

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

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

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

Magister

En Biologie Moléculaire

Thème

Interaction de la damascenine, un alcaloïde de
***Nigella damascena*, avec l'albumine sérique**
humaine

Présenté par :
M^r BOUGUEZZA Yacine

Devant le jury le :

Présidente: M^{me} BENABDESSALEM F.

Promoteur : M^f LEGSEIR B.

Co-promoteur: M^{lle} KHETTAL B.

Examineurs : M^{me} ZAIDI R.

M^f BELHAMEL K.

Invitée : M^{me} AMROUCHE W.

M.C-A, Université de Bejaia.

Pr., Université d'Annaba.

M.C-B, Université de Bejaia.

M.C-A, Université de Bejaia.

M.C-A, Université de Bejaia.

M.A-A, Université de Bejaia.

Promotion : 2008-2009

Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier Dieu le tout-puissant, de m'avoir réalisé le rêve de la recherche académique que j'ai espéré depuis mon enfance.

Mes vifs remerciements, mes profonds respects et ma reconnaissance à mon promoteur Dr LEGSEIR Belgacem et à ma Co-promotrice Dr KHETTAL Bachra pour m'avoir proposé ce thème, offert la méthodologie fondamentale nécessaire à la réalisation de ce travail de recherche, leurs encouragements et leurs conseils.

Je remercie également le Dr BENABDESSALEM Fadila pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider ce jury et les Dr ZAIDI Rachida et BELHAMEL Kamel qui ont accepté d'examiner mon travail.

Je remercie Mr et Mme AMROUCHE, Mr MANCOU pour leur présence spirituelle et pour leurs aides et exprime ma reconnaissance à Mr ZAIDI, Mr HAMMOUM et Mr MAKHLOUF.

Un grand merci à Mr le Directeur et les techniciens du laboratoire de contrôle de qualité de sétif pour leurs aides et leurs conseils.

Une pensée à tous mes amis de promotion pour leur soutien morale.

Dédicaces

J'adresse, surtout, ma plus profonde gratitude et tout mon amour à ma mère, mon père et, qui ont su me faire confiance et me soutenir en toutes circonstances au cours de toutes mes années d'études, c'est avec émotion que je leurs exprime toute mon affection, mon admiration et mon profond respect.

Mes dédicaces sont adressées à mes frères, mes sœurs et au Dr Ferrani Nassim que je compte parmi eux.

Mes dédicaces sont adressées à Mr Derradji Soualem, le penseur algérien qui m'a donné le goût de la science.

Mes dédicaces sont adressées à Messaoud Belmouhoub et Bribi Norredine.

A tous ceux qui me sont chers.

<i>Liste des abréviations</i>	<i>i</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>ii</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>v</i>

Introduction	01
---------------------------	-----------

Partie I : Synthèse bibliographique

I- Les alcaloïdes des nigelles	03
I.1- Les nigelles: cas de <i>Nigella damascena</i>	03
I.1.1- Généralités	03
I.1.2- <i>Nigella damascena</i>	05
I.1.2.1- Description botanique	05
I.1.2.2- Composition chimique	06
I.1.2.3- Activité pharmacologiques	06
I.2- Les alcaloïdes du genre <i>Nigella</i>	07
I.2.1- Généralités sur les alcaloïdes	07
I.2.2- Alcaloïdes des nigelles	10
I.3- Rôles biologiques et effets pharmacologiques des alcaloïdes	12
II- La sérum albumine humaine (SAH)	13
II.1- Généralités	13
II.2- Propriétés physico-chimiques	15
II.3- Structure et séquence de la SAH	18
III- Interaction sérum albumine humaine- alcaloïdes	
III.1- Diversité des ligands de la SAH	24
III.2- Topologie des sites de liaisons de la SAH	26
III.2.1- Site de liaison I	26

III.2.2- Site de liaison II.....	26
III.3- Interaction SAH-alcaloïde.....	28
III.3.1- Type d'interaction.....	28
III.3.2- Conséquences dynamiques sur les Protéines complexées.....	29
III.3.3- Paramètres influençant l'interaction SAH-ligands.....	30
III.4-Méthodes d'étude de l'interaction SAH-alcaloïdes.....	31
III.4.1- Spectroscopie d'absorption UV-visible.....	31
III.4.2- Spectroscopie de fluorescence.....	32
III.4.3- Infrarouge transformée de Fourier.....	33
III.4.4- Dichroïsme circulaire.....	34
III.4.5- Calorimétrie de titration isothermique.....	34
III.4.6- Autres méthodes.....	36

Partie II : Travail expérimental

I- Matériel et méthodes	38
I.1- Le matériel végétal : graine de <i>Nigella damascena</i>	38
I.2- Extraction et caractérisation des alcaloïdes de <i>Nigella damascena</i>	38
I.2.1- Extraction des alcaloïdes totaux.....	38
I.2.2- Analyse par spectrophotométrie UV/Visible.....	39
I.2.3- Analyse par chromatographie sur couche mince.....	39
I.2.4- Analyse par RP-HPLC.....	40
I.2.5- Isolement et propriétés d'absorbance de la damascenine.....	40
I.3- Etude de l'interaction SAH-damascenine.....	40
I.3.1- Préparation des solutions protéique et alcaloïdique.....	40
I.3.2- Mise en évidence de l'interaction SAH-damascenine.....	41
I.3.3- Etude de l'effet du pH et des sels	41
I.3.4- Etude de l'effet de la température	42
II- Résultats et discussions	43
II.1- Caractérisation partielle des alcaloïdes de <i>Nigella damascena</i>	43
II.2- Propriétés d'absorbance de la SAH.....	45
II.2.1- Effet du pH	45
II.2.2- Effet du DMSO.....	46
II.3- Caractérisation de l'interaction SAH-damascenine	48
II.3.1- Stabilité de l'interaction SAH-damascenine.....	48
II.3.2- Effet de la concentration de la damascenine.....	49
II.3.3- Effet de la concentration de la SAH.....	51
II.3.4- Effet du pH	52
II.3.5- Effet des ions.....	54
II.4- Cinétique et thermodynamique de la liaison SAH-damascenine.....	57
II.4.1- Cinétique à l'équilibre	57

II.4.2- Thermodynamique et forces de liaison	59
<i>Conclusion</i>	61
<i>Références bibliographiques</i>	
<i>Annexe</i>	
<i>Glossaire</i>	

- **CCM** : Chromatographie sur couche mince
- **DMSO** : Diméthylsulfoxyde
- **DO** : Densité optique
- **DC** : Dichroïsme circulaire
- **IRTF** : Infrarouge à transformée de Fourier
- **ITC** : Isotherme de titration calorimétrique
- **RPE** : Résonance paramagnétique électronique
- **RMN** : Résonance magnétique nucléaire
- **SAH** : Sérum albumine humaine
- **SAB** : Sérum albumine bovine
- **UV** : Ultra-violet

Figure 1: Les différents organes de <i>Nigella damascena</i> et de <i>Nigella sativa</i>	05
Figure 2: Principaux hétérocycle des alcaloïdes.....	08
Figure 3: Origine biosynthétiques des alcaloïdes.....	09
Figure 4: Structure des alcaloïdes de type dolabellane diterpène.....	10
Figure 5: Structure chimique des alcaloïdes à noyau imidazole (a) et des alcaloïdes isoquinoléique (b) du genre <i>Nigella</i>	11
Figure 6: Structure chimique de la damascenine.....	11
Figure 7 : Schéma représentant les fonctions de transport de la SAH.....	13
Figure 8 : Localisation et organisation du gène de la SAH.....	14
Figure 9 : Schéma représentant le transit cellulaire de la SAH lors de sa biosynthèse dans les cellules hépatiques.....	15
Figure 10: Schéma à l'équilibre de la transition de différentes conformations isomériques de la SAH.....	17
Figure 11: Formes transitoires isomériques de la SAH. (a) Configuration de l'isomère F. (b) Configuration de l'isomère E	18
Figure 12: Séquence primaire de la SAH.....	19
Figure 13: Structure tridimensionnelle de la SAH à pH 7.....	20
Figure 14: Structure et organisation des domaines des I, II et III de la SAH.....	21
Figure 15: Schéma montrant les sites de liaison à la SAH de divers ligands.....	25
Figure 16: Schéma montrant l'effet du pH sur l'interaction des ions chlorure avec la SAH.....	30
Figure 17 : Isotherme de titration calorimétrique.....	35
Figure 18: Graines de <i>Nigella damascena</i>	38
Figure 19: Profil HPLC des alcaloïdes de <i>Nigella damascena</i>	44
Figure 20: Spectre d'absorption UV des alcaloïdes de <i>Nigella damascena</i> solubilisés dans l'éthanol.....	44
Figure 21: Spectre d'absorption de la SAH solubilisée dans du tampon phosphate 0,1M, pH 7 (1,36 mg/ml).....	45

Figure 22 : Absorbance à 290 nm de la SAH (1,36 mg/ml) dans un tampon phosphate 0,1M en fonctions en fonctions du pH46

Figure 23: Spectre d'absorption de la SAH (1,36 mg/ml) dans un tampon phosphate (0,1M, PH 7) contenant 10% de DMSO après 24H.....47

Figure 24 : Spectre différentiel entre la SAH native (20µM) et la SAH en présence de 4,54µg /ml et 34µg/ml de damascenine.....48

Figure 25 : Spectres d'absorption de la SAH (1,36 mg/ml) dans du tampon phosphate 0,1M et 10% de DMSO en présence de 4,54µg/ml et de 34 µg/ml de damascenine après 5min, 2H et 24H d'incubation à température ambiante et à pH 7.....49

Figure 26: Spectre d'absorption du complexe SAH-damascenine (SAH 1,36 mg/ml dans un tampon phosphate (0,1M, PH 7) en présence des différentes concentrations de la damascenine et contiennent 10% de DMSO.....49

Figure 27: Spectre d'absorbance de la damascenine (20µg/ml= 103µM) en fonctions de la concentration de la SAH (0- 45µM) dans du tampon phosphate de potassium 0,1M, pH7 contenant 10% de DMSO. A température ambiante 20±2°C.....51

Figure 28: Absorbance de la damascenine (20µg/ml) à 320 nm en fonctions de la concentration de la SAH à 20±2°C.....52

Figure 29: Absorbance du complexe SAH-damascenine à 320 nm en fonction du pH dans du tampon phosphate 0,1M. La concentration de SAH est 1,36 mg/ml et celle de la damascenine 40µg/ml.....53

Figure 30: Variation d'absorbance de la damascenine (40µg/ml) à différentes concentrations de la SAH en absence (trait rouge) et en présence de NaCl (trait bleu), Na₂SO₄ (trait rose) et du KI (trait jaune) à concentration de 0,15M.....54

Figure 31: Variation de d'absorbance à 320 nm de la damascenine (40µg/ml) solubilisée dans du tampon phosphate de potassium 0,1M, pH 7 contenant 10% de DMSO en présence de différentes concentrations de NaCl (trait bleu), Na₂SO₄ (trait rose) ou KI (trait jaune).....56

Figure 32: Variation de l'absorbance à 320 nm de la damascenine à différentes concentrations de la SAH en fonction de la températures.....58

Figure 33 : Représentation graphique de Van't Hoff de $\text{Ln}K_A$ en fonction de $1/T$
.....61

Tableau I : Classification des Nigelles.....	03
Tableau II : Effets physiologiques de quelques alcaloïdes.....	12
Tableau III : Quelques propriétés physicochimiques de la SAH	16
Tableau IV : Certains composés endogènes transportés par la SAH.....	24
Tableau V : Constantes de dissociations apparentes et variations de l'énergie libre de Gibbs de la liaison damascenine-SAH à différentes températures	59

Introduction

En raison de leur grand potentiel thérapeutique, les métabolites secondaires des plantes ; polyphénols, flavonoïdes, alcaloïdes, ...etc, ont reçus les dernières décennies une très grande attention et font l'objet de nombreuses études d'identification et de caractérisation structurale, fonctionnelle et pharmacologique. Il a été démontré que l'activité pharmacologique de ces substances bioactives est étroitement liée à leur concentration libre dans le sang. Par conséquent, l'interaction de ces substances et leurs métabolites secondaires avec les protéines plasmatiques de transport (albumine, α -glycoprotéines...) est pharmacocinétiquement très importante (Otagiri, 2005 ; Ying *et al.*, 2005 ; Yan-Qing *et al.*, 2007). En effet, ces interactions peuvent affecter la distribution des drogues dans l'organisme, leur taux métabolique ainsi que leur excrétion (Heinz *et al.*, 2001) régissant ainsi l'efficacité d'action et la toxicité de ces substances.

La sérum albumine humaine constitue la protéine la plus abondante du sang dont elle constitue 60% de la masse totale. Elle est d'une importance capitale dans le transport aussi bien des substances endogènes actives et des nutriments vers et via les cellules à travers le sang (Dockal *et al.*, 1999) que des substances exogènes actives. L'étude de l'interaction des drogues avec la sérum albumine revêt donc une importance capitale pour la compréhension de leurs actions au niveau moléculaire et cellulaire.

Nigella damascena est une plante annuelle herbacée qui pousse dans les zones tempérées du moyen orient et d'Europe (Agradi *et al.*, 2001). Bien qu'elle soit, surtout, utilisée comme plante ornementale (Toma *et al.*, 2003), elle est actuellement considéré comme une plante médicinale en raison de la richesse de sa graine en métabolites secondaires responsables de nombreux effets thérapeutiques. L'étude des propriétés pharmacologiques des extraits de *Nigella damascena* a montré que la graine de cette plante présente des effets analgésique et diurétique (Fico et Tomè, 1998a), antibactériens contre *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* (Fico *et al.*, 2004), antiparasitaire contre la leishmaniose (Toma *et al.*, 2007) et une activité

œstrogénique (Agradi *et al.*, 2001 ; Agradi *et al.*, 2002). Ces effets biologiques peuvent être en partie ou en totalité liés à la présence de l'alcaloïde majoritaire, la damascenine qui représente 0,7% de la masse totale de la graine (Mohan, 1960).

L'étude de l'interaction de la damascenine avec la sérum albumine humaine, *in vitro*, amène à des informations importantes sur l'action de cette drogue et donc d'en déduire son efficacité métabolique *in vivo*. Dans cette thématique se situe notre travail dont l'objectif immédiat est de caractériser et d'évaluer l'interaction de la damascenine avec la SAH. Pour cela, nous avons effectué le travail suivant :

- Extraction des alcaloïdes totaux et de la damascenine.
- Caractérisation partielle de ces alcaloïdes par HPLC, CCM, Absorbance UV-visible.
- Caractérisation de l'interaction damascenine-SAH et estimation de la cinétique et la thermodynamique de cette interaction par spectrophotométrie d'absorbance.

Partie I :

Synthèse bibliographique

I- Les alcaloïdes des nigelles

I.1- Les nigelles : cas d'étude *Nigella damascena*

I.1.1- Généralités

Les **nigelles** dicotylédones (Palese *et al.*, 1990), sont des plantes herbacées au feuillage finement découpé, de la famille des Renonculacées, appartenant au genre *Nigella* (tableau I), du latin « *Nigella* » lui-même de « *niger* » signifiant noir en référence à la couleur des graines des espèces de ce genre (Palese *et al.*, 1990 ; Guignard., 2001). Les nigelles sont des plantes annuelles à courte demi-vie et à court cycle de régénération. Ce sont des plantes typiques des sols naturels semi-arides. Il en existe une vingtaine d'espèces, *Nigella sativa* , *Nigella damascena* , *Nigella arvensis*, *Nigella integrifolia*, *Nigella nigellastrum*, *Nigella gallica*, *Nigella glandulifera*, *Nigella Hispanica*, *Nigella Orientalis*... (Andreas *et al.*, 2005), toutes originaires d'Eurasie (Nickavar *et al.*, 2003 ; Tian *et al.*, 2006).

Tableau I : Classification des Nigelles (Guignard, 2001).

Rang	Nomenclature
Règne	Végétale
Sous règne	Cormophyte
Supra embranchement	Rhizophyte
Embranchement	Spermaphyte
Sous embranchement	Angiosperme
Classe	Eudicotylédone
Sous classe	Audicots archaïques
Ordre	Ranunculales
Famille	Renonculacées
Sous famille	Helloboroidées
Genre	<i>Nigella</i>
Espèce	<i>N. sativa</i> , <i>N. damascena</i> , <i>N. Arvensis</i> , <i>N. Hispanica</i> , <i>N. Orientalis</i> ...

Les nigelles, particulièrement *Nigella sativa*, sont connues depuis l'époque de l'Égypte des pharaons. Les anciennes civilisations les utilisaient comme traitement contre la migraine, la toux, les algies dentaires, la congestion nasale, des affections hépatiques et digestives, et pour combattre les vers intestinaux et contre les piqûres de scorpions. Elles ont été aussi utilisées dans le traitement de certaines épidémies comme le choléra (Salem, 2005 ; Ghedira, 2006).

Les pays du bassin méditerranéen, principalement le Maroc, l'Algérie, l'Égypte et la Turquie utilisent fortement la graine de *Nigella*, notamment celle de *Nigella sativa* qui est souvent confondue avec la nigelle de Damas ; *Nigella damascena*, dans la médecine traditionnelle comme étant carminative, diurétique, fortifiante, antirhumatismale et antimigraineuse. Elle est également utilisée contre le rhume, la grippe, la fièvre, les sinusites, l'asthme, les hémorroïdes, les affections pulmonaires et les algies dentaires. A faible dose, elle est préconisée comme galactagogue, vermifuge, emménagogue, antipyrétique et antivenimeuse. Par voie locale, elle est employée dans le traitement des verrues, des cors, du vitiligo, des dartres et de la paralysie faciale. En infusion, elle est indiquée dans les nausées, les gastralgies, les vomissements et les coliques. Ecrasées dans l'huile, les graines sont employées comme liniment contre les rhumatismes et elles seraient efficaces contre la constipation et les céphalées. L'huile des graines aurait une action protectrice contre les bronchospasmes. Elle serait antitussive, broncho-dilatatrice, expectorante, anti-hypertensive, diaphorétique, stomachique. En friction, l'huile de la graine est préconisée contre les spasmes musculaires et la sciatique (Ghedira, 2006).

I.1.2- *Nigella damascena*

I.1.2.1- Description botanique

Nigella damascena, plante ornementale (Toma *et al.*, 2003), est une plante annuelle herbacée (figure 1) qui pousse dans les zones tempérées du moyen orient et d'Europe (Agradi *et al.*, 2001). Sa tige est glabre de 30cm, striée, feuillée et rameuse dans sa partie supérieure. Ses feuilles sont alternées sessiles et découpées. Ses fleurs, de couleur bleue, sont grandes entourées par une collerette feuillée et multifide. Ses capsules sont lisses et forment par leur soudure complète un fruit renflé, presque globuleux ou ovoïde (Diane *et al.*, 2007). Les graines de couleur noire sont ovoïdes aplanies, à trois faces (Palese *et al.*, 1990) et aromatiques (Agradi *et al.*, 2001).



Figure 1: Les différents organes de *Nigella damascena* (à droite) et de *Nigella sativa* (à gauche) (Andreas *et al.*, 2005).

I.1.2.2- Composition chimique de *Nigella damascena*

Les graines de *Nigella damascena* sont très riches en huiles fixes. Le taux des acides gras totaux contenus dans l'huile est de 97% tandis que le pourcentage des acides gras libres s'élève à 30% (Mohan *et al.*, 1960). L'acide linoléique est l'acide gras le plus abondant (47.02%). (Kökdil *et al.*, 2005).

Les huiles essentielles représentent 0.5% de la masse totale de la graine. Elles sont composées uniquement de sesquiterpène (100%) ou de monoterpènes représentant plus de 90%. Le composant majoritaire est le β -Elemene qui représente 73.2% (Moretti *et al.*, 2004).

Les graines de *Nigella damascena* contiennent plusieurs composés phénoliques tel que : le 3,4-dihydroxy- β -phénethyl alcool, acide dihydroxyphénylacétique et l'acide dihydroxyphénylacétique méthyle ester (Agradi *et al.*, 2001), le p-coumaric, l'acide caféique, le kaempferol et le kaempferol-3-O-glucopyranoside, et le 1-O-(2, 4-dihydroxy) phénylacétyle glycérol (Fico *et al.*, 2001 ; Fico *et al.*, 2004).

I.1.2.3- Activités biologiques et propriétés pharmacologiques

Les graines de *Nigella* sont utilisées contre les ulcères, les maladies pulmonaires, et comme agent carminatif, diurétique et vermifuge, elles sont connues aussi comme stimulateur de lactation depuis le moyen âge, ces effets peuvent être dus aux huiles essentielles et aux saponines (Brückner, 1993 ; Fico *et al.*, 2001). Elles sont utilisées aussi comme des antidotes pour traiter les morsures de serpents et des piqûres de scorpions (Andreas *et al.*, 2005). Certains auteurs attribuent à la graine de *Nigella damascena* le rôle analgésique et diurétique (Fico et Tomè, 1998a), des effets anti-bactériens contre *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. (Fico *et al.*, 2004), anti-parasitaire contre la leishmaniose (Toma *et al.*, 2007) et une activité œstrogénique (Agradi *et al.*, 2001 ; Agradi *et al.*, 2002).

L'huile fixe des graines de *Nigella damascena* est responsable d'un important effet analgésique dû à la présence d'un principe opioïde présent dans cette huile.

Elle inhibe la lipoperoxydation non enzymatique et un effet piègeur de radicaux libres (Teuscher *et al.*, 2005).

I.2- Les alcaloïdes du genre *Nigella*

I.2.1- Généralités sur les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés organiques d'origine naturelle (le plus souvent végétale), azotés, plus ou moins basiques, de distribution restreinte et doués, à faibles doses, de propriétés pharmacologiques marquées. Leur atome d'azote est inclus dans un système hétérocyclique. Ils existent à l'état de sels et l'on peut ajouter qu'ils sont biosynthétiquement formés à partir d'un acide aminé (Bruneton, 1999). Ces éléments caractérisent ce que l'on peut appeler les alcaloïdes vrais. Ces alcaloïdes constituent un groupe très hétérogène possédant quelques propriétés physicochimiques communes (Guignard, 1979).

Par ailleurs on distingue aussi certains produits naturels contenant un atome d'azote dans leur structure et qui ne sont pas considérés comme des alcaloïdes (Bruneton., 1999 ; Cordell *et al.*, 2001), comme :

- Les Proto alcaloïdes : Constitué de simple amine, les amines Biologiques (Ex : Ephédrine, Mescaline).
- Les Pseudo alcaloïdes : Ils contiennent dans leur structure un atome « N » mais ne dérivent pas d'acide aminé. (Ex. Terminaline, Caféine)

Le terme d'alcaloïde a été introduit par W. Meisner au début du XIX siècle pour désigner des substances naturelles réagissant comme des bases, comme des *alcalis* (l'arabe *al kaly*, la soude et du grec *eidos*, l'aspect). A l'état naturel, ils sont généralement salifiés par des acides organiques (tartrates, malates, aconitates, tiglates....) ou combinés à des tanins (Bruneton, 1999 ; Guignard, 2000).

On les rencontre chez de nombreux végétaux, peu nombreux chez les monocotylédones mais très répandus chez les dicotylédones (Guignard, 1979).

Plus de 12000 structures alcaloïdes sont actuellement connues; ils portent tous la terminaison « ine » (Guignard, 2000) et sont en général classés suivant la nature de leur cycle (Figure 2).

