. (2009).** Antimicrobial Activity of Four *Nigella* Species Grown in Southern Turkey. *International Journal of Agriculture and biology*. 11(6): pp 771–774.
- **Teuscher, E., Anton, R., and Lobstein, A. (2005).** *Plantes aromatiques*. Paris : Tec and Doc Lavoisier, 522p.
- **Toma, C., Hanganu, D., Olah, N.K ., and Popescu, H. (2003).** The determination of rutoside From *Nigella damascena L.* (Ranunculaceae) by TLC-densitometry. *Ovidius University Annals of Medical Science-Pharmacy*, 1(2), pp 57-60.

- **Tramer, F., Da Rose, T., and Passamonti, S.** (2013). Screening of fullerene toxicity by hemolysis assay . In *Nanotoxicity*. pp 203-213.
- **Valensi, F.** (2005). Morphologie des cellules sanguines normales. *EMC-Hématologie*, 2(1), pp 1-13.
- **Van Pelt, F., Straub, P., and Manns, M.P.** (1995). *Molecular basis of drug-induced immunological liver injury*. *Semin Liver Dis* .15, pp 283-300.
- **Vaubourdolle, M.** (2007). *Toxicologie, Sciences mathématiques, Physiques et Chimiques*. Paris: Wolters Kluwer SA, pp136-139.
- **Wajcman, H.** (2005). Hémoglobines : structure et fonction. Paris : *EMC-Hématologie*, 2(3), pp 145-157.
- **William, G.H.** (2003). *Physiologie végétale*. Bruxelles: De Boeck Université, 268p.
- **Yoshimitsu, H., Nishida, M., Okawa, M., and Nohara, T.** (2007). *Chemical and pharmaceutical bulletin*. (55)3, pp 488-491.
- **Zurlo, J.** (2000). *Encyclopédie de sécurité et de santé au travail : Tests de toxicité in vitro*. Genève, pp 33-50.