D'une façon générale, la production d'alcaloïdes s'observe dans les tissus en voie de croissance (Guignard, 2000). Leur synthèse a lieu au niveau du réticulum endoplasmique, ils se concentrent ensuite dans la vacuole. Parfois, comme chez les pavots, il s'agit de vacuoles spécialisées en laticifères.

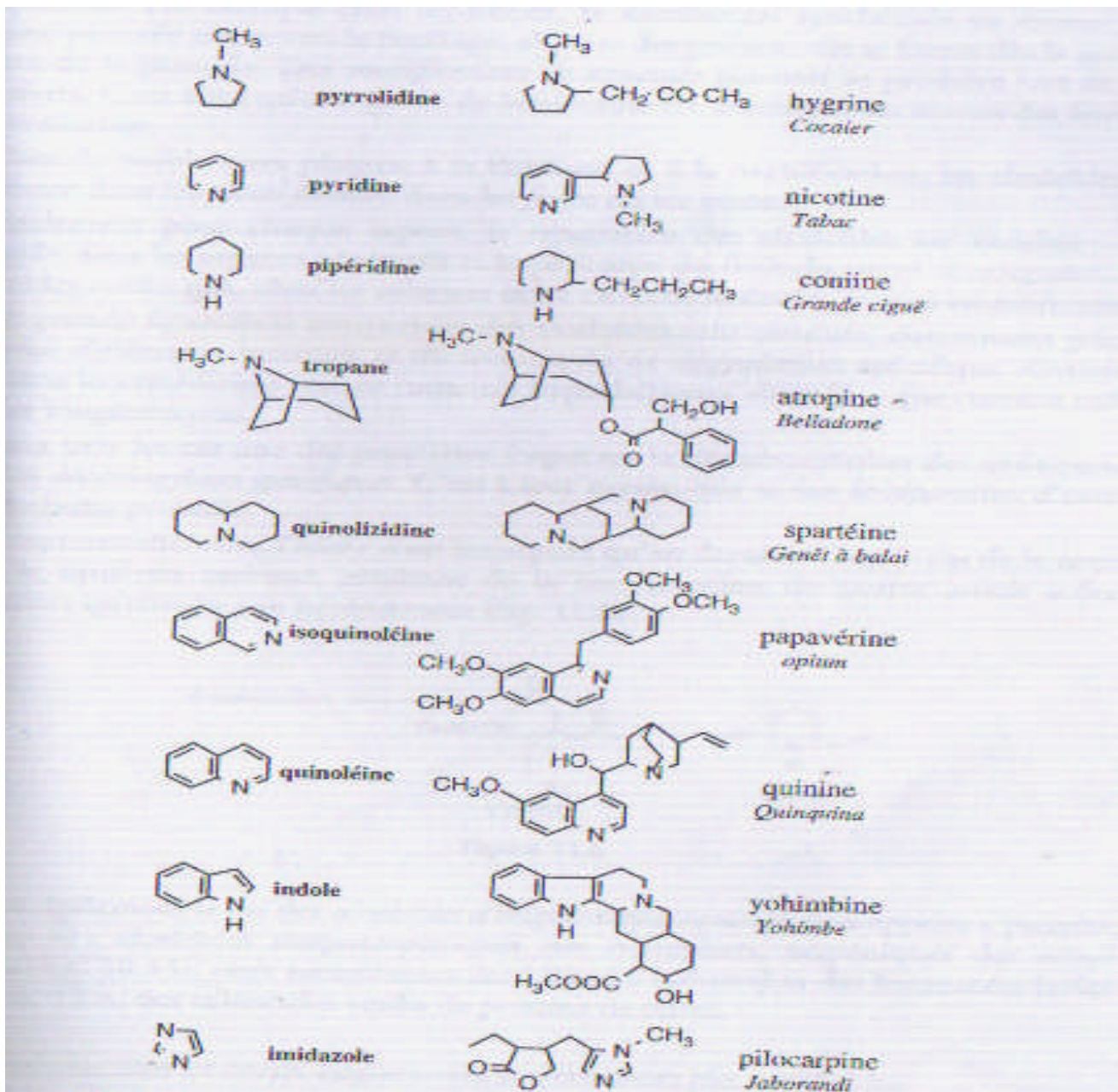


Figure 2: Principaux hétérocycles des alcaloïdes (Guignard, 2000).

Le précurseur des alcaloïdes vrais est un acide aminé : ornithine, lysine, phénylalanine, tyrosine, tryptophane, histidine, acide anthralinique (figure 3). (Bruneton, 1999).

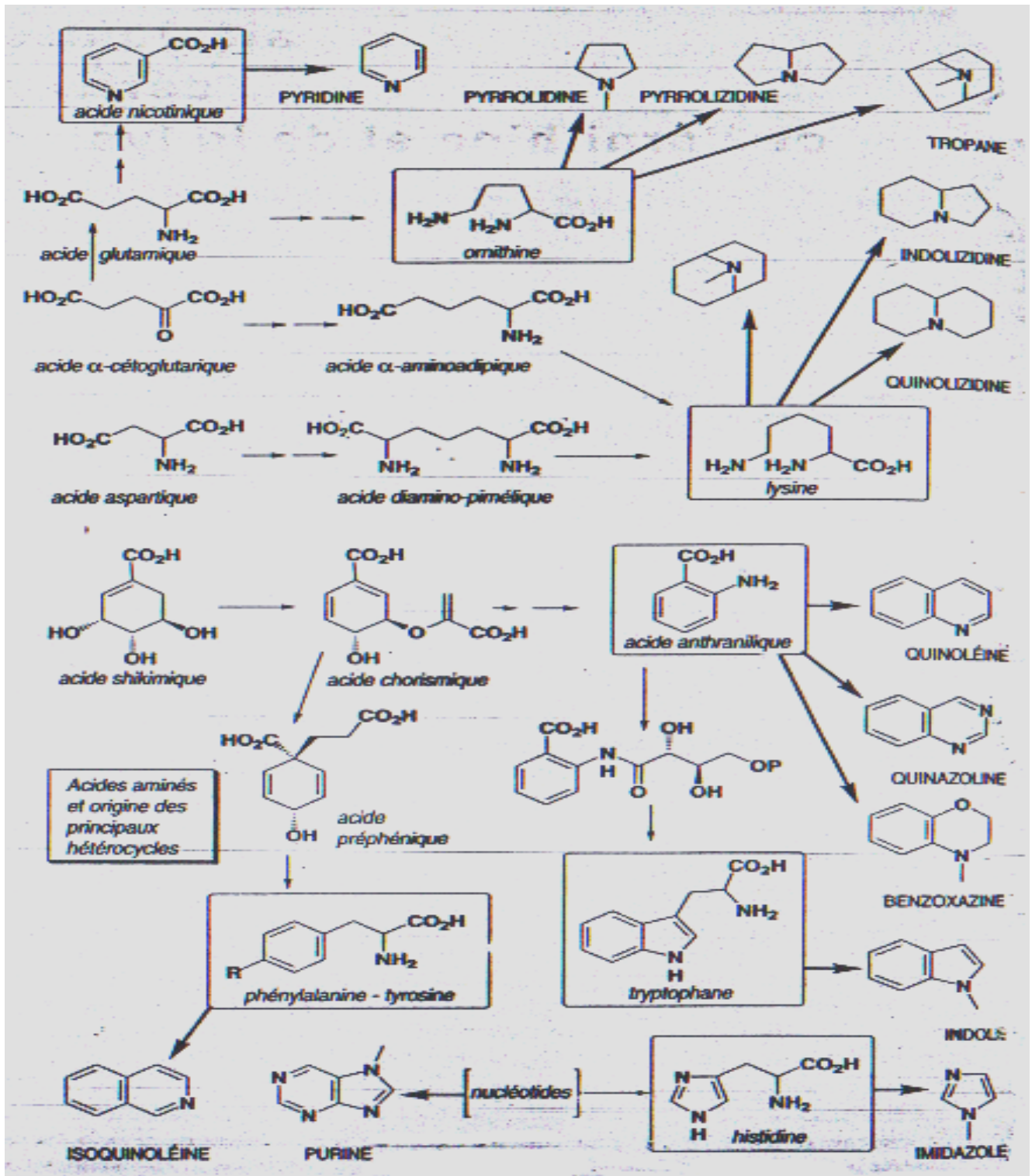


Figure 3: Origine biosynthétique des alcaloïdes (Bruneton, 1999)

I.2.2-Alcaloïdes des nigelles

Les métabolites secondaires majoritaires du genre *Nigella* sont les alcaloïdes diterpéniques (Atta *et al.*, 1992 ; Agradi *et al.*, 2002) qui sont associés à l'activation du métabolisme des lipides (Agradi *et al.*, 2002). Les alcaloïdes les plus abondants de *Nigella sativa* sont les dollabellanes de type diterpéniques, les nigellamines (figure 4) (Morikawa *et al.*, 2004 ; Labib-Salem., 2005 ; Cheikh-Rouhou *et al.*, 2007)

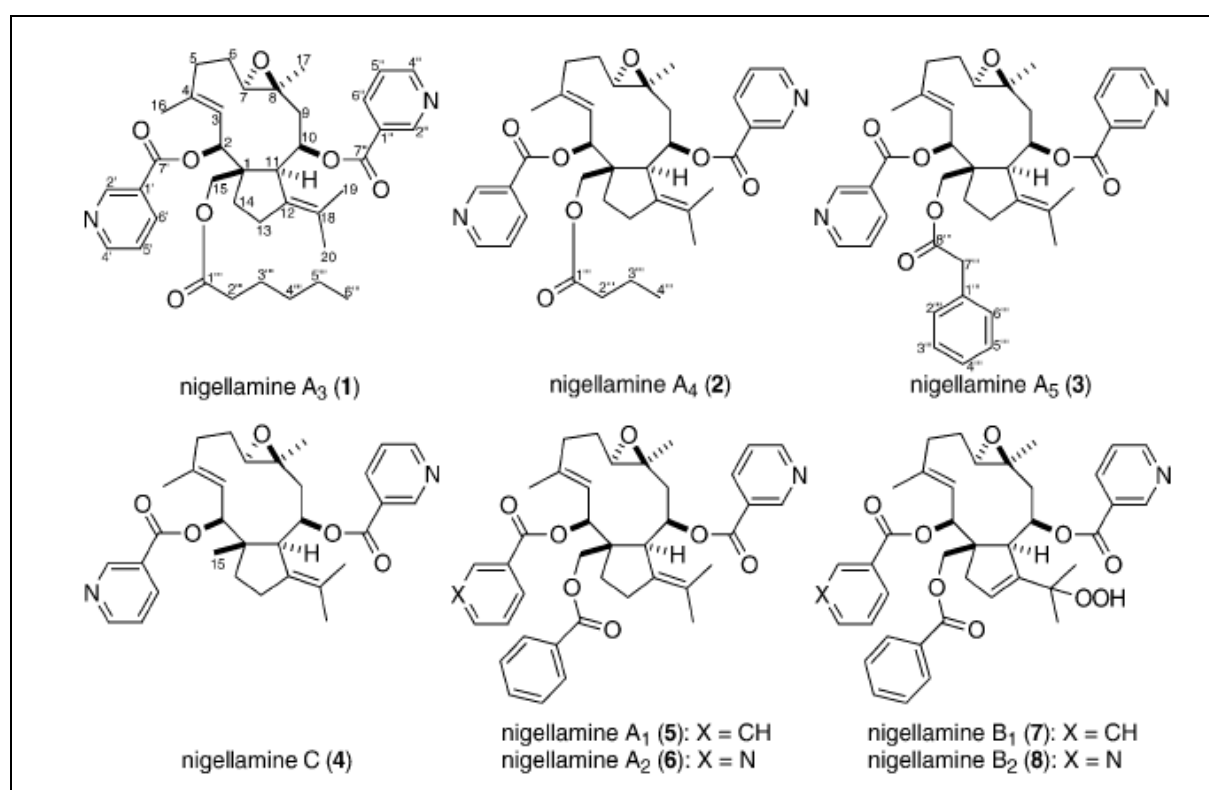


Figure 4: Structure des alcaloïdes de type dollabellanes diterpènes (Morikawa *et al.*, 2004).

Le genre *Nigella* contient aussi des alcaloïdes à noyau imidazole comme la nigellicine, la nigellidine et la nigeplanine (Atta *et al.*, 1985 ; Atta *et al.*, 1995) ainsi que des alcaloïdes de type isoquinoléine tels les nigellimines (Khan, 1999) (figure 5).

La graine de *Nigella damascena* est caractérisée par la présence d'un alcaloïde majoritaire, la damascenine (figure 6) qui représente 0,7% de la masse totale de la graine (Mohan, 1960). Cet alcaloïde est synthétisé à partir de la méthionine via la voie de l'acide chikimique (Munshe et Mothes, 1965).

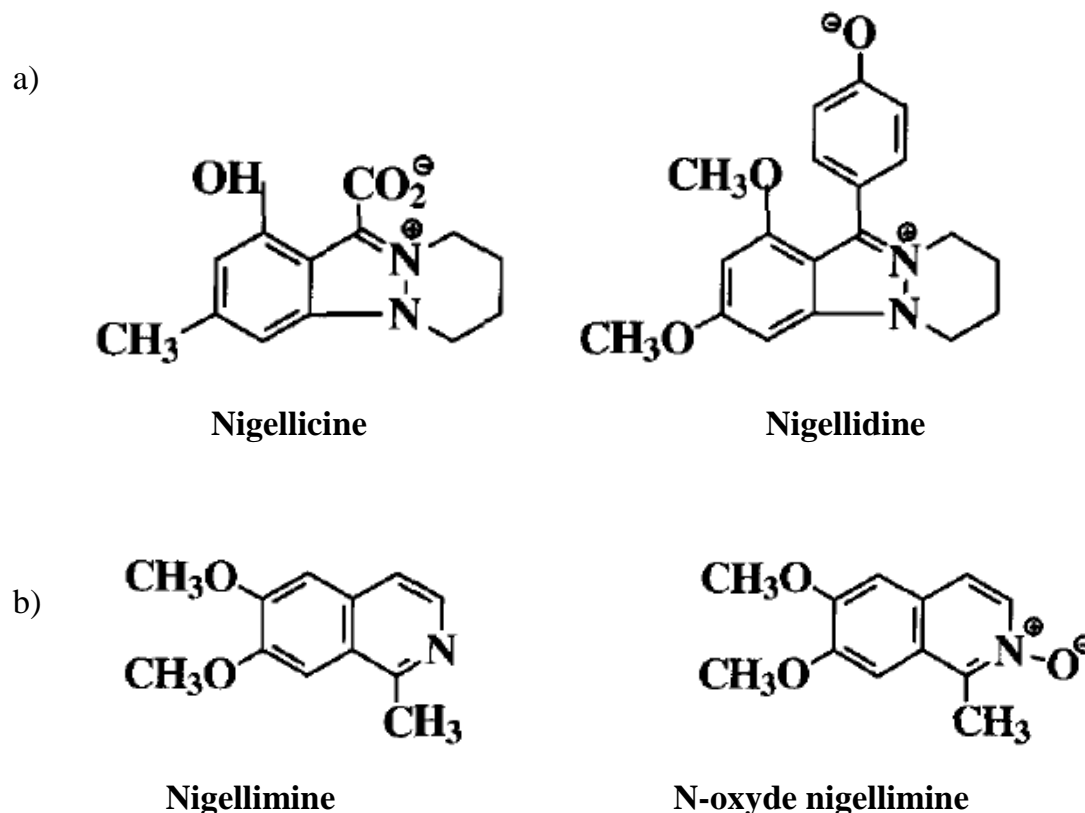


Figure 5: Structure chimique des alcaloïdes à noyau imidazole (a) et des alcaloïdes isoquinoleïque (b) du genre *Nigella*. (Khan., 1999).

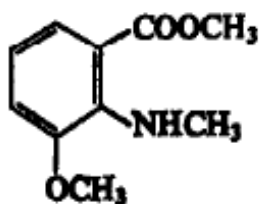


Figure 6: Structure chimique de la damascenine.
(Munshe et Mothes., 1965)

I.3- Rôle biologique et effets pharmacologiques des alcaloïdes

Le rôle biologique des alcaloïdes est essentiellement celui de phagodétérant ; leur amertume et leur toxicité repoussent les herbivores (Guignard, 2000). Si certains auteurs estiment que ce sont des métabolites terminaux, des « déchets » inutilisables, c'est très peu probable : dans plusieurs cas il a été montré qu'ils se comportent comme des métabolites intermédiaires qui pourront jouer le rôle de substances de réserves ou de régulateurs de croissance (Bruneton, 1999). Les alcaloïdes présentent des activités pharmacologiques divers ; antibactérien, Anticancéreux, Stimulant du SNC, Anesthésique, etc. (Marek *et al.*, 2003). Le tableau II présente les effets physiologiques de quelques alcaloïdes.

Tableau II: Effets physiologiques de quelques alcaloïdes (Marek *et al.*, 2003)

Alcaloïdes	Plantes	Effets thérapeutiques
Ajmaline	<i>Rauwolfia serpentina</i>	Antiarythmétique
Atropine	<i>Hyoscyamus niger</i>	Anticholinergique
Caféine	<i>Coffea arabica</i>	Stimulant du SNC
Camptothecine	<i>Camptotheca acuminata</i>	Anticancéreux
Cocaïne	<i>Erythroxylon coca</i>	Anesthésique
Codéine	<i>Papaver somniferum</i>	Antitussif
Coniine	<i>Conium maculatum</i>	Paralyse le nerf moteur
Emétine	<i>Uragoga ipecacuanha</i>	Amoebicide
Morphine	<i>P. somniferum</i>	Narcotique
Nicotine	<i>Nicotiana tabacum</i>	Paralysie respiratoire
Pilocarpine	<i>Pilocarpus jaborandi</i>	Stimulant du SN para S
Quinine	<i>Cinchona officinalis</i>	Antimalaria
Sanguinarine	<i>Eschscholzia californica</i>	Antibactérien
Scopolamine	<i>H.niger</i>	Narcotique puissant
Strychnine	<i>Strychnos nux-vomica</i>	Violent poison tétanique
Vinblastine	<i>Catharanthus roseus</i>	Antinéoplasique

II- Sérum albumine humaine

II.1- Généralités

La sérum albumine humaine (SAH) est la protéine la plus abondante du plasma sanguin. Sa concentration typique est de 5g/100 ml. La demi-vie de la SAH est de 19 jours et son catabolisme, par protéolyse lysosomiale, est ubiquitaire dans tous les tissus. Plusieurs recherches font l'objet d'investigations plus importantes dans le domaine de la pharmacocinétique afin de découvrir ses propriétés physiologiques et pharmacologiques (Otagiri, 2005).

En raison de sa faible viscosité en solution et son affinité pour de nombreux ions et molécules en particulier la molécule d'eau, la SAH assure dans l'organisme plusieurs fonctions biologiques. Elle maintient la pression oncotique (75 à 80%) (Scatchard *et al.*, 1944 ; Pernod, 1986). Elle assure le transport dans le sang de différentes substances ; des substances endogènes tel que les hormones thyroïdiennes, stéroïdiennes, les acides gras libres, certains acides aminés (Cys, Trp), la bilirubine (figure 7) (Peters, 1996) ou des substances exogènes comme les médicaments, les colorants, l'iode.....

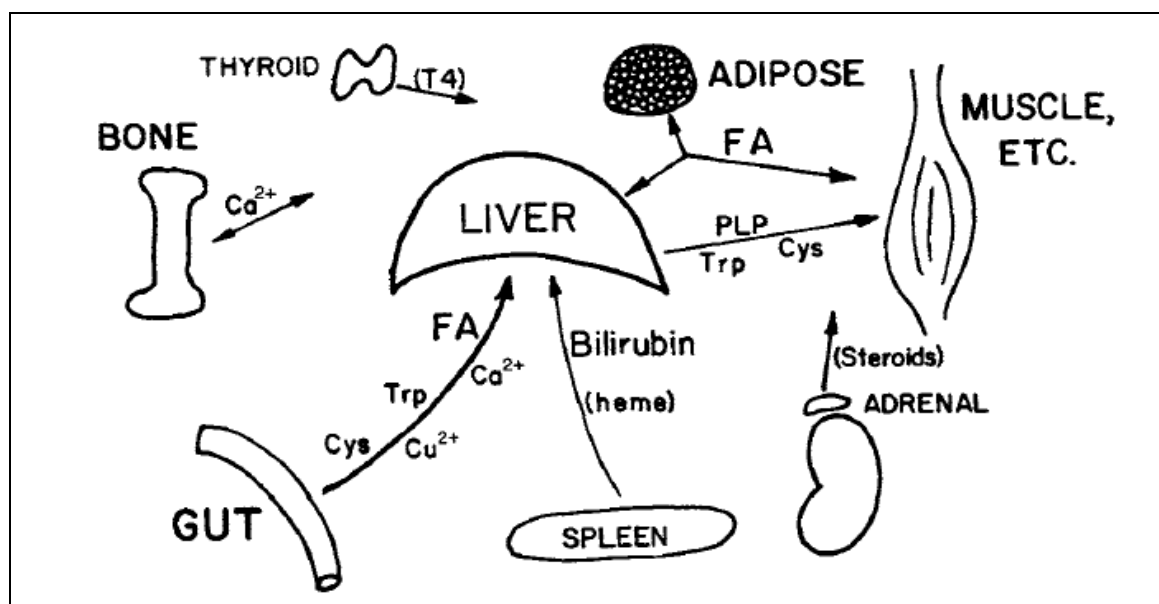


Figure 7 : Schéma représentant les fonctions de transport de la SAH (Peters *et* Reed, 1978).

La SAH, en raison de sa charge globale négative, présente une grande affinité pour différents cations tel que Cu^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} (Brennan *et al.*, 2000).

Le gène de la SAH est localisé sur le bras q11-22 du chromosome 4 (Urano *et al.*, 1984; Minghetti *et al.*, 1996). Il est constitué de 1696 nucléotides organisés en 15 exons et 14 introns (figure 8) (Yunis *et al.*, 1978).

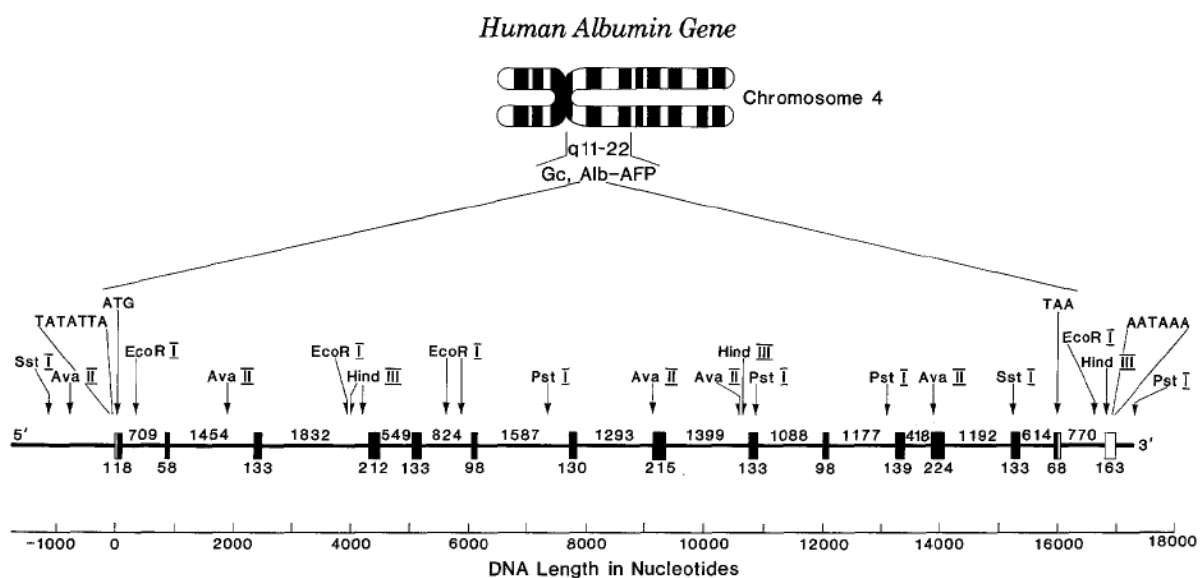


Figure 8 : Localisation et organisation du gène de la SAH (Yunis *et al.*, 1978).

La SAH est synthétisée dans le foie sous forme d'une préproalbumine. Le pré-peptide signal de nature hydrophobe « Met-Lys-Trp-Val-Thr-Phe-Ile-Ser-Leu-Phe-Leu-Phe-Ser-Ser-Ala-Tyr-Ser » est clivé dans RE par une signal peptidase. La pro-albumine résultante sera exportée vers l'appareil de Golgi où les six acides aminés N-terminaux « Arg-Gly-Val-Phe-Arg-Arg » constituant le propeptide seront éliminés par une proalbumine convertase Ca^{2+} -dépendante puis déchargée dans la circulation sanguine (Brennan *et al.*, 1989) (figure 9).

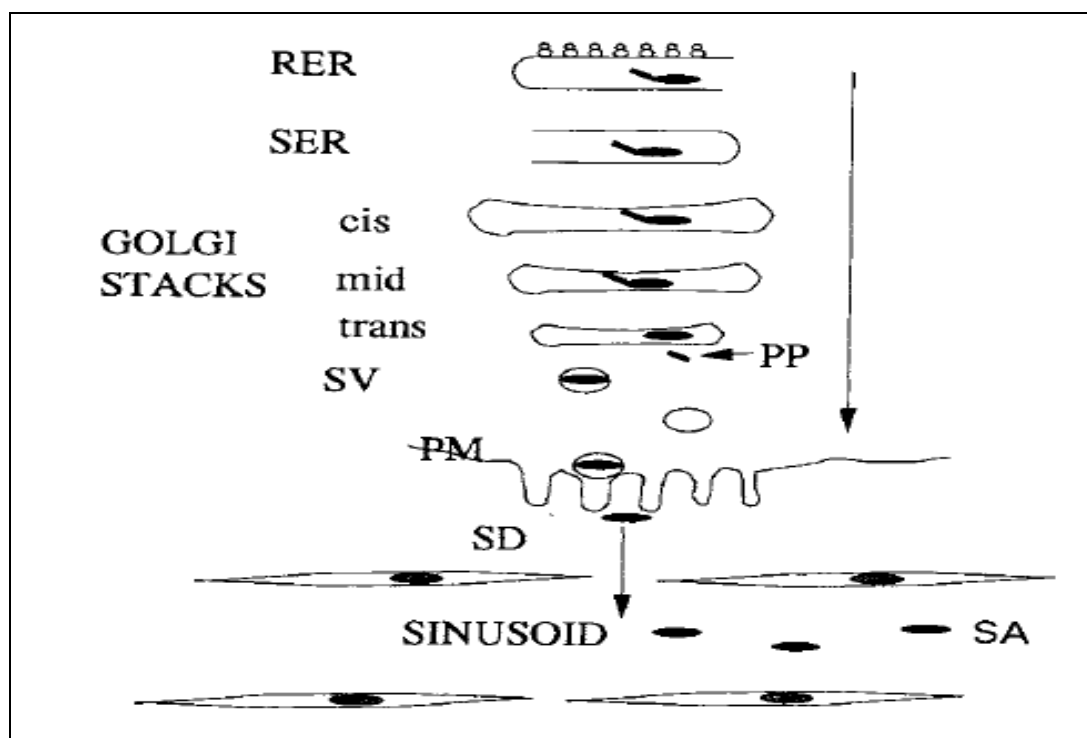


Figure 9 : Schéma représentant le transit cellulaire de la SAH lors de sa biosynthèse dans les cellules hépatiques. (Peters, 1996).

II.2- Propriétés Physico-chimiques

La SAH est une protéine globulaire de 66,5Kd de masse moléculaire qui occupe un volume spécifique de $0,733 \text{ cm}^3/\text{g}$ et est caractérisée par un point isoélectrique de 4,7, une constante de sédimentation de $4,6 \cdot 10^{-13}\text{S}$ et une mobilité électrophorétique à pH 8,6 égale à $-5,9$ (tableau N°III). C'est une protéine non-glycosylée en raison de l'absence de la séquence de N-glycosylation Asn-X-Ser/Thr. Elle ne contient pas de groupement prosthétique et est caractérisée par un pic d'absorbance dans l'UV près de 280 nm, cette absorbance est influencée par le tryptophane par rapport aux autres acides aminés aromatiques. En effet, la SAH contient 31Phe, 19Tyr et 1Trp (Dugaiczuk *et al.*, 1982). En raison de la présence d'un seul résidu Trp dans la séquence de cette protéine, son absorbance est atypiquement basse (0,5-0,7) comparé à 1 pour la plupart des protéines.

Tableau III : Quelques propriétés physicochimiques de la SAH (Peters, 1996).

Caractéristiques	SAH
Masse moléculaire	65 200
Constante de sédimentation $S_{20,w} \cdot 10^{13}$	4,6
Constante de diffusion (D_{20w}) $\text{dcm}^2 \cdot \text{S}^{-1} \cdot 10^7$	6,1
Viscosité intrinsèque (η)	0,04
Dimension (Å°)	80x80x30
Volume spécifique partiel V_{20}	0,733
Point isoélectrique	4,7
Mobilité électrophorétique	-5,9
% d'hélices α	67
% de coudes β	10

La SAH est une protéine thermostable, elle ne présente aucun changement structural jusqu'à 60° C pendant 10 heures. Cependant au-delà de cette température des pertes irréversibles dans la structure des hélices α apparaissent et le taux de structure en hélice α passe de 67 à 44% à 75° C (Clark *et al.*, 1981).

En fonction du pH, La SAH présente de nombreuses conformations natives et stables (figure 10) qui n'induisent pas d'oligomérisation.

A pH entre 4,3 et 8, La SAH se présente sous la forme native N « normale ». La diminution du pH jusqu'à 2,7 induit un changement de conformation rapide (100m/s) et la conformation résultante F « Fast » présente une mobilité électrophorétique plus

rapide que la forme N en raison de sa charge globale nette plus élevée (Aoki et Foster, 1957). La mesure des caractéristiques hydrodynamiques telles que la vitesse de sédimentation, la constante de diffusion, et la viscosité intrinsèque montre que l'isomère F est plus étendu et asymétrique (figure 11a) que celle de la forme N.

	E	⇔	F	⇔	N	⇔	B	⇔	A
pH			2,7		4,3		8		10
Nom:	Expanded		Fast		Normal		Basic		Aged

Figure 10: Schéma à l'équilibre de la transition de différentes conformations isomériques de la SAH

A pH inférieur à 3, apparaît La forme E « Expanded ». Cette forme est complètement allongée à cause des répulsions électrostatiques entre les boucles des domaines et des sous domaines de la SAH. Ces répulsions sont créés suite à la protonation de tous les groupes carboxyles (Brewer *et al.*, 1987). Morphologiquement, la forme E est présentée par une suite de boucles et de cordons (figure 11b). (Carter *et* Ho, 1994).

Inversement, dans les pH alcalins de 8 à 10, la protéine présente la forme B « basic » dont le repliement est le plus proche de la forme normale « N » mais avec une diminution de 10% du taux des hélices α et une augmentation de 8% de taux des coudes β et de structure désordonnées (Era *et al.*, 1996).

A pH supérieur à 10, la SAH acquiert une forme A « Aged » caractérisée par un réarrangement des ponts disulfures. La forme A présente une faible mobilité électrophorétique (Peters, 1975).

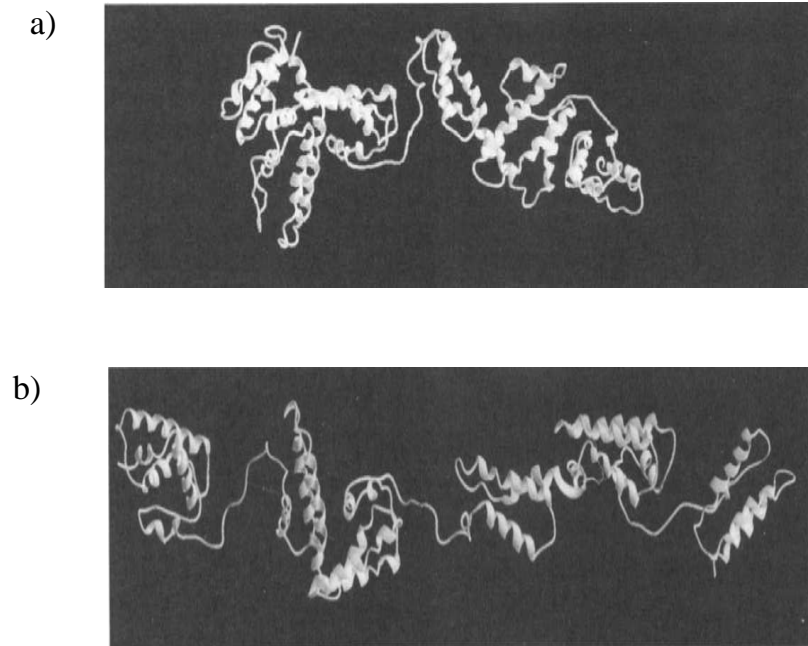


Figure 11: Formes transitoires isométriques de la SAH. (a) Configuration de l'isomère F. (b) Configuration de l'isomère E (Carter *et* Ho, 1994).

II.3- Séquence et Structure de la SAH

La SAH est une protéine monomérique constitué d'une seule chaîne polypeptidique de 585 résidus d'acides aminés avec un haut contenu en alanine (62), acide glutamique (61), Leucine (61), lysine (57), valine (42), acide aspartique (36) et cystéine (35). Les acides aminés les moins présentés dans la séquence de la SAH sont la méthionine (8) et le tryptophane (1). Les extrémités N-terminal et C-terminal de la chaîne polypeptidique sont constituées de résidus aspartyl et leucyl respectivement (figure 12)

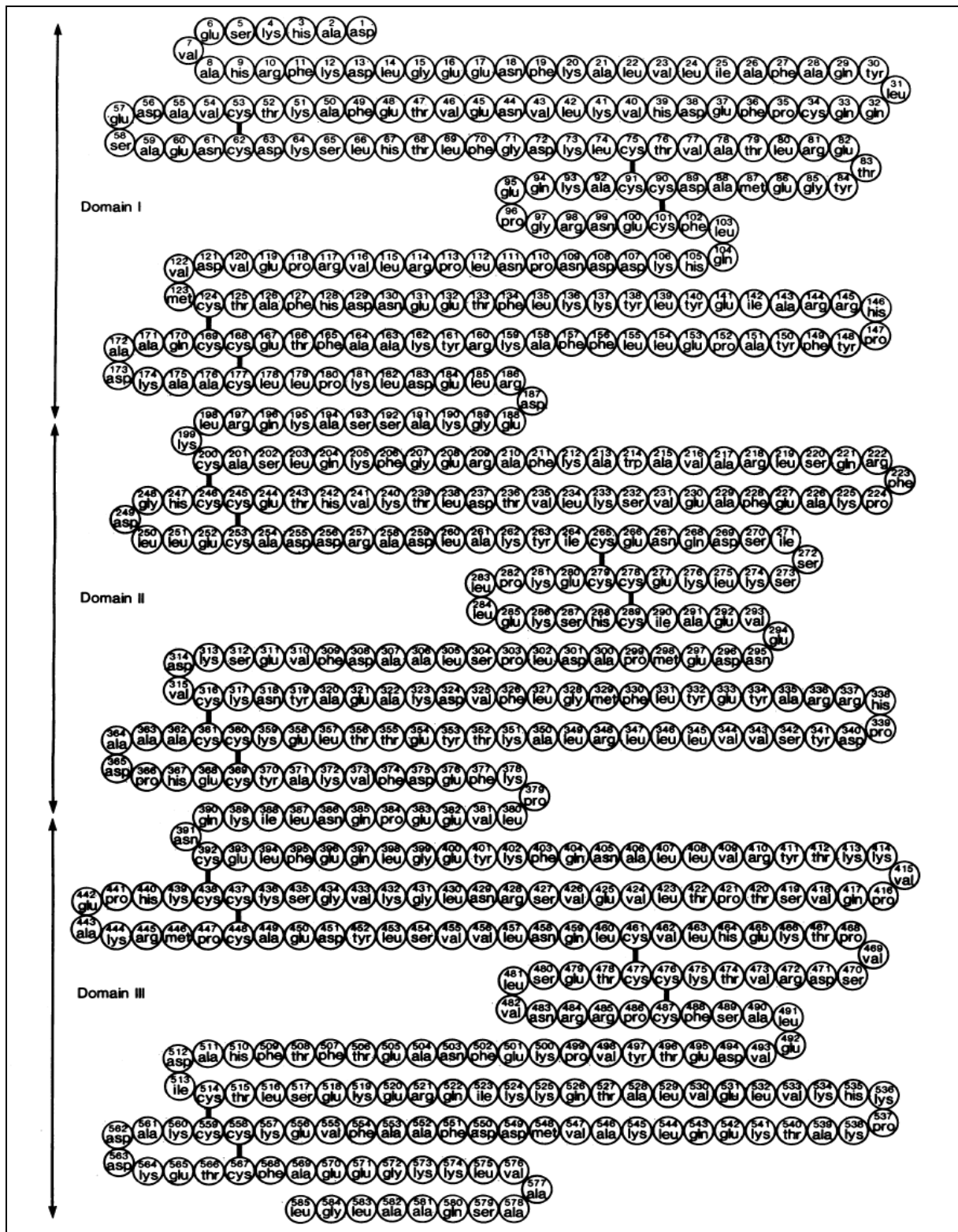


Figure 12: Séquence primaire de la SAH (Dugaiczky *et al.*, 1982 et Manghetti *et al.*, 1986).

La SAH est repliée de façon compacte selon une forme de cœur, avec des dimensions approximatives de 80x80x30 Å (Carter *et* Ho, 1994) et est formée principalement d'hélices α (67%) (figure 13) (Peters, 1996).

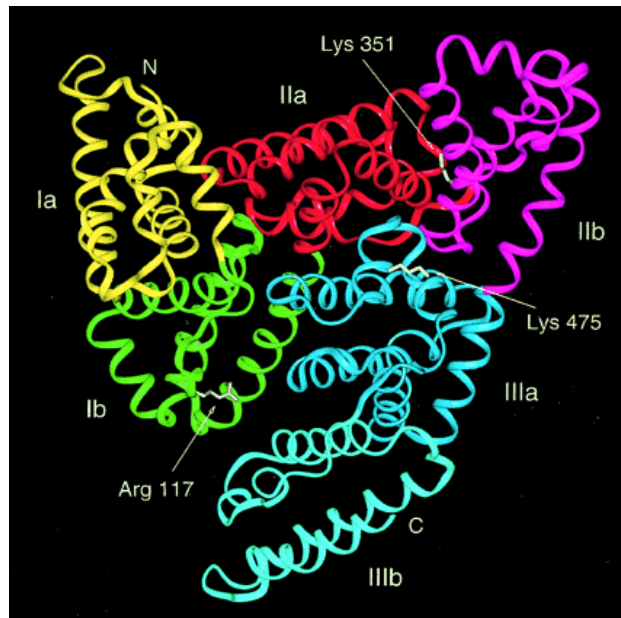


Figure 13: Structure tridimensionnelle de la SAH à pH 7 (Sugio *et al.*, 1999)

La SAH est stabilisée par 17 ponts disulfures et possède une cystéine libre en position 34, cette dernière bien qu'elle est située sur la surface de la protéine, sa fonction sulfhydrique SH est localisée vers l'intérieur et entourée par des chaînes latérales de Pro 35, His 39, Val 77 et de Tyr 84 qui empêche le groupe sulfhydrique d'interagir avec le milieu extérieur (Sugio *et al.*, 1999).

La SAH est subdivisée en trois domaines homologues : Le domaine I (du résidu 1 au résidu 195) stabilisé par 5 ponts disulfures, les domaines II (résidu 196 au résidu 383) et III (résidu 384 au résidu 585) stabilisés chacun par 6 ponts disulfures. Ces trois domaines sont non seulement topologiquement identiques, mais aussi très semblables dans leur structure tridimensionnelle (figure 14) (Dockal *et al.*, 1999)

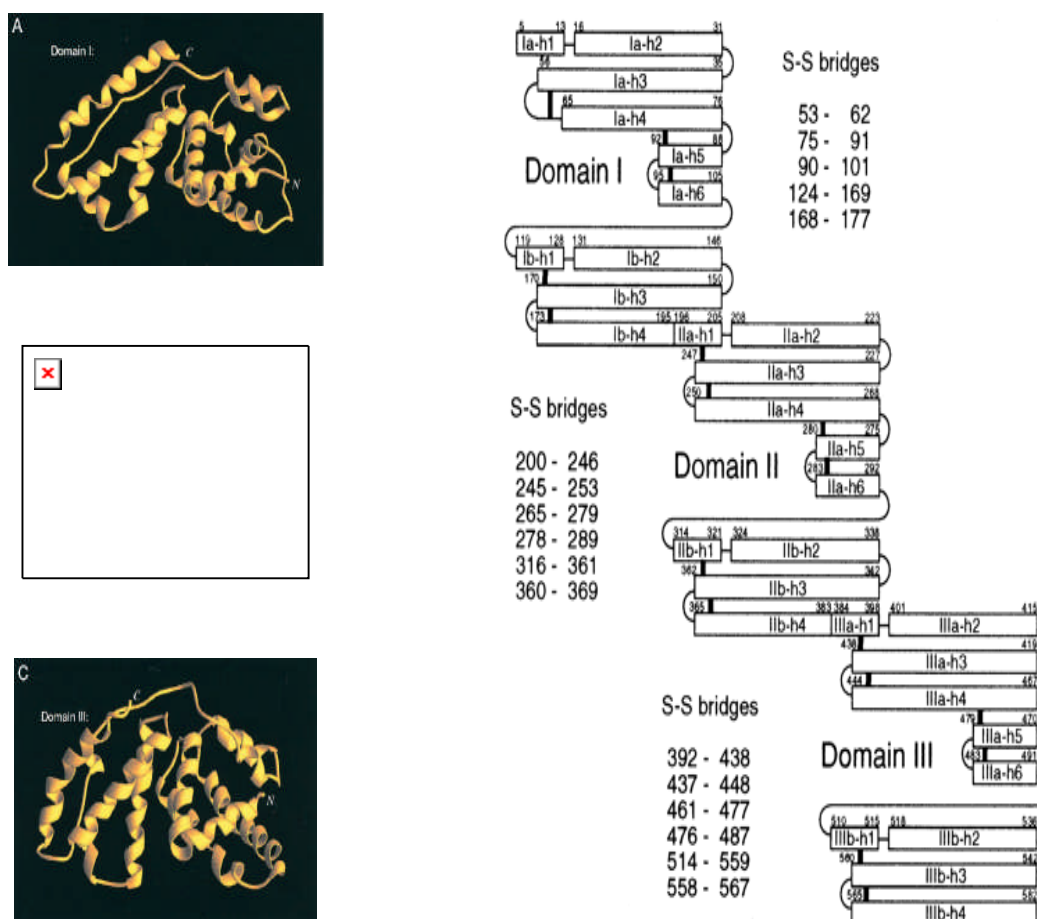


Figure 14: Structure et organisation des domaines I, II et III de la SAH. (Dockal *et al.*, 1999 et Sugio *et al.*, 1999). A gauche : structure tridimensionnelle des 3 domaines. A droite : Schéma de l'organisation de ces domaines.

Chaque domaine peut être encore divisé en sous domaines a et b, qui se composent de 6 et de 4 hélices α respectivement. Une longue boucle prolongée traverse les deux sous domaines pour les lier ensemble. Des poches hydrophobes profondes chargées sont situées aux positions semblables dans les sous domaines IIa et IIIa, et correspondent respectivement aux sites I et II. Les sites I reconnaissent des salicylates, des sulfamides, et certain nombre d'autres drogues. Ils contiennent des composés chargés comme l'Arg 257, Arg 222, Lys 199, His 242, Arg 218 et Lys 195.

Les sites II reconnaissent le tryptophane, la thyroxine, l'octanoate et d'autres drogues. La chaîne latérale d'Arg 410 est située à l'entrée de la poche hydrophobe tandis que l'hydroxyle de la Tyr 411 vers l'intérieur de cette poche, le sous domaine Ia ne possède pas de poche hydrophobe (Sudlow *et al.*, 1975 ; Sudlow *et al.*, 1976).

III- Interaction SAH- alcaloides

III.1- Diversité des ligands de la SAH

La SAH possède une grande capacité à lier de petites molécules de diverses natures. Cette capacité de liaison est due à sa flexibilité structurale et ses trois domaines de liaison (Bennhold 1961 ; Honor 1990). La SAH interagit avec une large gamme de composés avec une large gamme d'affinité $10^3 \leq K_a \leq 10^9$ (tableau IV). Les anions organiques hydrophobes de taille moyenne de 100 à 600 tels que les acides gras, l'hématine et la bilirubine se lient fortement à la SAH. Les petits composés moins hydrophobes comme le tryptophane et l'acide ascorbique se lient moins fortement. L'affinité de liaison dépend pour certains composés de leurs formes chirales. Ainsi, le L-Tryptophane se lie à la SAH avec une affinité 100 fois plus grande que le D-tryptophane.

Tableau IV : Certains composés endogènes transportés par la SAH (Peters, 1996).

Ligands	Constante d'association K_a (M^{-1})	Nombre de site n
Acides gras à longues chaînes	$(1-69) \times 10^7$	1
Eicosanoïdes (PGE_1)	7×10^4	2
Cortisol	5×10^3	2
Progestérone	$3,6 \times 10^5$	1
La testostérone	$2,4 \times 10^4$	1
Aldostérone	$3,2 \times 10^3$	1
Bilirubine	$9,5 \times 10^7$	1
Hématine	$1,1 \times 10^8$	1
Thyroxine	$1,6 \times 10^6$	1
L-Tryptophane	$1,0 \times 10^4$	1
25-OH-vitamine D	36×10^5	1
Calcium	15×10^9	1

Les méthodes de séquençage de l'ADN, de la fluorescence, de la diffraction des rayons X, et l'isolement des fragments fonctionnels ont permis la localisation des sites ou des régions de liaison de ces ligands (figure 15) (Peters, 1996).

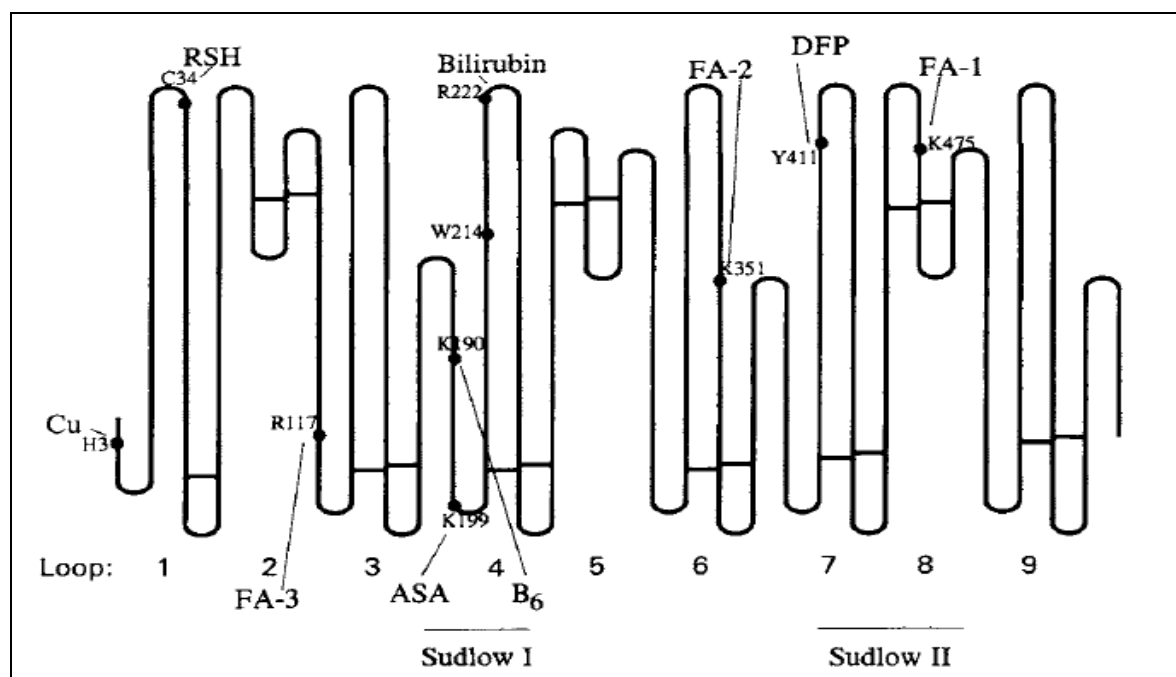


Figure 15: Schéma montrant les sites de liaison à la SAH de divers ligands. FA, les acides gras à longue chaîne ; SA, Acétylsalicylate ; B₆ pyridoxal 5'-phosphate ; RSH, Disulfides mixtes ; DFP, diisopropyl fluoro phosphate (Peters, 1996).

Les acides gras à longue chaîne possèdent six sites de liaison, ils se lient fortement aux régions suivantes : région formée par les boucles 8-9, à la Lys-475, région formée par la boucle 6, à la Lys-351 et région formée par la boucle 3, à l'Arg-117. Le Salicylate, certains sulfamides et d'autres drogues se lient au site I. Le site de la bilirubine et de l'hématine est localisé au niveau des boucles 3 et 4. Le tryptophane, la thyroxine, l'octanoate, et les médicaments sont reconnus par le site II.

Les ions métalliques Cu (II) et Ni (II), se lient à l'histidine de l'extrémité N-terminal de la SAH (Sudlow, 1975 ; Sudlow, 1976).

III.2- Topologie et spécificité des sites de liaison de la SAH

La SAH possède deux types de sites de liaisons principales ; les sites I et les sites II. Ces sites de liaisons sont importants pour comprendre les caractéristiques pharmacocinétiques et le déplacement des médicaments.

III.2.1- Site de liaison I

Le site I est localisé dans le sous domaine IIa et est formé d'une poche dont les parois sont constituées par les chaînes hydrophobes et contenant le seul résidu tryptophane de la protéine. L'entrée du site est entourée par les résidus d'acides aminés chargés positivement (Arg 257, Arg 222, Lys 199, His 242, Arg 218 et Lys 195). (Sugio *et al.*, 1999 ; Otagiri, 2005). Ce site est flexible et possède une grande capacité de liaison, il contient un grand nombre de sites de liaison individuels parfois indépendants l'un de l'autre mais dans d'autre cas mutuellement influence l'un l'autre. (Yamasaki *et al.*, 1996 ; Zhu-Sheng *et al.*, 2002). La liaison par une grande affinité d'un grand nombre de ligands de structure chimique différente est une preuve de l'adaptabilité de ce site. Des interactions mutuelles ont été observées entre des ligands interagissant à ce site qui peuvent être attribuées au recouvrement partiel des sites de liaison ou au changement de conformation de l'albumine (effet allostérique). Une mutation qui touche un seul résidu dans cette région de l'albumine affecte significativement la conformation et la stabilité thermique de la protéine beaucoup plus que les mutations qui touche le site II (Watanab *et al.*, 2001). Les ligands qui se lient au site I, appelé aussi warfarin site, sont des acides dicarboxyliques et/ou de grosses molécules hétérocycliques avec une charge négative localisée à l'intérieur de la molécule comme le warfarin, 5-diméthylaminonaphtalène-1-sulfamide (DNSA), dansylamide, dansyl-L-asparagine, dansyl-L-lysine et *n*-butyl-*p*-aminobenzoate (Yamasaki *et al.*, 1996 ; Zhu-Sheng *et al.*, 2002).

III.2.2- Site de liaison II

Le site II est situé dans le sous domaine IIIA. Il est enfermé dans une poche hydrophobe et semble plus petit que le site I et est moins flexible car il est affecté par la stéréosélectivité. A l'entrée de cette poche se localise la chaîne latérale de l'Arg 410 et Tyr 411 qui jouent un rôle important pour ce site. Une mutation qui touche ces deux acides aminés diminue fortement de l'affinité de liaison de ce site pour ces ligands spécifiques (Watanabe *et al.*, 2000). Les ligands qui se lient au site II, appelé aussi indole benzodiazépine site, sont souvent les acides carboxyliques aromatiques avec un groupe acide chargé négativement à l'extrémité de la molécule et est séparé par un centre hydrophobe comme la dansylsarcosine, dansyl-L-proline, dansyl-L-glycine et le 7-alkylaminocoumarin-4-acide acétique (Otagiri, 2005).

III.3- Interaction SAH- alcaloïdes

III.3.1- Type d'interaction

Les mécanismes d'interaction protéine- alcaloïde sont encore très mal compris du fait que peu d'études ont été réalisées sur ce type d'interactions. L'interaction alcaloïdes-protéines est réversible (Raves *et al.*, 1997 ; Thomsen et Kewitz., 1999 ; Ying *et al.*, 2005 ; Krisko *et al.*, 2005). Ces interactions sont généralement de forte affinité. C'est le cas de la berbérine (Ying *et al.*, 2005) et de la caféine (Krisko *et al.*, 2005) qui se lient fortement et réversiblement au site IIa de la SAH avec des affinités de l'ordre de $K_a \sim 10^4 M^{-1}$.

Les paramètres thermodynamiques, enthalpie (ΔH) et entropie (ΔS) mesurés par microcalorimétrie montre que les interactions protéines-alcaloïdes sont assurée majoritairement par les forces hydrophobes et électrostatiques (Raves *et al.*, 1997 ; Thomsen et Kewitz, 1999 ; Ying *et al.*, 2005; Krisko *et al.*, 2005). Les interactions hydrophobes typiques sont caractérisées par un ΔH et ΔS positives, tandis que les liaisons hydrogène et les forces de van der waals sont caractérisées par des valeurs négatives de ces deux paramètres, cependant une enthalpie négative peut jouer un rôle dans les interactions électrostatiques (Tian *et al.*, 2004).

L'interaction de la SAH avec la berbérine, un alcaloïde extrait à partir des Berberiaceae, Fumariaceae et Papaveraceae connu par son activité antimicrobienne, antiplasmodiale et cardiovasculaire a été étudiée à 296, 303 et 318K, dans des températures qui n'affectent pas la structure de la SAH. La liaison est de forte affinité de l'ordre de $K_a \sim 10^4 M^{-1}$ et l'interaction est caractérisée par une variation d'énergie libre (ΔG) négative, d'une variation d'entropie ΔS positive et d'une variation d'enthalpie négative ($\Delta H < 0$). Le processus d'interaction est donc spontané et exothermique et l'interaction SAH-berbérine est majoritairement régit par des interactions hydrophobes, sans que les interactions électrostatiques ne soient exclues (Ying *et al.*, 2005).

L'interaction de la SAH avec la brucine, un alcaloïde extrait à partir des graines de strychnos connu par son effet stimulateur du système nerveux central a été

étudiée thermodynamiquement. Cette interaction est accompagnée par des variations d'enthalpie et d'entropie positives prouvant que les forces hydrophobes sont celles qui régissent cette interaction et que le processus est spontanée puisque la réaction est exothermique ($\Delta G < 0$) (Yan-Qing *et al.*, 2007).

III.3.2- Conséquences structurale et dynamique de la liaison des ligands sur les protéines

La fixation des alcaloïdes aux protéines pourrait induire des changements conformationnels de ces macromolécules. L'étude par RPE a montré que la caféine augmente la dynamique conformationnelle et/ou la polarité de la SAH (Krisko *et al.*, 2005). Le dichroïsme circulaire et L'IRTF ont montré que lorsque la berbérine se lie à la SAH au niveau du site II, elle provoque une réduction importante du nombre d'hélices alpha qui se manifeste par une diminution de l'intensité des pics d'absorption du complexe à 208 et 218nm (Ying *et al.*, 2005).

Certains ligands changent de propriétés d'absorption en se liant à des protéines comme la SAH ou la SAB. Ceci a été observé dans plusieurs cas d'association protéine-ligands. Lors de l'interaction du bleu de coomassie avec la SAB. Ce dernier s'adsorbe en milieu acide sur les protéines et cette complexion provoque une bathochromie (déplacement du spectre vers les grandes longueurs d'onde) et on voit apparaître un nouveau pic d'adsorption à 595nm. Ce changement de propriétés spectrales est causé par un changement structural de ce dernier lors de son interaction avec la SAB (Marion, 1976). Un autre exemple est l'interaction du T4 (hormone thyroïdienne) avec la SAH qui implique une torsion dans sa conformation, d'un angle de valence de 120° entre les anneaux aryliques à son atome d'oxygène d'éther (Tabachnick *et al.*, 1970). Cette interaction provoque une variation bathochromique dans l'absorbance T4 et son pic d'absorbance passe à 310 nm (Tritsch, 1968).

III.3.3- Paramètres influençant l'interaction SAH-Ligands

L'interaction SAH-ligands dépend étroitement des conditions physico-chimiques environnantes. Ces paramètres pourraient ainsi influencer les caractéristiques pharmacocinétiques de la SAH au cours du transport. Le pH, la force ionique et la température affectent l'interaction de plusieurs ligands. Un exemple bien élucidé est l'effet du pH sur la liaison des ions chlorure à la SAH (figure 16). A pH physiologique, sept ions de chlorure se lient par molécule d'albumine. Le nombre d'ion chlorure lié augmente avec la diminution du pH, particulièrement au-dessous de pH 4,7, qui représente le pH isoélectrique de la SAH, où 11 ions de chlorure se lient par molécule d'albumine. Le nombre des ions chlorure liés à la SAH augmente à 22 à pH 4,2 (Niels, 1993).

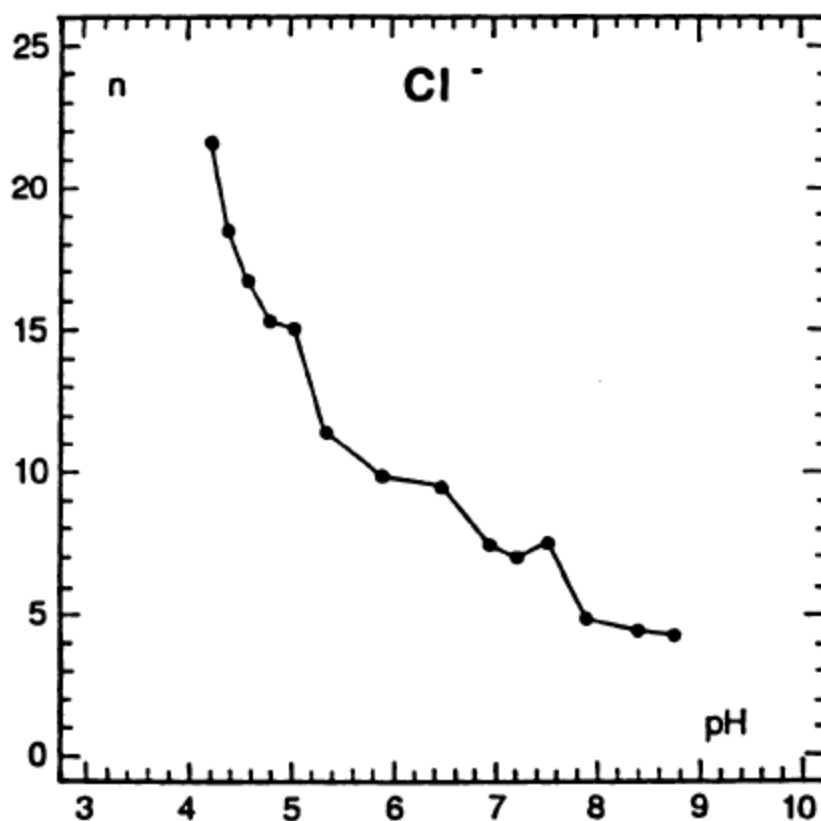


Figure 16: Schéma montrant l'effet du pH sur l'interaction des ions chlorure avec la SAH (Niels, 1993).

Certaines molécules trouvent leur liaison à la SAH indépendante du pH, c'est le cas de l'interaction du myristate avec la SAH dont l'interaction dépend des forces hydrophobes et où les forces électrostatiques sont faibles (Pederson *et al.*, 1995).

La force ionique aussi est un facteur qui influence l'interaction SAH-ligand. Par exemple les ions I^- , Cl^- et Br^- diminuent la constante d'association du trifluoromazine (TFZ) et la chlorpromazine (CPZ) à PH 7, avec la l'albumine. Le NaCl à 0,1M diminue cette constante de 40% car ses ions se lient en compétition avec TFZ et CPZ au site II de la SAH. L'interaction de ces ions peut mener à quelques effets stériques locaux pour l'interaction du TFZ au site II (Omran *et al.*, 2006). Les ions comme le I^- , Br^- , Cu^{2+} diminuent la constante d'association jusqu'à 60% de la sinomenine, un alcaloïde anti-inflammatoire et analgésique isolé à partir de la tige et des racines de *Sinomenium acutum* avec la SAB (Hairong *et al.*, 2008).

III.4- Méthodes d'étude de l'interaction SAH- ligands

III.4.1-Spectroscopie d'absorption UV-Visible

Les propriétés optiques des molécules sont étroitement reliées à leur structure, les variations spectrales reflètent des modifications dans l'environnement des groupes absorbant mais ces effets localisés résultent le plus souvent des variations plus globales dans la conformation de la molécule (Yon, 1967). La spectrophotométrie constitue une bonne méthode pour l'étude des changements de structure des protéines en solution ou lors de son interactions avec le ou les ligands, cependant son inconvénient est que les variations conformationnelles qui n'affectent pas les groupes chromophores ne lui sont pas accessibles (Péré, 1999).

Le spectre UV des protéines comporte trois régions, le premier supérieur à 250nm, l'absorption dans cette région est essentiellement due aux acides aminés aromatiques (Trp, Tyr, Phe). La seconde région comprise entre 210 et 250 nm présente une plus grande complexité avec la participation des acides aminés, histidine, cystéine, méthionine et les autres bandes des acides aminés aromatiques. Enfin, dans la région

des courtes longueurs d'ondes inférieures à 210 nm s'inscrivent les propriétés spectrales de la liaison peptidique (Yon, 1967).

La spectroscopie d'absorption a été utilisée pour étudier l'interaction de différents ligands avec les protéines (Kiston, 2004 ; Wenying *et al.*, 2005; Omran *et al.*, 2006). L'étude de l'interaction de la SAH avec une quinolone antimicrobienne, le pazufloxacin mesilate (PZFX) a montré que l'intensité d'absorption de la SAH augmente avec la concentration de PZFX mettant en évidence l'établissement d'une interaction forte entre le PZFX et la SAH qui induit un changement de structure secondaire de la protéine (Jin and Zhang, 2007).

III.4.2- Spectroscopie de fluorescence

Les caractéristiques spectrales d'une molécule fluorescente ou fluorophore peuvent donner beaucoup d'informations sur le comportement de cette molécule lors la formation de complexes avec le solvant ou les solutés, la réorientation de l'environnement autour du moment dipolaire de l'état excité, la diffusion et les collisions avec des molécules extinctrices de fluorescence (Lakowicz, 1999). Les mesures de fluorescence sont très sensibles ; entre 1000 et 10000 fois plus sensibles qu'en UV-vis. La limite inférieure de sensibilité est de l'ordre de 10^{-9} - 10^{-12} M et jusqu' à 10^{-17} M (Lakowicz, 1999).

L'étude de la fluorescence intrinsèque des protéines (fluorescence du Trp) permet d'étudier les changements induits par des variations du milieu (pH, température, détergents, co-solvants, tampons...) ou par liaison de ligands (Cui *et al.* ; 2003 ; Cui *et al.*, 2004). La liaison d'un ligand à la protéine change généralement la fluorescence de celle-ci, soit parce que sa conformation est changée, soit parce que le ligand chasse de l'eau et modifie la polarité du milieu autour du Trp qui est au site de liaison (modification de λ_{\max} et/ou de l'intensité de fluorescence). Et si le λ_{\max} d'absorption du ligand est proche de la longueur d'onde d'émission des Trp, il y a extinction de la fluorescence par transfert si les deux entités sont proches (Giepmans *et al.*, 2006).

L'étude de l'interaction du pazufloxacin mesilate (PZFX,) un agent antimicrobien de type quinolone avec la SAH par spectrofluorescence a permis de déterminer la constante d'association ($K_a = 1,3 \times 10^5 \text{M}^{-1}$ à 25°C) et de déduire le mécanisme d'interaction. L'addition du PZFX à la SAH provoque la diminution graduelle de l'intensité de l'émission de fluorescence. Ce qui indique que l'excitation de la SAH a été éteinte par le PZFX. Par ailleurs, un déplacement des spectres d'émission vers les régions rouge du spectre fut observé. Autrement, on a également observé un léger décalage de longueur d'onde vers le rouge. Ce qui indique un changement dans le microenvironnement du tryptophane causé par l'interaction de la SAH avec le PZFX (Jin and Zhang, 2007).

L'étude de l'interaction entre la SAH et l'Acide ellagique, un polyphénol à effet antioxydant, anti-inflammatoire et anti-fibrose, par technique de spectrofluorescence dans des conditions semblables aux conditions physiologiques a montré que le processus d'interaction est spontané, et que le site de liaison probable du polyphénol est la poche hydrophobe située dans le sous domaine IIA. Par ailleurs, La distance de liaison entre Trp214 et l'acide ellagique a été estimée par méthode de transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET). Les interactions faibles comme les interactions de van der Waals et la liaison hydrogène ont joué le rôle principal dans cette interaction (Nanda *et al.*, 2007).

III.4.3- Spectrométrie Infra Rouge à Transformée de Fourier (IRTF)

Il s'agit d'une méthode essentiellement qualitative, qui permet d'obtenir des informations structurales, ou pour tester la pureté d'une substance. Les spectres d'absorption IR sont caractérisés par de faibles coefficients d'absorption molaire (compris entre 10 et 1500) : la méthode est donc peu sensible mais il existe maintenant des appareils dits "à transformée de Fourier" qui permettent l'accumulation et le moyennage de spectres successifs d'un même échantillon. En augmentant le temps d'accumulation, on arrive alors à obtenir des spectres avec de très faibles quantités de

substance. L'analyse de la structure des protéines repose surtout sur le spectre IR de la liaison amide dans la zone 1700-1600 cm^{-1} .

L'étude de l'interaction de la berbérine, un antimicrobien, antiplasmodial et antidiarrhéal avec la SAH par IRTF a montré que cette molécule se lie au sous domaine IIa de l'albumine (site II) et que cette interaction de grande affinité provoque une diminution du taux de structure en hélices α de 10% et des coudes β de 1% mais augmente le taux des structures désordonnées de 12% (Ying *et al.*, 2005).

III.4.4- Dichroïsme Circulaire (DC)

Le spectre de dichroïsme circulaire correspond à l'absorption de la lumière polarisée circulaire gauche ou droite par les molécules chirales. C'est une transition d'absorption électronique très sensible. Dans le cas des protéines, le spectre DC est caractéristique de l'absorption de la liaison peptidique entre 190 et 240 nm. Suivant la conformation de la chaîne principale (α , β , boucles) la lumière polarisée circulaire gauche ou droite est absorbée différemment à cause de l'orientation des dipôles des hélices, brins, etc. Le signal le plus caractéristique du DC celui de l'hélice α avec une ellipticité négative à 209 et 222 nm. Les spectres DC de la SAH à différentes quantité de PZFX exhibent deux bandes négatives dans cette région d'UV traduisant une augmentation des taux d'hélice de 57.80% à 65.68% en présence de PZFX et montrant que le PZFX augmente la stabilité des structure secondaires hélicoïdales de la SAH (Jin et Zhang, 2007).

III.4.5- Calorimétrie Isotherme à Titration (ITC)

La calorimétrie isotherme à titration (Isothermal Titration Calorimetry, ITC) a été introduite en 1989 dans le milieu scientifique par la firme *MicroCal*. Le principe de l'ITC est le suivant : une macromolécule située dans la cellule de mesure d'un

calorimètre isotherme est progressivement saturée, à température constante, par l'injection de petits volumes de ligand (quelques μL) à partir d'une seringue.

À chaque ajout de ligand correspond un échange thermique (absorption ou libération de chaleur) signant l'interaction macromolécule-ligand.

Le signal thermique est mesuré dans la cellule du calorimètre après chaque injection et se concrétise par un pic sur le thermogramme expérimental. Ces quantités de chaleur sont ensuite ramenées à la concentration molaire de la protéine, et portées en fonction du rapport des concentrations ligand/macromolécule. Ils permettent d'obtenir un isotherme de liaison complet (figure17).

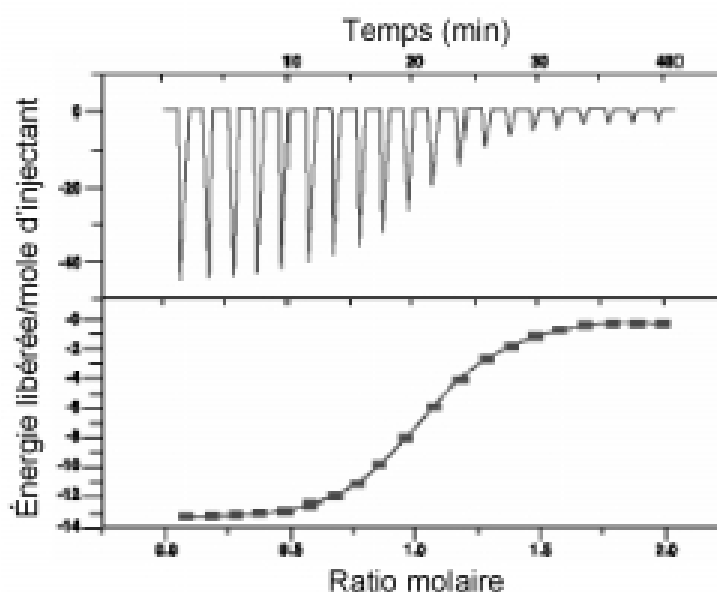


Figure 17 : Isotherme de titration calorimétrique (Chilom *et al.*, 2006).

Cette méthode permet en premier lieu de mettre en évidence une interaction, et de déterminer la constante d'affinité K_a et la stœchiométrie n du système. Les spécifications actuelles des calorimètres ITC rendent possible la détermination précise de constantes d'affinité dans une gamme s'étalant de 10^3 à 10^8 M^{-1} . Elle permet aussi de mesurer et de calculer les autres paramètres thermodynamiques de l'interaction : la variation de l'énergie libre ΔG , la variation d'enthalpie ΔH , la variation d'entropie ΔS , et préciser ainsi les forces contribuant à la formation des complexes. Les variations d'enthalpie en fonction de la température permettent de déterminer la variation de

chaleur spécifique C_p , qui reflète essentiellement les changements de conformation que peut subir une protéine lorsqu'elle forme un complexe avec un ligand, en traduisant la modification des surfaces accessibles au solvant induites par l'interaction (Chilom *et al.*, 2006).

La microcalorimétrie a été utilisée dans l'étude de l'interaction entre la SAH avec les phénothiazines, utilisées comme antipsychotiques. L'analyse des courbes de titration ont permis de déterminer la variation d'enthalpie ΔH , la constante d'affinité, le nombre de sites aussi bien que la variation de l'énergie libre ΔG et la variation d'entropie ΔS . La liaison des phénothiazines à la SAH est un processus exothermique qui était compensé par des changements d'entropie. Cette étude a montré que la SAH possède deux sites de liaison pour les phénothiazines ; le premier ($n_1=1$) avec une grande affinité (K_a de 10^5 à 10^6 M^{-1}) et caractérisé par une faible variation d'énergie libre (ΔG) négative et une variation d'entropie ΔS positif due à des interactions hydrophobes. Le deuxième site à basse affinité (10^3 à 10^4 M^{-1}) mais à une capacité élevée ($n_2 = 3-8$) contribue à une valeur négative de l'enthalpie et d'entropie (Aki and Yamamoto, 1989).

III.4.6- Autres méthodes

La structure tridimensionnelle des protéines aussi bien que des complexes protéine/ligands, peuvent être étudiées par d'autres techniques telles que la résonance magnétique nucléaire et la cristallographie par diffraction aux rayons X.

Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

L'analyse des spectres de RMN ne donne pas accès immédiatement à la structure tridimensionnelle. Il faut d'abord attribuer chaque fréquence de résonance à l'atome correspondant dans la molécule, puis utiliser les données géométriques observées pour calculer la structure tridimensionnelle globale. La RMN en phase liquide est la seule méthode amenant à la structure atomique de macromolécules libres ou complexées en solution. Elle comporte cependant des contraintes significatives sur

la taille des molécules étudiées (30 - 40 kDa au plus) comme sur leurs propriétés de solubilité (Meyer et Peters, 2003).

Cristallographie et diffraction aux rayons X

En envoyant des rayons X sur un cristal de protéines, on observe un spectre de diffraction. Grâce à une transformation mathématique simple, il est possible d'accéder rapidement à la structure tridimensionnelle des protéines dans le cristal. L'étape limitante de cette méthode est la production d'un monocristal pur. Elle peut être plus ou moins difficile, de façon plutôt imprévisible. La technique est améliorée par l'utilisation du rayonnement synchrotron. Celui-ci permet la production d'un rayonnement X intense, stable, de longueur d'onde variable et de grande qualité optique. Ils offrent des données exploitables pour des cristaux de macromolécules que des méthodes classiques ne permettaient pas d'étudier : mailles plus grandes, donc molécules ou complexes plus grands, cristaux plus petits voire imparfaits (Voët et Voët, 2005).

Partie II :

Travail expérimental

I- Matériel et méthodes

I.1-Le matériel végétal : graine de *Nigella damascena*

Les graines de *Nigella damascena* sont d'origine Syrienne. Elles ont été achetées chez un herboriste à Bejaia. Ces graines sont de couleur noire très brillante de $5\pm 0,2$ mm de taille et possède une forme ovoïde aplanie et lisse (Figure 18). Le volume, la densité en gros et l'indice des graines de *Nigella damascena* sont de $26,9 \pm 0,05$ cm³ et $0,83 \pm 0,01$ g/cm³, $22,5\pm 0,35$ g respectivement (Tacherfiout, 2008).



Figure 18: Graines de *Nigella damascena* (photographie prise au niveau du laboratoire d'enzymologie).

I.2- Extraction et caractérisation des alcaloïdes de *Nigella damascena*

I.2.1- Extraction et caractérisation des alcaloïdes totaux

L'extraction a été effectuée à partir de la poudre de graine selon le protocole décrit par Sousek *et al* (1999) modifiée. Les graines une fois débarrassées de la poussière par lavage ont été séchées à l'étuve (40°C) pendant dix jours pour obtenir une meilleure extraction. Puis broyées à l'aide d'un broyeur électrique IKA A11 Basic.

80g de poudre ainsi obtenue de granulométrie moyenne de 500µm sont épuisés avec 600 ml de méthanol dans un *soxhlet* réfrigéré pendant 7h sous une température d'ébullition du méthanol. L'extrait méthanolique séché a été récupéré par évaporation complète dans un *rotavapor* puis solubilisé dans 600ml d'HCL 0,02N. Ce mélange subit une délipidation complète dans une ampoule à décanter avec 150ml d'hexane. La phase aqueuse récupérée a été ensuite mélangée à 200ml du réactif de Mayer. On filtre la suspension obtenue sur papier Wattman n°3 et le précipité est récupéré dans de l'acétone. Après évaporation de l'acétone, les alcaloïdes ainsi obtenus sont pesés puis conservé à température ambiante et à l'abri de la lumière.

I.2.2-Analyse par spectrophotométrie d'absorbance UV/Visible

Le spectre d'absorption des alcaloïdes de *Nigella damascena* solubilisés dans du DMSO (125µg/ml) a été mesuré entre 200 et 600nm à l'aide d'un spectrophotomètre *analytikjena Specord 50* couplé au logiciel Aspect-plus.

I.2.3- Analyse par chromatographie sur couche mince

Les alcaloïdes totaux de *Nigella damascena* ont été analysés par CCM sur gel de silice (Silica Woelm F-DC 4800). Le gel de silice a été étalé uniformément sur une plaque en verre (20cm x 20cm de dimension) avec une épaisseur de 0,5 mm puis activé à 110°C pendant 30min. 100 µl de solutions d'alcaloïdes solubilisés dans le méthanol à raison de 5mg/ml sont déposés en petits spots à 2 cm du bord de la plaque de migration. Après séchage, les spots sont laisser à l'air libre puis on dépose la plaque de verre verticalement dans la cuve de chromatographie contenant le mélange éluant méthanol /dichlorométhane/eau (1/1/1 v/v) et préalablement saturée par les vapeurs de ce même mélange pendant 4H. On laisse migrer pendant 20 mn à température ambiante. Après séchage, les plaques de chromatographie sont visualisées par exposition aux UV et par coloration au réactif de Dragendorff (tétra iodo bismuthate de potassium).

I.2.4- Analyse par RP-HPLC

L'extrait alcaloïde a été soumis à un essai d'analyse par HPLC analytique en mode isocratique dans un appareil de type PERKIN ELMER possédant une colonne C-18 et un détecteur UV-visible *inj.7125*. La quantité injectée est de 20µl à concentration de 1mg/ml dans du méthanol. Le débit d'élution a été réglé à 0,8µl/min. La phase mobile est constituée d'un mélange de méthanol-tampon phosphate de potassium acide (KH₂PO₄) (52%-48%). La détection a été effectuée par mesure de l'absorbance à 224 nm.

I.2.5- Isolement et propriété d'absorbance de la damascenine

La damascenine a été isolées à partir des alcaloïdes totaux par chromatographie sur gel de silice. Sur un gel de silice d'épaisseur 0,75mm, on dépose les alcaloïdes à fractionner selon une bande large de 20cm. La migration est effectuée par un mélange de solvants dichlorométhane/méthanol/eau (1/1/1 v/v). La bande de gel de silice contenant la fraction alcaloïdes à R_f de 0,82 récupérée par grattage et suspendu dans 4 ml de méthanol. La silice est éliminée par centrifugation à 3000g pendant 15 mn et cette fraction solubilisée dans le DMSO à raison de 125µg/ml est ensuite analysée par spectroscopie UV/Visible.

I.3- Etude de l'interaction de la damascenine avec la SAH

I.3.1- Préparation des solutions protéique et alcaloïdique

Solutions SAH

Une solution concentrée de SAH à 30mg/ml est préparée par solubilisation dans du tampon phosphate de potassium (0,1M, pH 7). Cette solution dont l'absorbance à 289nm est de 0,6 DO est conservée à 4°C.

Pour déterminer l'effet de certains paramètres : pH, sels, solvants sur ses propriétés spectrales d'absorbance, la SAH a été solubilisée dans les différentes solutions suivantes:

i-Tampon phosphate 0,1M, pH 4 à pH9.

ii-Tampon phosphate 0,1M, pH7 contenant 10% de méthanol, éthanol ou DMSO.

iii-Tampon phosphate 0,1M, pH7 contenant 0,05 à 0,3M de NaCl, Na₂SO₄ ou KI.

Et l'absorbance de cette protéine a été mesurée à différentes longueurs d'ondes entre 200 et 400nm.

Solution de damascenine

L'extrait sec de damascenine obtenu après évaporation du solvant d'isolement a été solubilisé dans le DMSO à température ambiante et sous agitation énergétique à raison de 2mg/ml. La solution obtenue fut ensuite filtrée sur papier wattman n°3 pour éliminer toute impureté. La solution d'alcaloïde ainsi préparée est mise dans un tube bien scellé et est gardée à température basse (4°C).

I.3.2- Mise en évidence de l'interaction SAH-damascenine

La mise en évidence et l'analyse de l'interaction de la SAH avec la damascenine a été effectuée par mesure des spectres d'absorption différentiels. Cette étude a été réalisée en utilisant un spectrophotomètre UV/visible monofaisceau de type *Analytikjena Specord 50* couplé au logiciel *Aspect plus*. Les spectres d'absorbances ont été enregistrés à différentes concentrations de damascenine (1 à 100 µg/ml) ou à différentes concentrations de SAH (0,3-3mg/ml) entre 200 et 400nm à température ambiante.

I.3.3-Etude de l'effet du pH et des sels

L'effet du pH sur le complexe SAH-damascenine a été réalisé dans du tampon phosphate de potassium 0,1M entre pH 4 et 9 par mesure de l'absorbance à 320nm. Les solutions de tampon dont le pH est inférieur à 5 ont été ajustées avec du HCl 0,1M alors que celles à pH supérieur à 8, elles ont été ajustées avec du NaOH 0,1M. Le milieu réactionnel final de 3ml de tampon phosphate 0,1M contient 1,36 mg/ml de SAH, 40µg/ml de damascenine et 10% de DMSO.

D'autre part, la liaison de la damascenine à la SAH a été déterminée en présence de 0,15 M de chlorure de sodium (NaCl), de sulfate de sodium (Na₂SO₄) ou d'iodure de potassium (KI). L'analyse a été effectuée, à température ambiante, en mesurant la variation d'absorbance à 320nm.

I.3.4-Etude de l'effet de la température

On mélange 300µl de solution de damascenine solubilisée dans le DMSO (2,05mM) avec 300µl de SAH à différentes concentrations (92 à 920µM) et 2,7ml de tampon phosphate de potassium 0,1M, pH7. On incube les solutions pendant 2H à la température adéquate 5C°,10C°,25C°,37C°. Puis on mesure la variation d'absorbance à 320nm.

II- Résultats et discussions

II.1- Caractérisation partielle des alcaloïdes de *Nigella damascena*

Etant donné que les alcaloïdes de *Nigella damascena* sont des alcaloïdes de type tertiaire, la technique de précipitation au réactif de Mayer convient particulièrement pour leur extraction (Mauer, 1964). Le taux d'extraction obtenu ainsi et calculé selon la formule : R_d (rendement massique) = masse de l'extrait alcaloïde x 100/ masse de la matière sèche initiale (Bruneton, 1987), est de 1,88%. La graine de *Nigella damascena* fait partie donc des graines oléagineuses riches en alcaloïdes. Les taux d'alcaloïdes des graines oléagineux varient entre 0,1 à 3% (May *et al.*, 1993).

L'analyse quantitative et qualitative de l'extrait d'alcaloïde de *Nigella damascena* par RP-HPLC en utilisant un mélange méthanol-KH₂PO₄ (48%-52%) (figure 19) montre la présence d'une fraction majoritaire dont le temps de rétention est de 3,34 minutes et le profil chromatographique de CCM sur gel de silice avec comme éluant le mélange de méthanol /dichlorométhane/eau distingue une seule tache de R_f égal à 0,82. L'analyse chromatographique (CCM, HPLC) montre que les alcaloïdes de *Nigella damascena* se résument en un type d'alcaloïdes majoritaire qui ne peut être que la damascenine (Edward *et al.*, 1954 ; Munshe *et Mothes*, 1965; Fico *et Tomè*, 1998). La damascenine est un alcaloïde qui fût identifié il ya plus de quarante ans et qui représente 0,7% de la masse totale de la graine de *Nigella damascena* (Mohan, 1960).

Les alcaloïdes totaux de *Nigella damascena* solubilisés dans l'éthanol n'absorbent que dans le domaine UV. Leur spectre d'absorbance présente un profil avec trois maxima ; 223nm, 264nm, 310nm (figure 20). L'absorbance totale des alcaloïdes de *Nigella damascena* est probablement caractéristique de l'alcaloïde majeur, la damascenine qui présente le même profil que celui des alcaloïdes totaux avec des maxima à 229nm, 270nm et 320 nm (figure 20). L'absorbance UV de la damascenine masque probablement l'absorbance des alcaloïdes mineurs qui peuvent exister. Cas des alcaloïdes de type isoquinoléine, indolique ou diterpénique dont les maxima d'absorbance se situe entre 200 et 300nm (Mulamba *et al.*, 1981 ; Meuwly, 1992 ; Morikawa *et al.*, 2004). D'autre part, la présence de 3 maxima d'absorbance suggère que

la damascenine isolée se présente sous différentes conformations ou états probablement dues à des réactions d'oxydation/réduction ou de protonation/déprotonation (Wenting *et al.*, 2008).

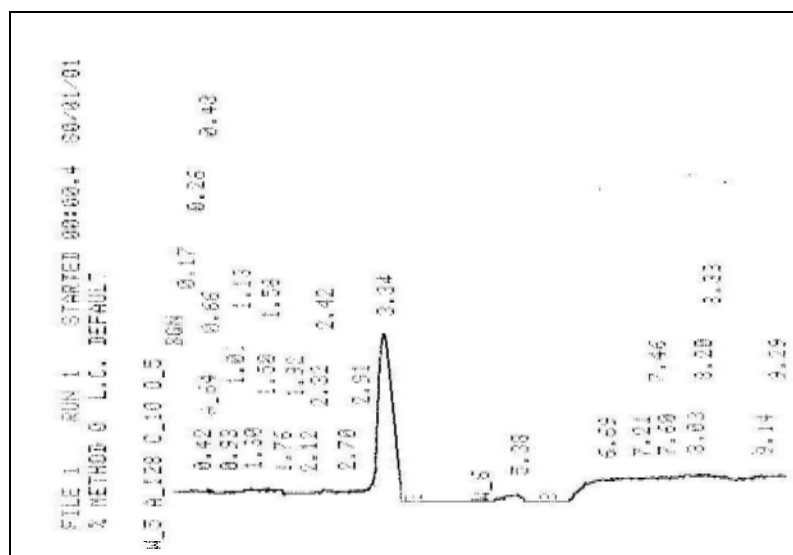


Figure 19: Profil HPLC des alcaloïdes de *Nigella damascena*.

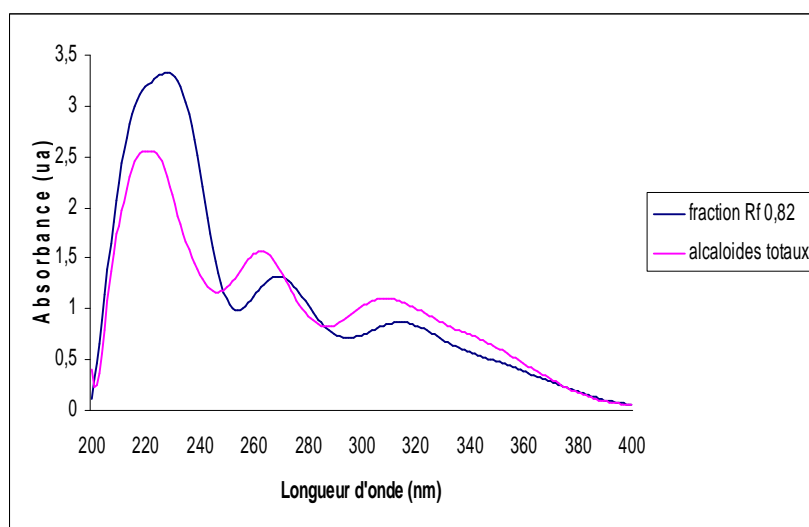


Figure 20: Spectre d'absorption UV des alcaloïdes de *Nigella damascena* solubilisés dans l'éthanol (125 µg/ml). Alcaloïdes totaux en trait rose et damascenine en trait bleu.

II.2- Propriétés d'absorbance de la SAH

Comme toutes les protéines qui contiennent du tryptophane (Trp), la SAH présente un spectre d'absorbance dont le maximum se situe autour de 280nm (figure 21). Bien que la SAH possède 31 tyrosines (Tyr) et 18 phénylalanines (Phe) (Dugaiczky, 1982 et Manghetti *et al.*, 1986), les maxima d'absorbance de ces deux acides aminés aromatiques à 275nm et 260nm respectivement, sont masqués par celui du seul tryptophane présent. La raison en est que le Trp ($\epsilon= 5600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) présente une absorption de lumière UV quatre fois plus élevée que celle de la Tyr ($\epsilon=1400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) et vingt huit fois plus élevée que celle de la phe ($\epsilon=200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Mach *et al.*, 1992) et que la majorité des Tyr et Phe se trouvent enfouis dans la protéine alors que le Trp est localisé vers la surface de la protéine (Sugio *et al.*, 1999).

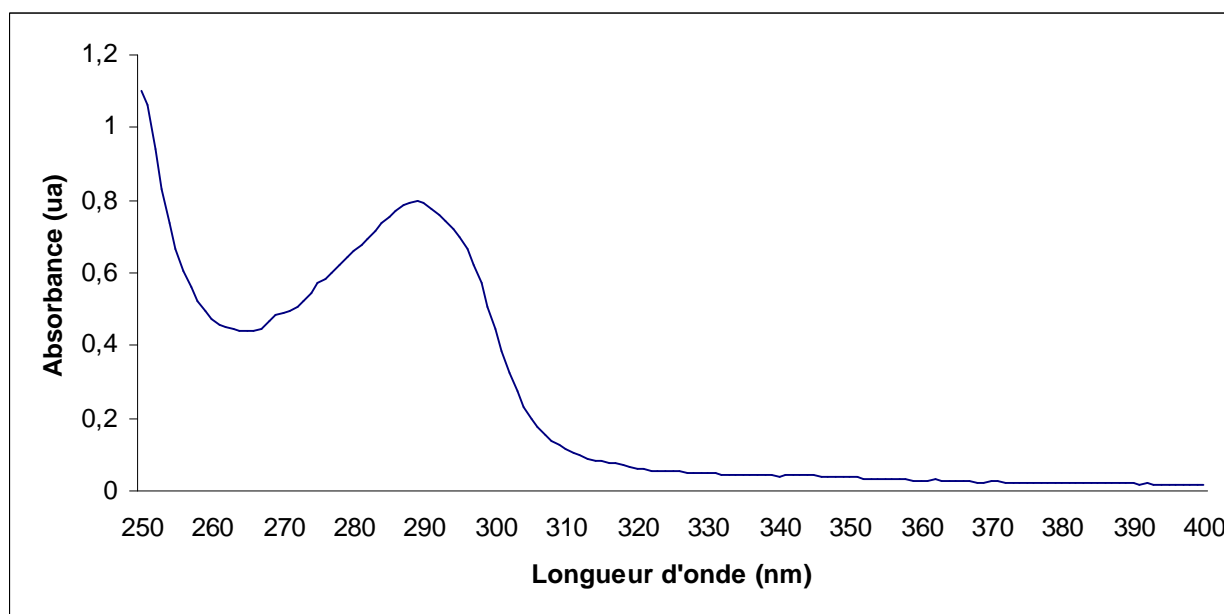


Figure 21: Spectre d'absorption de la SAH solubilisée dans du tampon phosphate 0,1M, pH 7 (1,36 mg/ml).

II.2.1- Effets du pH

Les mesures d'absorbance dans l'UV de la SAH dans du tampon phosphate à différents pH (pH4 à pH8) ne montrent pas de déplacement de spectre d'absorbance ce

qui signifie que la SAH est stable dans cette gamme de pH où elle se trouve sous la conformation normale N (Aoki *et* Foster, 1957). D'autre part, la variation de l'intensité d'absorbance à 290 nm en fonction du pH présente un profil avec un minimum à pH 5 (figure 22). Cette variation d'intensité peut être liée à la solubilité de la SAH dont le minimum se situe à pH égal à son pHi de 4,7 (Peters, 1996).

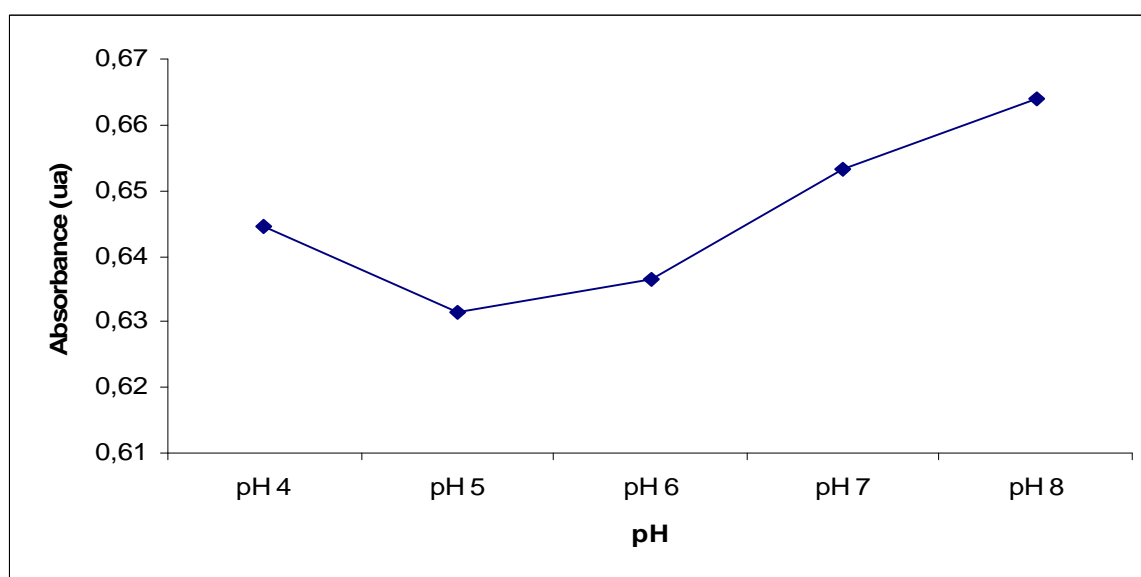


Figure 22 : Absorbance à 290 nm de la SAH (1,36 mg/ml) dans un tampon phosphate 0,1M en fonction du pH .

II.2.1-Effet du DMSO

Comme les alcaloïdes présentent une limite de solubilisation dans la solution aqueuse tamponnée ($\leq 100\mu\text{g/ml}$), l'ajout de solvant organique tel que l'éthanol, le méthanol ou le DMSO est nécessaires pour augmenter la solubilité de ces ligands dans le milieu réactionnel et élargir ainsi la gamme de concentration des alcaloïdes à tester lors de l'étude de l'interaction SAH-alcaloïdes.

Le problème qui se pose lorsqu'on ajoute de tels solvants dans le milieu aqueux de solubilisation des protéines, lors de cette étude, c'est leurs effets sur la conformation de la protéine, ce qui peut amener une interférence avec la liaison du ligand. Pour trouver le meilleur solvant qui affecte le moins la stabilité de la SAH, différents solvants

organiques à caractère plus ou moins polaire comme l'éthanol, le méthanol et le DMSO ont été testés à concentration ne dépassant pas 10%.

Les résultats obtenus ont montré que la SAH présente une meilleure stabilité en présence de 10% DMSO. En effet, l'absence de changement dans le spectre d'absorbance (figure 23) signifie que le DMSO à faible concentration ne provoque aucun changement de la conformation de la SAH. Bien qu'il soit un bon accepteur de protons, le DMSO n'a qu'une faible tendance à rompre les liaisons hydrogènes inter amides des protéines (Yon, 1969). Par contre, le méthanol et l'éthanol sont des agents dénaturants des protéines en contractant des liaisons hydrogènes avec certains groupement des protéines et/ou en modifiant les interactions établies entre l'eau de solvation et les résidus d'acide aminés de la protéine. Comme, Ils peuvent entraîner des effets importants sur la charge globale de la molécule (Singer, 1962). Par exemple l'éthanol, à concentration supérieur à 0,5M dénature la structure de la SAH, et à concentration inférieure de cette dernière interagit avec la SAH dans le site I (Anna et Zofia, 2007).

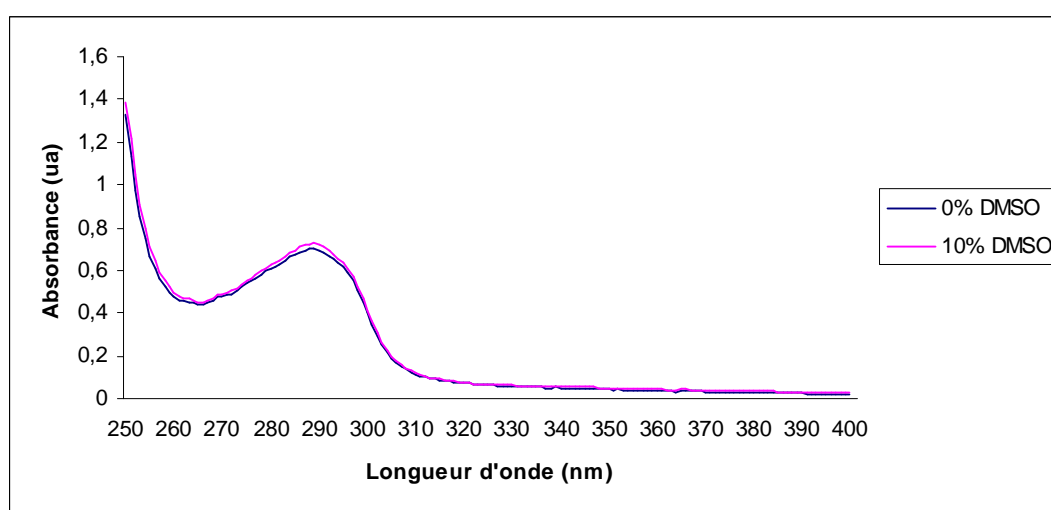


Figure 23: Spectre d'absorption de la SAH (1,36 mg/ml) dans un tampon phosphate (0,1M, PH 7) contenant 10% de DMSO après 24H.

II.3- Caractérisation de l'interaction SAH-damascénine

III.3.1- Stabilité de l'interaction SAH-damascénine

La méthode utilisée dans ce travail pour étudier l'interaction de la damascénine avec la SAH est celle de la mesure des spectres d'absorption différentiels qui résultent de la variation des propriétés d'absorbance de la SAH et/ou de la damascénine lors d'une interaction entre la protéine et le ligand. Les spectres d'absorption différentielle obtenus pour une concentration constante de la SAH (1,36mg/ml) et deux concentrations de damascénine (4,54µg/ml et 34µg/ml) après 5min d'incubation (figure 24) montrent une variation d'absorbance entre 260nm et 290nm d'une part et entre 305nm et 370nm d'autre part. Cette variation est d'autant plus grande que la concentration de la damascénine est élevée. Ce résultat est en faveur d'une interaction entre l'alcaloïde et la sérum albumine.

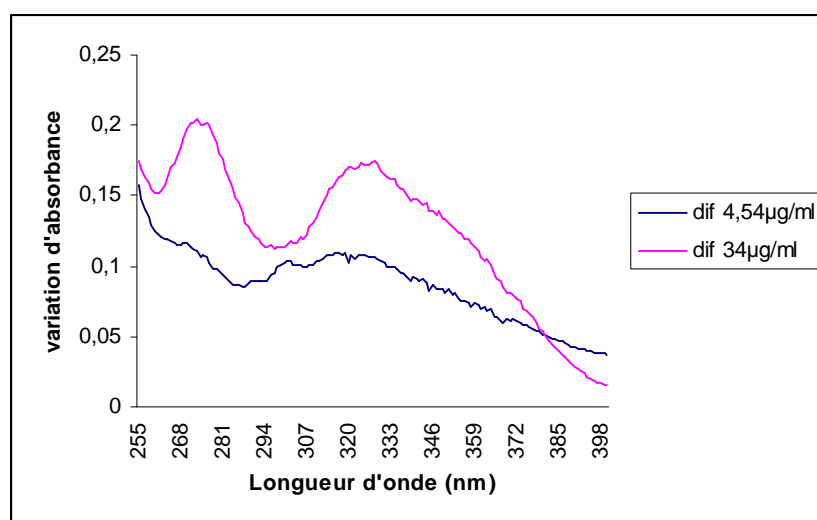


Figure 24 : Spectre différentiel entre la SAH native (1,36mg/ml) et la SAH en présence de 4,54µg /ml et 34µg/ml de damascénine.

D'autre part, la réaction d'interaction atteint l'équilibre rapidement dès les premières minutes et reste stable pendant au moins 24H. En effet, comme le montre la figure 25, aucun changement de spectre d'absorption n'est observé, aussi bien en

présence de 4,54 μ g/ml ou de 34 μ g/ml de damascenine, quelque soit le temps de réaction 5min, 2H ou 24H

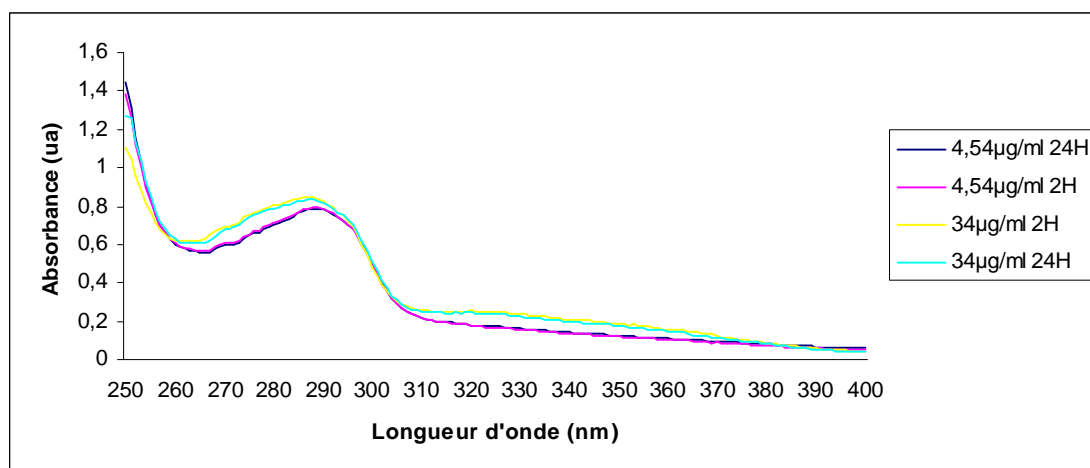


Figure 25 : Spectres d'absorption de la SAH (1,36 mg/ml) dans du tampon phosphate 0,1M et 10% de DMSO en présence de 4,54 μ g/ml et de 34 μ g/ml de damascenine après 2H et 24H d'incubation à température ambiante et à pH 7.

II.3.2- Effet de la concentration de la damascenine

Les spectres de différence d'absorbance dans l'UV de la SAH (1,36mg/ml) en présence de différentes concentrations de damascenine montrent une augmentation de l'intensité de l'absorption dans deux régions 250-300nm et 300-400nm (figure 26).

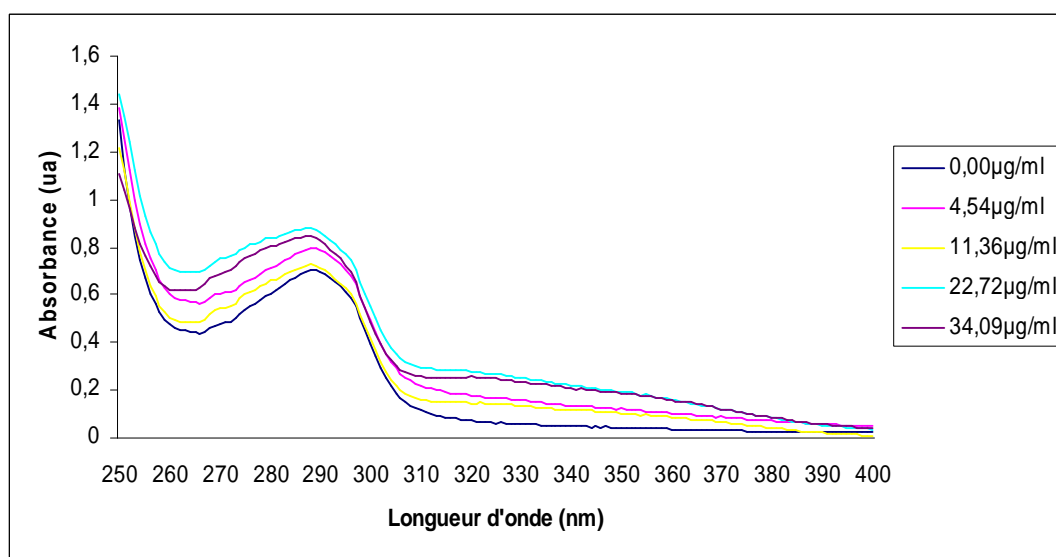


Figure 26: Spectre d'absorption du complexe SAH-damascenine (SAH 1,36 mg/ml dans un tampon phosphate (0,1M, PH 7)) en présence des différentes concentrations de la damascenine et contenant 10% de DMSO.

La région 250-300 nm présente une augmentation de l'absorbance sans aucun déplacement du maximum d'absorption à 289nm avec l'augmentation de la concentration de la damascenine. Dans cette région, la SAH aussi bien que la damascenine présente des propriétés d'absorption. L'augmentation de l'absorbance peut être due à une hyperchromie de la SAH dont l'interaction avec la damascenine induit un changement de conformation de la SAH qui expose plus le Trp vers la surface. Soit à l'hyperchromie de la damascenine qui se trouverait dans un environnement probablement plus apolaire constitué par le site de liaison de la protéine, d'où l'augmentation de son coefficient d'absorbance. Ou bien à un effet cumulatif des changements de conformation ou d'environnement des deux molécules impliquées dans l'interaction.

La seconde région du domaine de l'UV qui subit des modifications lors de l'interaction SAH-damascenine, c'est la région 300-400nm. L'absorbance augmente avec la concentration de la damascenine et un maximum d'absorbance tend à se former à 320nm pour de fortes concentrations de l'alcaloïde. Dans cette région ni la SAH, ni la damascenine n'absorbent lorsqu'elles sont solubilisées dans une solution aqueuse tamponnée. Par contre, la damascenine solubilisée dans l'éthanol présente une absorbance caractérisée par un maximum à 320 nm (figure 20). La bande d'absorption qui apparaît, donc, dans cette région résulte probablement de la liaison de la damascenine à un site apolaire de la SAH. Cette interaction pourrait être accompagnée d'un changement de configuration de la damascenine. En effet, le changement de conformation ou d'état des ligands lors de leurs interactions à l'albumine a été observée dans beaucoup de travaux (Tabachnick *et al.*, 1970 ; Raisonnier, 2002 ; Marion, 1976). Par exemple, l'interaction du bleu de Coomassie (N-4-4-Ethoxyphényle amino phényle-4-éthyle (3-sulfophényle) méthylamino phényle méthylène-2,5-cyclohexadien-1-ylidene-N-éthyl-3-sulfobenzéneméthan ammonium mono sodium) avec la sérum albumine bovine (SAB) provoque un déplacement d'équilibre de la forme anionique dont le maximum d'absorbance est à 465nm vers la forme cationique dont le maximum d'absorption est à

595nm d'où un déplacement du spectre du bleu de Coomassie vers les longueurs d'onde supérieures (effet bathochrome) (Marion, 1976).

II.3.3- Effet de la concentration de la SAH

La variation d'absorbance de la damascenine (20 μ g/ml) en présence de la SAH montre que l'intensité d'absorption de la damascenine dans la région 300-400nm augmente avec l'augmentation de la concentration de la SAH (figure 27). Plus la concentration de protéine est élevée plus un maximum d'absorbance à 320 nm se distingue et se précise.

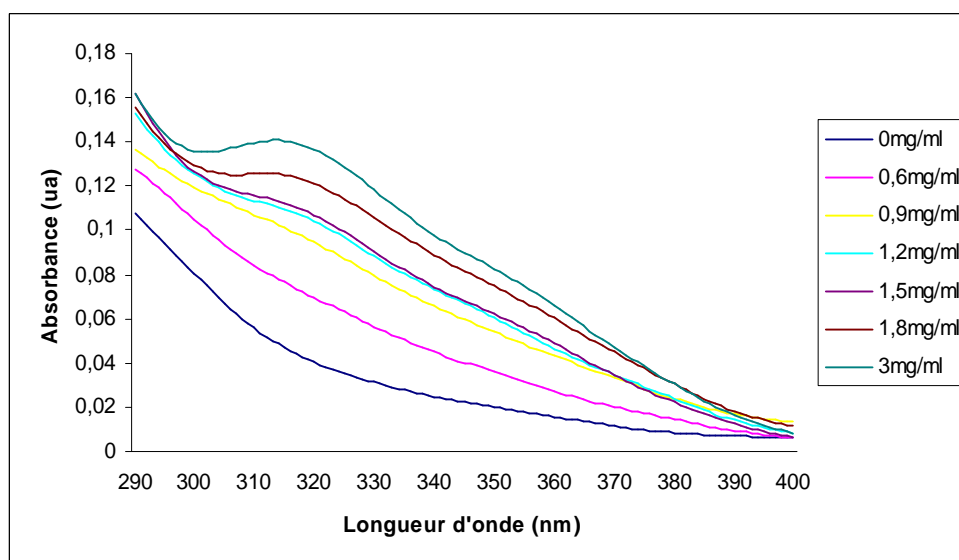


Figure 27: Spectre d'absorbance de la damascenine (20 μ g/ml) en fonctions de la concentration de la SAH (0- 3mg/ml) dans un tampon phosphate potassium (0,1M, pH 7) contenant 10% de DMSO. A température ambiante 20 \pm 2 $^{\circ}$ C.

La variation de l'absorbance maximal à 320nm en fonction de la concentration de la SAH montre une évolution hyperbolique (figure 28). Ce profil est caractéristique d'un phénomène de saturation de l'interaction SAH-damascenine. Il correspond à la fixation sur une seule catégorie de sites ; soit un seul site ou plusieurs sites indépendants et équivalents.

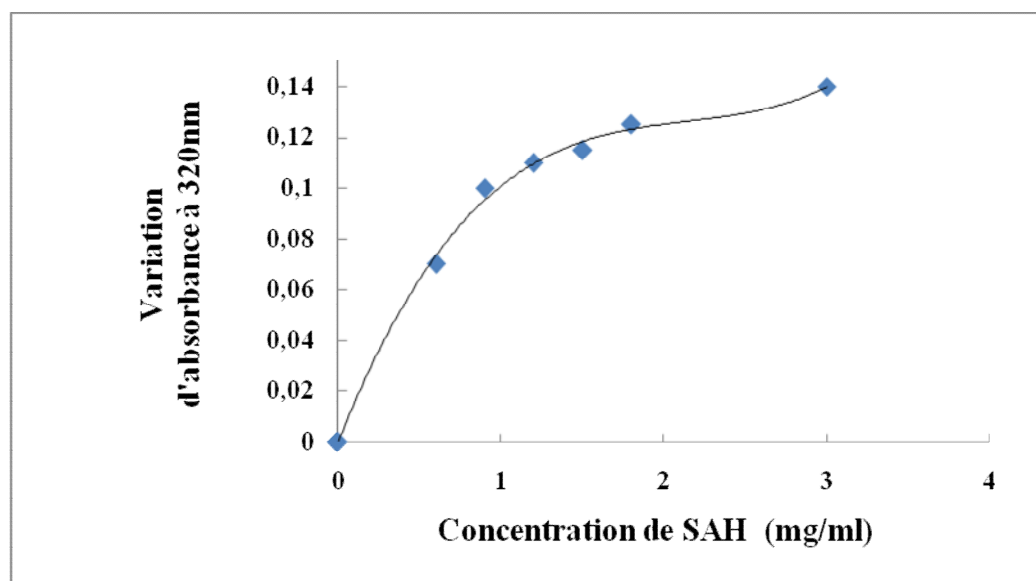


Figure 28: Absorbance de la damascenine (20 μ g/ml) à 320 nm en fonctions de la concentration de la SAH à 28 \pm 2 $^{\circ}$ C.

II.3.4- Effet du pH

L'influence du pH sur l'interaction SAH-damascenine a été suivie par mesure de la variation d'absorbance à 320 nm en fonction du pH pour une concentration de 1,36mg/ml de SAH et 40 μ g/ml de damascenine. Les résultats obtenus (figure 29) montrent qu'entre pH6 et pH9 l'absorbance ne varie pas. Ce qui indique, que dans la région du pH où la SAH est stable (Carter *et* Ho, 1994), son interaction avec la damascenine est pH-indépendante. Les liaisons entre la SAH et la damascenine ne sont donc pas principalement de type ionique. L'interaction SAH-damascenine semble donc dépendre davantage des interactions hydrophobes ou de van der Waals. La liaison avec l'albumine où les interactions hydrophobes sont majoritaires ont été observées avec différents alcaloïdes (Yan-Qing *et al.*, 2007 ; Ying *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007 ; Hairong *et al.*, 2008).

A pH 4, une légère augmentation d'absorbance est observée, les forces électrostatiques semblent plus impliquées dans l'interaction à ce pH. Cet effet résulterait probablement du relâchement de la conformation de la SAH (Carter *et* Ho, 1994) qui renforcerait la liaison de la damascenine sur son site.

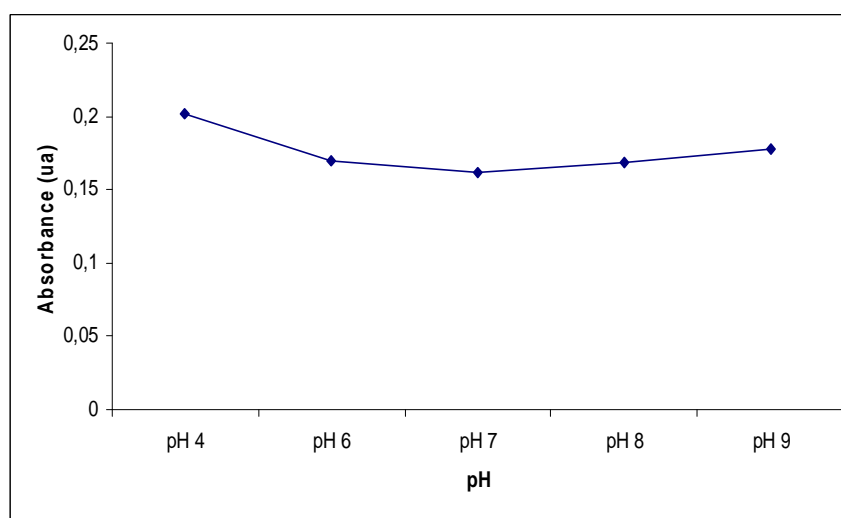


Figure 29: Absorbance du complexe SAH-damascenine à 320 nm en fonction du pH dans du tampon phosphate 0,1M. La concentration de SAH est 1,36 mg/ml et celle de la damascenine 40 μ g/ml.

Si les forces qui régissent l'interaction SAH avec la damascenine peuvent être de type hydrophobe ou électrostatique, la damascenine, un 3-Méthoxy-2-(méthylamino) acide benzoïque méthyle ester posséderait donc les critères structuraux, pour se lier préférentiellement au site II de la SAH. Le site II (site indole benzodiazépine) localisé dans une poche hydrophobe du sous domaine IIIa (Watanabe *et al.*, 2000) lie souvent des ligands de type acides carboxyliques aromatiques avec un groupe acide chargé négativement dans l'extrémité de la molécule et séparé par un centre hydrophobe (Masaki, 2005) principalement par des interactions hydrophobes et participation de liaisons polaires.

II.3.5- Effet des ions

L'effet de trois sels différents, NaCl, Na₂SO₄ et KI, à concentration constante (0,15M) sur le complexe SAH-damascenine a été suivi à différentes concentrations de SAH. Les résultats obtenus (figure 30) montrent que les différents sels à concentration 0,15M influencent différemment la formation du complexe SAH-damascenine.

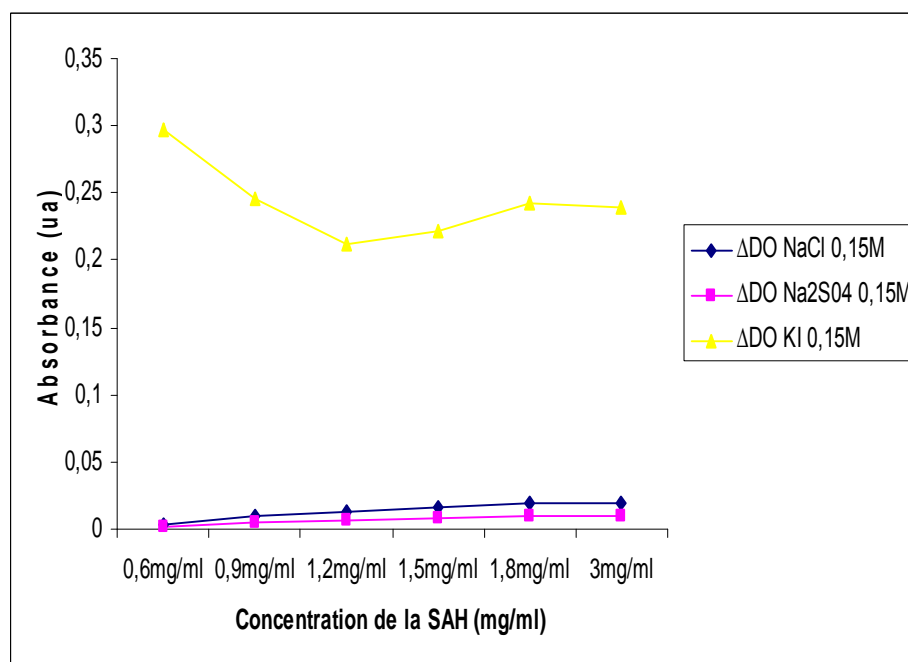


Figure 30: Variation d'absorbance à 320nm de la damascenine (40µg/ml) à différentes concentrations de la SAH en présence de NaCl (trait bleu), Na₂SO₄ (trait rose) et du KI (trait jaune) à concentration de 0,15M.

Le NaCl comme le Na₂SO₄ inhibent presque complètement la liaison de la damascenine à la SAH. En effet, l'absorbance à 320nm qui est proportionnelle à la fraction de la damascenine complexée n'augmente pas avec la concentration de la protéine. Le NaCl et le Na₂SO₄ favorisent donc la dissociation du complexe SAH-damascenine par liaison probablement des anions Cl⁻ et SO₄²⁻ sur la protéine au niveau ou au voisinage du site de liaison du ligand provoquant ainsi une diminution de la constante d'association. En effet, il a été démontré qu'à pH7, les cations Na⁺ ne se fixent pas sur l'albumine (Norne *et al.*, 1975 ; Connors, 1987), alors que l'anion Cl⁻

interagit avec l'albumine (Norne *et al.*, 1975 ; Halle et Lindman, 1978) au niveau du site II (Omran *et al.*, 2006). Des résultats similaires ont été observé lors de travaux d'étude d'interaction de ligand spécifique du site II de la SAH. Par exemple, les constantes d'association du shikonine (un alcaloïde anti-inflammatoire) à la SAH (Wenyong *et al.*, 2005) et des phénothiazines avec la SAB (Omran *et al.*, 2006) sont diminuées par l'anion Cl⁻.

Puisque le Na₂SO₄ présente le même effet que le NaCl, l'effet favorisant la dissociation du complexe SAH-damascenine est probablement dû à l'anion SO₄²⁻. La diminution de l'association résulte probablement d'une compétition de liaison entre ces anions et la damascenine pour le site II, ce qui est en faveur de l'implication des interactions de type polaire.

L'effet du KI sur l'association damascenine-SAH est différent de celui du NaCl et du Na₂SO₄. A faible concentration de protéine (inférieure à 1,2mg/ml), il semblerait que le KI favorise une meilleur association de la damascenine à la SAH. Alors qu'à concentrations de SAH plus élevée (supérieure à 1,2mg/ml), le KI ne semble pas avoir d'effet sur la liaison de damascenine à la SAH (figure 30). En raison des propriétés identiques du NaCl et du KI, l'iodure de potassium devaient avoir le même effet défavorisant l'association de la damascenine à la SAH que le NaCl. En effet, il a été démontré qu'à pH 7, les K⁺ ne se lient pas à l'albumine (Niels, 1993) et que l'anion I⁻ (Norne *et al.*, 1975 ; Inagaki *et al.*, 2000) se lie à l'albumine au niveau du site II (Omran *et al.*, 2006) mais plus fortement et avec une meilleur capacité de liaison que l'anion Cl⁻ (Norne *et al.*, 1975) et diminue la constante de certains complexes albumine-ligands (Hairong *et al.*, 2008; Omran *et al.*, 2006). Cependant, les résultats obtenus montrent que le KI présente un effet complètement différent sur l'interaction damascenine-SAH. En effet, l'étude par mesure du spectre d'absorbance de l'effet du KI, NaCl et Na₂SO₄ sur la damascenine montre que seul le KI interfère avec les propriétés spectrales de cet alcaloïde. En effet, l'absorbance à 320nm de la damascenine libre (40µg/ml) en présence des différentes concentrations des deux sels NaCl et Na₂SO₄ ne varie pas significativement alors que le KI provoque une augmentation de l'absorbance de l'alcaloïde qui augmente avec la concentration du KI

(figure 31). Ceci résulterait probablement de la complexation de l'ion I^- à l'alcaloïde par liaison à l'azote de sa fonction méthylamine (Hiroshi *et al.*, 1960 ; Absil *et al.*, 1983).

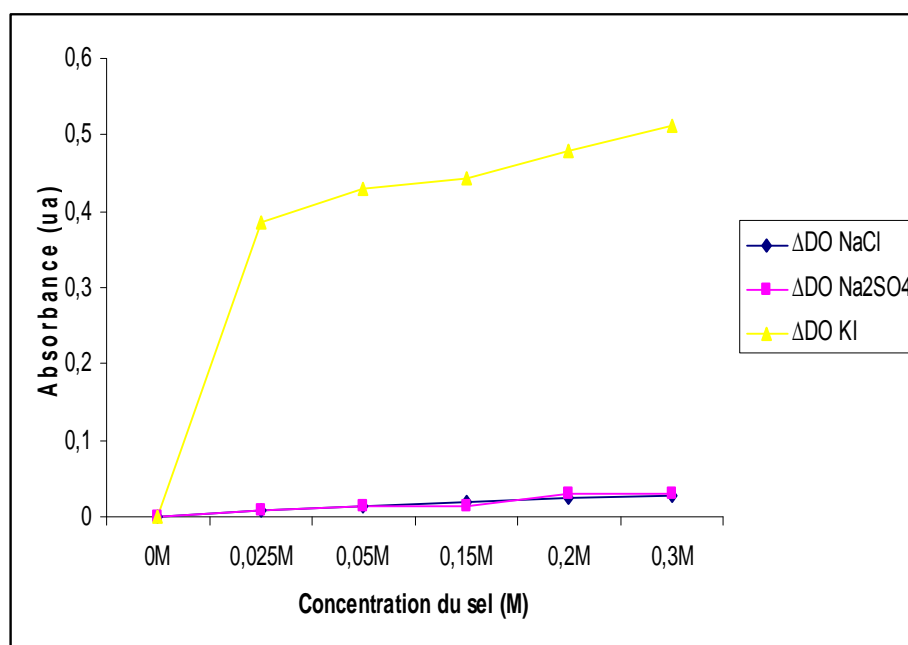
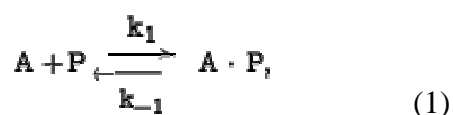


Figure 31: Variation de l'absorbance à 320 nm de la damascenine (40 μ g/ml) solubilisée dans du tampon phosphate de potassium 0,1M, pH 7 contenant 10% de DMSO en présence de différentes concentrations de NaCl (trait bleu), Na₂SO₄ (trait rose) ou KI (trait jaune).

II.4-Cinétique et thermodynamique de la liaison damascenine-SAH

La liaison de la damascenine (A) à la SAH (P) peut être décrite par la relation suivante :



Où les constants k_1 et k_{-1} représentent respectivement la constante de vitesse d'association et la constante de vitesse de dissociation. La constante de dissociation de cette interaction à l'équilibre est définie par :

$$K_d = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[A][P]}{[AP]} \quad (2)$$

La constante K_d , exprimée en unité molaire, permet d'évaluer la force et la demi-vie moyenne de cette interaction. Plus la valeur de K_d est faible, plus l'interaction est forte et la durée d'immobilisation du composé A dans le site de liaison de la protéine P est longue. En général, une forte interaction augmente la probabilité pour que les conséquences structurale, dynamique et fonctionnelle de l'interaction entre A et P aient lieu.

Pour estimer les constantes microscopiques (k_1 et k_{-1}) et macroscopiques (K_d) et déterminer ainsi la cinétique et la thermodynamique de la réaction d'association damascenine-SAH, les variations de concentration de damascenine liée en fonction de la concentration de la SAH ont été mesurées à différentes températures.

II.4.1-Cinétique à l'équilibre

La variation de la concentration de la damascenine complexée (ΔDO à 320nm) en fonction de la concentration de la SAH à différentes températures (figure 32) montre que quelque soit la température à laquelle la réaction d'association a eu lieu, la formation du complexe SAH-damascenine (variation de l'absorbance) varie d'une manière

hyperbolique avec la concentration de la SAH. La relation entre la concentration du complexe (AP) et la concentration de la SAH (P), s'écrit donc :

$$(AP) = \frac{\alpha (P)}{EC_{50} + (P)} \dots\dots\dots (3)$$

Où α représente la concentration maximale du complexe formé (A)_T et EC₅₀ représente la concentration de SAH qui lie 50% de damascenine.

L'évolution hyperbolique du complexe formé en fonction de la concentration de la protéine montre que la SAH lie la damascenine sur un seul site ou sur plusieurs sites de liaisons équivalents et indépendants. D'autre part, l'évaluation des EC₅₀ aux différentes températures (tableau V) en utilisant la représentation graphique de Benesi-Hildebrand (annexe) (Benesi and Hildebrand, 1949) montre que la liaison de la damascenine à l'albumine diminue avec l'augmentation de la température indiquant que le SAH-damascenine est d'autant plus instable que la température est élevée.

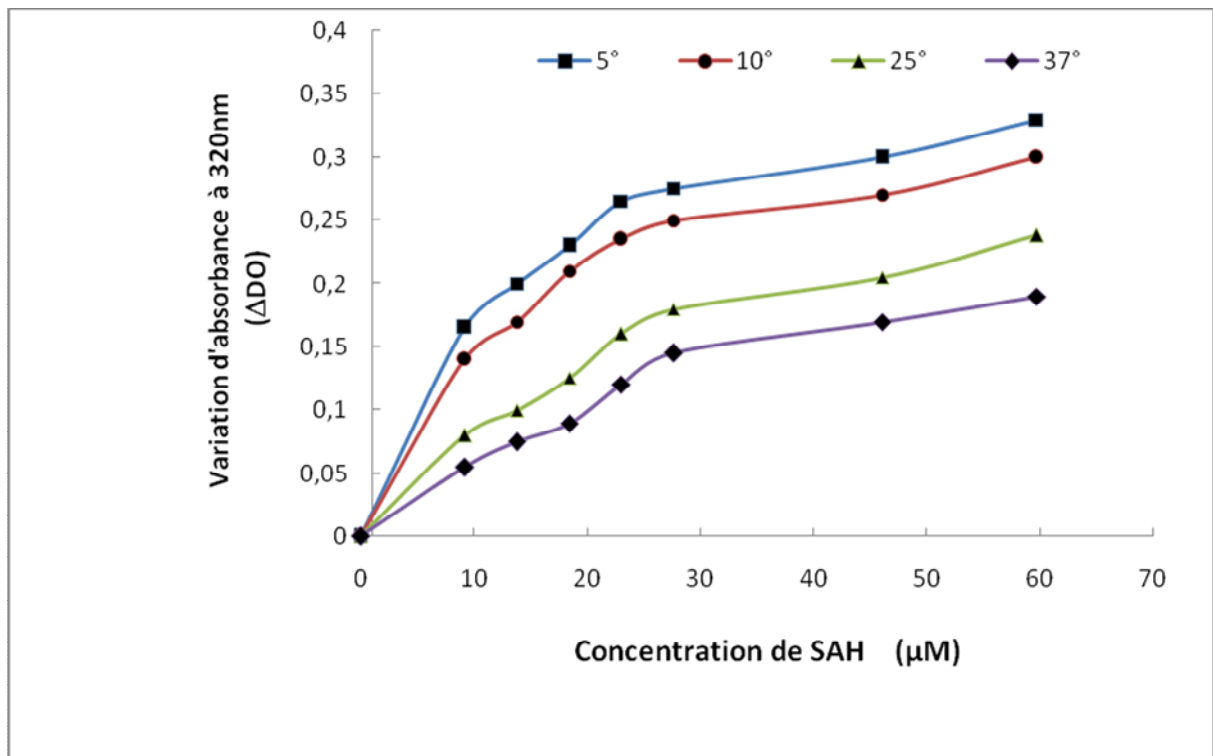


Figure 32: Variation de l'absorbance à 320 nm de la damascenine complexée (à différentes concentrations de la SAH) en fonction de la température.

Si on assume que la damascenine se lie sur un seul site, on peut supposer que la constante de dissociation K_d est approximativement voisine de EC_{50} . Ce type d'approximation a été effectué dans le cas de l'étude de l'interaction du halothane, un anesthésiant, à la SAH (Franks *et Lieb*, 1993, Eckenhoff *et Johansson*, 1997).

En utilisant ces K_d apparents et en assumant que la constante de vitesse d'association (k_1) est limitée par la diffusion (limitée seulement par le temps requis pour la collision des réactants via la diffusion) et qui pour une protéine et des petits ligands est de $\sim 10^9 M^{-1} \cdot sec^{-1}$, les constantes de vitesse de dissociation (k_{-1}) du complexe damascenine-SAH calculées sont donc de ~ 13 à $75 \cdot 10^3 sec^{-1}$, ce qui implique que les sites de liaisons sont occupés durant 53 à 90 μsec .

En comparant la damascenine à d'autres ligands à haute affinité tels que les catécholamines ou les hormones peptidiques ($K_d \sim 2-10$ nM) qui occupent les sites de liaison de la SAH pendant quelques minutes (Cooper *et al.*, 1982), on en déduit que les interactions de liaisons de la damascenine sont faibles. Cependant, la constante de dissociation du complexe damascenine-SAH est de même ordre de grandeurs (μM) que les constantes de dissociations des complexes formés entre la SAH et les ligands d'origine végétale comme les flavonoïdes ou les alcaloïdes. (Watanab *et al.*, 2001 ; Wenying *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2006 ; Soskic *et Magnus*, 2007 ; Wang *et al.*, 2007).

Tableau V : Constantes de dissociations apparentes et variations de l'énergie libre de Gibbs de la liaison damascenine-SAH à différentes températures.

Températures °C	5	10	25	37
$EC_{50} \approx K_d$ (μM)	13,44	17,7	42,3	74,3
ΔG°_{app} KJ/mol	-25,926	-25,735	- 24,950	-24,503

II.4.2-Thermodynamiques et forces de liaison

La mesure des paramètres énergétiques permet de caractériser la thermodynamique du phénomène d'interaction damascenine-SAH. En effet, la grandeur de la variation de

l'énergie libre (ΔG) entre l'état libre et lié permet de déterminer la stabilité et la puissance alors que l'enthalpie (ΔH) ou de l'entropie (ΔS) permettent de caractériser les forces et les groupes responsables de cette interaction.

Les variations de l'énergie libre de Gibbs associé à la liaison de la damascenine à la SAH sont calculées à partir des valeurs de constants de dissociations apparentes (K_d) selon la relation :

$$\Delta G^\circ = RT \ln K_d, \quad (4)$$

Où R est la constante des gaz et T est la température absolue à pH 7 et sous condition de molarité standards.

La variation de l'énergie libre du processus d'association étant négative $-24,5\text{KJ/mol}$ à $-25,9\text{KJ/mol}$ (tableau V) montre que la liaison de la damascenine est un phénomène spontané thermodynamiquement favorable (Tian *et al.*, 2004).

Les mesures des variations d'enthalpie (ΔH°) et d'entropie (ΔS°) permettent de déterminer les types d'interactions associées au processus d'association protéine-ligands (Testa *et al.*, 1987; Raffa and Porreca, 1989). En supposant que l'enthalpie et l'entropie ne varient pas significativement dans l'intervalle de température étudié, les valeurs de ΔH° et de ΔS° sont déterminée à partir de l'équation intégrée de Van't Hoff :

$$\ln K_d = \frac{\Delta H^\circ}{RT} - \frac{\Delta S^\circ}{R}, \quad (5)$$

La représentation graphique de $\ln K_d$ en fonction de T^{-1} (figure 33) permet de calculer ΔH° et ΔS° à partir la pente ($\Delta H^\circ / R$) et de l'ordonnée à l'origine ($\Delta S^\circ / R$), qui sont respectivement de $-38,776 \text{ KJ/mol}$ et $-46,21 \text{ J/mol}$. Ces valeurs montrent que le processus d'association de l'alcaloïde avec l'albumine est enthalpiquement favorable (ΔH négative) et entropiquement défavorable (ΔS négative)

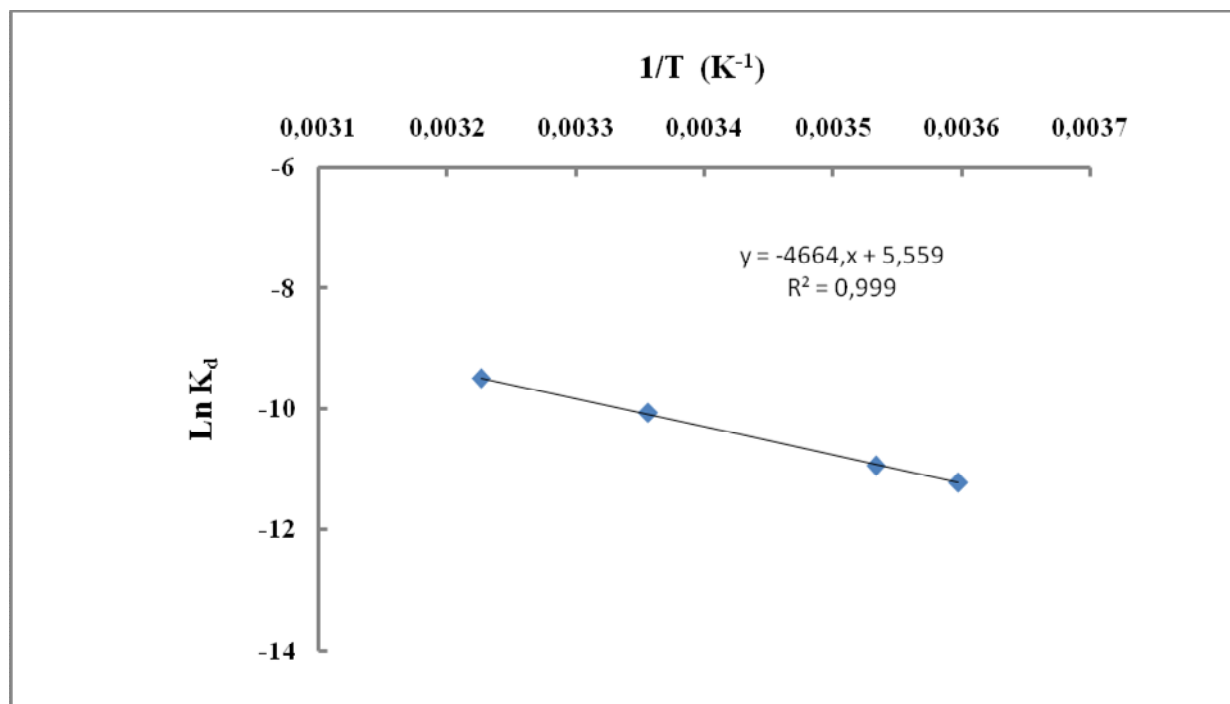


Figure 33 : Représentation graphique de Van't Hoff : $\text{Ln } K_{d \text{ app}} = \text{fonction } 1/T$
(T et K_d représentent respectivement la température et la constante de dissociation)

Le signe et l'ordre de grandeur des paramètres thermodynamiques sont associées avec les différents types d'interactions non covalentes des ligands aux protéines ; liaisons hydrogène, forces de van der Waals, interactions électrostatiques et interactions hydrophobes (Koltz, 1973). Les valeurs positives de ΔH° et ΔS° indiquent fréquemment que les interactions mises en place sont de type hydrophobe alors que les interactions de van der Waals sont caractérisées par une valeur négative de ΔH° et de ΔS° tandis qu'une ΔH° négative correspond à des interactions électrostatiques (Ross et Subramanian, 1981 ; Ying *et al.*, 2005). L'association de la damascenine à la SAH met en jeu une variation d'enthalpie négative et une variation d'entropie négative ce qui indique que les interactions d'association sont majoritairement de type van der Waals et renforcées probablement des liaisons hydrogène.

L'analyse quantitative et qualitative de l'extrait d'alcaloïde de *Nigella damascena* par RP-HPLC montre la présence d'une fraction majoritaire dont le temps de rétention est de 3,34 minutes et le profil chromatographique de CCM sur gel de silice avec comme éluant le mélange de dichlorométhane/ méthanol /eau distingue une seule tache de R_f égal à 0,82. Les résultats des analyses effectuées par HPLC, CCM et spectroscopie UV-visible sur la graine de *Nigella damascena* indiquent qu'elles contiennent une fraction alcaloïdique majoritaire qui ne peut être que la damascenine.

La réalisation des études de l'interaction protéines-ligands nécessite l'application de méthodes sophistiquées plus précises, sensible et plus efficace tels que la fluorospectroscopie, le dichroïsme circulaire, la spectroscopie infrarouge et la microcalorimétrie. Pour déterminer l'interaction de la SAH avec la damascenine, nous avons utilisé la spectrophotométrie d'absorbance. Bien qu'elle soit moins sensible, elle est simple, rapide et disponible et nous a permis de caractériser et d'estimer les paramètres cinétiques et thermodynamiques de l'association de la damascenine à la SAH. Les résultats obtenus montrent que la SAH interagit avec la damascenine sur un seul type de site. L'affinité de liaison est évaluée par la constante de dissociation apparente, $K_{d\text{ app}}$. Les valeurs des $K_{d\text{ app}}$ mesurées aux températures 278K, 283K, 298K et 310K sont respectivement 13,44 μ M, 17,7 μ M, 42,3 μ M et 74,3 μ M. Les fonctions thermodynamiques standards, $\Delta H^\circ_{\text{app}}$ et $\Delta S^\circ_{\text{app}}$ du processus d'association de l'alcaloïde avec l'albumine, déterminées à partir de la représentation graphique de l'équation de Van't Hoff sont respectivement de -38,776 KJ/mol et - 46,21 J/mol. Ces valeurs indiquent que les interactions de stabilisation du complexe damascenine-SAH sont majoritairement de type van der Waals et impliquent probablement des liaisons hydrogène. En plus, l'étude de l'effet des ions sur le complexe SAH-damascenine montre que le NaCl et le Na₂SO₄ favorisent la dissociation du complexe SAH-damascenine par liaison probablement des anions Cl⁻ et SO₄²⁻ sur la protéine au niveau ou au voisinage du site de liaison du ligand, ce qui est en faveur de l'implication des interaction de type polaires. L'effet du KI sur l'association damascenine-SAH est différent de celui du NaCl et du Na₂SO₄ et ceci ressemblerait

probablement de la complexation de l'ion Γ^- à l'alcaloïde par liaison à l'azote de sa fonction méthylamine.

L'étude de l'association des drogues quelque soit leur origine, avec la sérum albumine présente un grand intérêt dans les domaines physiologique, pharmacologique et biochimique. En raison de l'importance des substances bioactives d'origine végétale dans l'application thérapeutique, il serait intéressant d'approfondir l'aspect de l'interaction de la damascenine ou autre métabolite secondaire de la nigelle par des techniques plus poussées comme la spectroscopie de fluorescence, de masse et infrarouge, la microcalorimétrie ainsi que par le dichroïsme circulaire afin de dévoiler le mécanisme qui régit l'interaction de cette molécule à l'albumine, le ou les sites de liaison et les changements structuraux que peuvent produire ces interactions.

Conclusion

L'analyse quantitative et qualitative de l'extrait d'alcaloïde de *Nigella damascena* par RP-HPLC montre la présence d'une fraction majoritaire dont le temps de rétention est de 3,34 minutes et le profil chromatographique de CCM sur gel de silice avec comme éluant le mélange de dichlorométhane/ méthanol /eau distingue une seule tache de R_f égal à 0,82. Les résultats des analyses effectuées par HPLC, CCM et spectroscopie UV-visible sur la graine de *Nigella damascena* indiquent qu'elles contiennent une fraction alcaloïdique majoritaire qui ne peut être que la damascenine.

La réalisation des études de l'interaction protéines-ligands nécessite l'application de méthodes sophistiquées plus précises, sensible et plus efficace tels que la fluorospectroscopie, le dichroïsme circulaire, la spectroscopie infrarouge et la microcalorimétrie. Pour déterminer l'interaction de la SAH avec la damascenine, nous avons utilisé la spectrophotométrie d'absorbance. Bien qu'elle soit moins sensible, elle est simple, rapide et disponible et nous a permis de caractériser et d'estimer les paramètres cinétiques et thermodynamiques de l'association de la damascenine à la SAH. Les résultats obtenus montrent que la SAH interagit avec la damascenine sur un seul type de site. L'affinité de liaison est évaluée par la constante de dissociation apparente, $K_{d\text{ app}}$. Les valeurs des $K_{d\text{ app}}$ mesurées aux températures 278K, 283K, 298K et 310K sont respectivement 13,44 μ M, 17,7 μ M, 42,3 μ M et 74,3 μ M. Les fonctions thermodynamiques standards, $\Delta H^\circ\text{app}$ et $\Delta S^\circ\text{app}$ du processus d'association de l'alcaloïde avec l'albumine, déterminées à partir de la représentation graphique de l'équation de Van't Hoff sont respectivement de -38,776 KJ/mol et - 46,21 J/mol. Ces valeurs indiquent que les interactions de stabilisation du complexe damascenine-SAH sont majoritairement de type van der Waals et impliquent probablement des liaisons hydrogène. En plus, l'étude de l'effet des ions sur le complexe SAH-damascenine montre que le NaCl et le Na₂SO₄ favorisent la dissociation du complexe SAH-damascenine par liaison probablement des anions Cl⁻ et SO₄²⁻ sur la protéine au niveau ou au voisinage du site de liaison du ligand, ce qui est en faveur de l'implication des interaction de type polaires. L'effet du KI sur l'association damascenine-SAH est différent de celui du NaCl et du Na₂SO₄ et ceci ressemblerait

probablement de la complexation de l'ion Γ^- à l'alcaloïde par liaison à l'azote de sa fonction méthylamine.

L'étude de l'association des drogues quelque soit leur origine, avec la sérum albumine présente un grand intérêt dans les domaines physiologique, pharmacologique et biochimique. En raison de l'importance des substances bioactives d'origine végétale dans l'application thérapeutique, il serait intéressant d'approfondir l'aspect de l'interaction de la damascenine ou autre métabolite secondaire de la nigelle par des techniques plus poussées comme la spectroscopie de fluorescence, de masse et infrarouge, la microcalorimétrie ainsi que par le dichroïsme circulaire afin de dévoiler le mécanisme qui régit l'interaction de cette molécule à l'albumine, le ou les sites de liaison et les changements structuraux que peuvent produire ces interactions.

Références Bibliographiques

- **Absil A-C.; Buxeraud J. & Raby C. (1984)** : Complexation par transfert de charge de la chlorpromazine en présence d'iode; action thyroïdienne secondaire de cette molécule. *Can. J. Chem*, 62: 1807-1811.
- **Agradi E.; Fico G.; Cillo F.; Fransisci C. & Tomé F. (2001)**: Estrogenic activity of phenolic compounds from *Nigella damascena* evaluated using recombinant yeast screen. *Planta Med.*, 67: 553-555.
- **Agradi E.; Fico G.; Cillo F.; Fransisci C. & Tomé F. (2002)**: Estrogenic activity of *Nigella damascena* extracts, evaluated using a recombinant yeast screen. *Phytother. Res.*, 16: 414–416.
- **Aki H. & Yamamoto M. (1989)**: Thermodynamics of the binding of the phenothiazines to human plasma, human serum albumin and alpha 1-acid glycoprotein: a calorimetric study. *J.Pharm.Pharmacol.*, 41 (10): 674-679.
- **Andreas G.H. & Oeggl K. (2005)**: The oldest evidence of *Nigella damascena* L. (Ranunculaceae) and its possible introduction to central Europe. *Veget. Hist. Archaeobot*, 14: 562–570.
- **Anna M. & Zofia D. (2007)**: Effect of ethanol on the thermal stability of human serum albumin. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 88 (2): 449–454.
- **Aoki K. & Foster J. F. (1957)**: Electrophoretic and hydrogen ion binding behavior of bovine plasma albumin in the presence of 0.02 M thiocyanate ion. *J. Am. Chem. Soc.*, 79: 3393-3396.
- **Atta-Ur-Rahman.; Malik S.; Cun-heng H. & Clardy J. (1985)**: Isolation and structure determination of nigellicine, a novel alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Tetrahedron Lett.*, 26: 2759-2762.
- **Atta-Ur-Rahman.; Malik S. & Zaman K. (1992)**: Nigellimine: a new isoquinoline alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Journal of Natural Products*, 55: 676-678.
- **Atta-Ur-Rahman.; Malik S.; Hasan S.S.; Choudhary M.I.; Ni C-Z. & Clardy J. (1995)**: Nigellidine: a new indazol alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Tetrahedron Lett.*, 36: 1993-1996.

- **Benesi H. A. & Hildebrand J. H. (1949):** The Benesi-Hildebrand Method for determination of K_f for DA association and \square Values for DA CT absorption. *J. Am. Chem. Soc.*, 71: 2703.
- **Bennhold H. (1961):** Das menschliche Serumalbumin. *Bull. Schweiz. Akad. Med. Wissensch.*, 17 : 62-76.
- **Brennan S.O. & George P.M. (2000):** Three truncated forms of serum albumin associated with pancreatic pseudocyst. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1481: 337-343.
- **Brennan S.O.; Peach R.J. & Boswell D.R. (1989):** Novel human proalbumin variant with intact dibasic sequence facilitates identification of its converting enzyme. *Biochim. Biophys. Acta.*, 993: 48-50.
- **Brewer J.M.; Bastiaens P. & Lee J. (1987):** Fluorescence lifetime and spectral study of the acid expansion of bovine serum albumin. *Biophys. Chem.*, 28: 77-88.
- **Brückner C. (1993):** A survey on herbal galactagogue used in Europe. *Actes du 2ème Colloque Européen d'Ethnopharmacologie et de la 11^{ème} Conférence internationale d'Ethnomédecine, Heidelberg, 24-27 mars 1993.* P 140-145.
- **Bruneton J. (1987):** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 1^{ère} Edition Technique et Documentation Lavoisier, P 585.
- **Bruneton J. (1999):** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3^{ème} Edition Technique et Documentation Lavoisier: 784-873.
- **Carter D.C & Ho J.X. (1994):** Structure of serum albumin. *Adv. Protein Chem.*, 45: 153-204.
- **Cheikh-Rouhou S.; Besbes S.; Hentati B.; Blecker C.; Deroanne C. & Attia H. (2007):** *Nigella sativa* L: Chemical composition and Physico- chemical characteristics of lipid fraction. *Food Chemistry*, 101: 673-681.
- **Chilom C.G.; Craescu C.T. & Popescu A.I. (2006):** Parameters of interaction between proteins and their specific ligands, deduced by Isothermal Titration Calorimetry. *Rom. Journ. Phys.*, 51 (3-4): 443-457.

- **Clark A.H.; Saunderson D.H. & Suggett A. (1981):** Infrared and laser-Raman spectroscopic studies of thermally-induced globular protein gels. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 17: 353-364.
- **Connors K.A. (1987):** Binding constants. *John Wiley and Sons*, New York, pp: 142-147.
- **Cooper J.R.; Bloom F.E. & Roth R.H. (1982):** The Biochemical Basis of Neuropharmacology, Ed. Oxford University Press, New York, p73.
- **Cordell A.G.; Quinn-Bettie L.M. & Farnsworth N.R. (2001):** The potential of alkaloids in drug discovery. *Phytother.Res.*, 15: 183-205.
- **Cui F.L.; Fan J.; Ma D.L.; Liu M.C.; Chen X.G. & Hu Z.D. (2003):** A study of the interaction between a new reagent and serum albumin by fluorescence spectroscopy. *Anal. Lett.*, 36 (10): 2151–2166.
- **Cui F.L.; Fan J.; Ping Li J. & Hu Z. (2004):** Interactions between 1-benzoyl-4-*p*-chlorophenyl thiosemicarbazide and serum albumin: investigation by fluorescence spectroscopy. *Bioorg. Med. Chem.*, 12: 151–157.
- **Diane N. & Yves S. (2007):** Les jardins de grand portage, Catalogue de semences biologiques et activité. P12.
- **Dockal M.; Carter D.C. & Ruker F. (1999):** Molecular Structure of the Human Albumin Gene Is Revealed by Nucleotide Sequence within 911-22 of Chromosome 4. *The Journal of Biological Chemistry*, 274 (41): 29303–29310.
- **Dugaiczky A.; Law S.W. & Dennison O.E. (1982):** Nucleotide sequence and the encoded amino acids of human serum albumin mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79: 71-75.
- **Eckenhoff R.G. & Johansson J.S. (1997):** Molecular Interactions Between Inhaled Anesthetics and Proteins. *Pharmacological reviews*, 49(4): 343-368
- **Edward L.; Leo M. & Jan D.S. (1954):** The biogenesis of alkaloids, a study of the biosynthesis of damascenine and trigonelline. *Canadian Journal of Chemistry*, 33: 405-410.

- **Era S.; Itoh K.B.; Sogami M.; Kuwata K.; Iwama T.; Yamada H. & Watari H. (1990):** Structural transition of bovine plasma albumin in the alkaline region the N-B transition. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 35: 1-11.
- **Fico G. & Tomè F. (1998a):** Alkaloids content in the ripening seeds of *Nigella damascena*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 6, 1: 70-79.
- **Fico G. & Tome F. (1998b):** Alkaloids in *Nigella damascena* seeds: An hypothesis on their biological role. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 6, 1: 13-20.
- **Fico G.; Braca A.; Tomè F. & Morelli I. (2001):** A new phenolic compound from *Nigella damascena* seeds. *Fitoterapia*, 72: 462-463.
- **Fico G.; Panizzi L.; Flamini G.; Braca A.; Morelli I.; Tomè F. & Cioni P. L. (2004):** Biological screening of *Nigella damascena* for antimicrobial and molluscicidal activities. *Phytother. Res.*, 18: 468-470.
- **Franks N.P. & Lieb W.R. (1993):** Selective actions of volatile general anaesthetics at molecular and cellular levels. *Br. J. Anaesth.* 71: 65-76.
- **Ghedira K. (2006):** La nigelle cultivée: *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae)-*Phytothérapie*, 5 : 220-226.
- **Giepmans B.N.; Adams S.R.; Ellisman M.H. & Tsien R.Y. (2006):** The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science*, 312(5771): 217-224.
- **Guignard J.L. (2000):** Les alcaloïdes. Dans : Abrégés de Biochimie Végétale. 2^{ème} Edition Dunod, pp : 171-209
- **Guignard J.L. (2001) :** Dans « Botanique systématique moléculaire ». 12^{ème} Edition Masson, Paris, p 304.
- **Guignard J.L. (1979):** Les alcaloïdes. Dans : Abrégés de Biochimie Végétale. Edition Masson.
- **Hairong Z.; Hedong B.; Qing Y.; Hong L. & Zhenfeng C. (2008):** Interaction of Simomenine with bovine Serum Albumin. *International Journal of Integrative Biology*, 4 (1): 21-27.
- **Halle B. & Lindman B. (1978):** Chloride ion binding to human plasma albumin from chlorine-35 quadrupole relaxation. *Biochemistry*, 17: 3774-3781.

- **Heinz L.; Klaus M. & Albercht Z. (2001)** : Distribution dans l'organisme. Dans « Atlas de poche de pharmacologie » 2^{ème} édition Médecine-Sciences. Flammarion, Paris, p 30.
- **Hiroshi Y.; Jiro T. & Saburo N. (1960)**: Change-transfer complexes between Iodine and various aliphatic amines. *J.Chem.Phys.*, 33 (12): 1660-1667.
- **Honoré B. (1990)**: Conformational changes in human serum albumin induced by ligand binding. *Pharmacol. Toxicol.*, 66 (2): 7-26.
- **Inagaki K.; Umemura T.; Matsuura H. & Haraguchi H. (2000)**: speciation of trace elements binding and non-binding with proteins in human blood serum by surfactant-mediated HPLC with element selective detection by ICP-MS. *Anal. Sci.*, 16: 787-788.
- **Jin J. & Zhang X. (2007)**: Spectrophotometric studies on the interaction between pazufloxacin mesilate and human serum albumin or lysozyme. *Journal of Luminescence* , 128(1): 81-86.
- **Khan Akram M. (1999)**: Chemical composition and medicinal properties of *Nigella sativa* L. *Inflammopharmacology*, 7 (1): 15-35.
- **Kitson T.M. (2004)**: Spectrophotometric and Kinetic Studies on the Binding of the Biflavonoid Quercetin to Bovine Serum Albumin. *Biosci.Biotechnol. Biochem.*, 68 (10): 2165-2170.
- **Klotz I.M. (1973)**: Physicochemical Aspects of Drug-Protein Interactions; A general perspective. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 226: 18.
- **Kökçil G. & Yilmaz H. (2005)**: Analysis of the fixed oils of the genus *Nigella* L. (Ranunculaceae) in Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology* 33(12): 1203-1209.
- **Krisko A.; Kveder M.; Pecar S. & Pifat G. (2005)**: A Study of Caffeine Binding to Human Serum Albumin. *Croatica. Chemica. Acta.*, 78: 71-77.
- **Labib S.M. (2005)**: Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *International Immunopharmacology*, 5: 1749-1770.
- **Lakowicz J.R. (1999)**. Principles of Fluorescence Spectroscopy. *Lakowicz, J. R. (Ed.); Plenum Press: New York.*

- **Li Y.; He W.Y.; Tian J.; Tang J.; Hu Z. & Chen X. (2005):** The effect of berberine on the secondary structure of human serum albumin. *Journal of Molecular Structure*, 743: 79-84
- **Mach H.; Middaugh C.R. & Lewis R.V. (1992):** Statistical determination of the average values of the extinction coefficients of tryptophan and tyrosine in proteins. *Anal. Biochem.*, 260: 74-80.
- **Marek R.; Seckarova P.; Holova D.; Marek J. & Sklenar V. (2003):** Secondary metabolites. *Nat.Prod*, 66 : 481-486.
- **Marion M.B. (1976):** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- **Mauer P. (1964) :** Une propriété inconnue du réactif de Mayer. *Microchim. Acta.* ; 2-4.
- **May M.O.; Otterby D.E.; Linn J.G. & Hansen W.P. (1993):** Lupins (*Lupinus albus*) as a protein Supplement for Lactating Hostein Dairy Cows: *J.Dairy.Sci*, 76: 2682-2691.
- **Mewly D. (1992) :** Séparation des alcaloïdes de l'opium par chromatographie sur couche mince. Thèse doctorale. IPSC Lausanne.
- **Meyer B. & Peters T. (2003):** NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. *Angew. Chem. Int, Eng Ed*, 42: 864-890.
- **Minghetti P.P.; Ruffnert D.E.; Kuang W.J.; Dennison O.E.; Hawking J.W.; Beattie W.G. & Dugaiczky A. (1996):** Molecular structure of the human albumin gene is revealed by nucleotide sequence within q11-22 of chromosome 4. *Biological Chemistry*, 261 (15): 6747-6757.
- **Miskovsky D.; Jancura S.; Sanchez-Cortes E.; Kocisova & Chinsky L. (1998):** Antiretrovirally active drug hypericin binds the IIA subdomain of human serum albumin: resonance Raman and surface-enhanced Raman spectroscopy study. *J. Am. Chem. Soc*, 120 (25): 6374–6379.

- **Mohan L.V.; Mothes K.; Engelbrecht L. & Schroter H.B. (1965):** Biosynthesis of damascenine in *Nigella damascena* L. *Nature*, 12: 1421-1428.
- **Moretti A.; D'Antuono L.F. & Elementi S. (2004):** Essential oils of *Nigella sativa* L. and *Nigella damascena* L. Seed. *Journal of Essential Oil Research*, 16: 182-183.
- **Morikawa T.; Xu F.; Ninomiya K.; Matsuda H. & Yoshikawa M. (2004):** Nigellamines A3, A4, A5, and C, New Dolabellane-Type Diterpene Alkaloids, with Lipid Metabolism-Promoting Activities from the Egyptian Medicinal Food Black Cumin. *Chem. Pharm. Bull*, 52(4): 494—497.
- **Mulamba T.; Delaude C.; Le Men O.L. & Levy J. (1981):** Alcaloïdes de *terbernanthe pubescens*. *Journal of natural products*, 44 (2) : 184-189.
- **Munshé D. & Mothes K. (1965):** Fütterungsversuche zur biosynthese des damascenins in *Nigella damascena* L. *Phytochemistry*, 4: 705-712.
- **Nanda R.K.; Sarkar N. & Banerjee R. (2007):** Probing the interaction of ellagic acid with human serum albumin: A fluorescence spectroscopic study. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 192: 152-158
- **Nickavar B.; Mojaba F.; Javidniab K. & Amolia M.A.R. (2003):** Chemical Composition of the Fixed and Volatile Oils of *Nigella sativa* L. from Iran. *Zeitschrift fur naturforschung C., Journal of biosciences*, 58 (9-10): 629-631.
- **Niels F.A.; Poul J.B. & Ole S.A. (1993):** Ionic binding, net charge, and donnan effect of human serum albumin as a function of pH. *Clin. Chem*, 39 (1): 48-52.
- **Norne J. E.; Hjalmarsson S.G.; Lindman B. & Zeppezauer M. (1975):** Anion binding properties of human serum albumin from halide ionquadrupole relaxation. *Biochemistry*, 14: 3401–3408.
- **Omran A.A.; Nagata C.; Kamijima Y.; Tanaka R.; Takegami S.; Kitade T. & Kitamura K. (2006):** Effects of inorganic ions on the binding of Triflupromazine and Chlorpromazine to bovine serum albumin studied by spectrometric methods. *Chem. Pharm. Bull*, 54 (7): 972—976.
- **Otagiri M. (2005):** A molecular functional study on the interactions of drug with plasma proteins. *Drug Metab. Pharmacokinet*, 20 (5): 309-323.

- **Palese R. and Aexmoun D. (1990):** Renonculacées: Isopyrum, Garidella, Nigella. In « la grande flore en couleurs de gaston Bonier ». Edition Belin, Paris, 4: 23-24.
- **Pedersen A.O.; Mensberg K-L.D. & Kragh-Hansen U. (1995):** Effect of ionic strength and pH on binding of medium-chain fatty acids to human serum albumin. *Eur. J. Biochem*, 233: 395-405.
- **Péré J.P. (1999):** Techniques spectroscopiques en biochimie analytique. *Collection Biologie Technique*. P69.
- **Pernod A. (1986) :** L'albumine humaine. Pharmacologie, Institut Mérieux International, Lyon, France.
- **Peters T.Jr. (1996):** All about albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications. *Academic press*, pp: 76-132.
- **Peters T.Jr. & Feldhoff R.C. (1975):** Fragments of bovine serum albumin produced by limited proteolysis. Isolation and characterization of tryptic fragments. *Biochemistry*, 14: 3384-3391.
- **Peters T.Jr. & Reed R.G. (1978):** Serum albumin as a transport protein. In "Transport by Proteins" *G. Blauer and H. Sund Editions*, pp: 57-78.
- **Raisonnier A. (2002) :** Oxydation cellulaire. Biochimie métabolique et Régulations C1 : cours de Biochimie PCEM1 et PCEM2, université Paris-VI.
- **Raves M.L.; Harel M.; Pang Y.P.; Silman I.; Kozikowski A.P. & Sussman J.L. (1997):** Structure of acetylcholinesterase complexed with the nootropic alkaloid, (-)-huperzine A. *Nat. Struct. Biol*, 1: 57-63.
- **Ross P.D. & Subramanian S. (1981):** Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry*, 20 (11): 3096–3102.
- **Salem M.L. (2005):** Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa L.* Seed. *International Immunopharmacology*, 5:1749–1770.
- **Scatchard G.; Batchelder A. C. & Brown A. (1944):** Chemical, clinical and immunological studies on the products of human plasma fractionation. VI. The osmotic pressure of plasma and of serum albumin. *J. Clin. Invest*, 23: 458-464.
- **Singer S.J. (1962):** The properties of proteins in nonaqueous solvents. *Adv. Protein. Chem*, 17:1–68.

- **Soskic M. & Magnus V. (2007):** Binding of ring-substituted indole-3-acetic acids to human serum albumin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15 :4595–4600
- **Sousek J.; Guédon D.; Adam T.; BochoraKova H.; Taborska E.; Valka I. & Simanek V. (1999):** Alkaloids and Organic Acids Content of Eight *Fumaria* Species. *Phytochem. Anal*, 10: 6-11.
- **Sudlow G.; Birkett D. J. & Wade D.N. (1975):** The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol. Pharmacol*, 11: 824-832.
- **Sudlow G.; Birkett D.J. and Wade D.N. (1976):** Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol. Pharmacol*, 12: 1052-1061.
- **Sugio S.; Kashima A.; Mochizuki S.; Noda M. & Kobayachi K. (1999):** Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Engineering*, 12 (6): 439-446.
- **Tabachnick M.; Downs E.J. & Giorgio N.A.Jr. (1970):** Thyroxine-protein interactions: Structural requirements for binding of benzene derivatives to thyroxine-binding sites on human serum albumin. *Arch. Biochem. Biophys*, 136: 467-479.
- **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.
- **Teuscher E.; Anton R. & Lobestesein A. (2005):** Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles. *Edition; Tec&Doc, Paris*, P 343.
- **Thomsen T. & Kewitz H. (1999):** Selective inhibition of human acetylcholinesterase by galanthamine *in vitro* and *in vivo*. *Life Sci*, 46: 1553-1558.
- **Tian J.N.; Liu J.Q. ; Tian X. ; Hu Z.D. &Chen X.G. (2004):** Study of the interaction of kaempferol with bovine serum albumin. *Mol. Struct*, 691:197-202.

- **Tian Z.; Liu Y.M. ; Chen S.B. ; Yang J.S. ; Xiao P.G. ; Wang L. & Wu E. (2006)**: Cytotoxicity of Two Triterpenoids from *Nigella glandulifera*. *Molecules*, 11: 693-699.
- **Toma C.; Hanganu D.; Olah N.K. & Popescu H. (2003)**: The determination of rutoside From *Nigella damascena* L. (Ranunculaceae) by TLC-densitometry. « *Ovidius* » *University Annals of Medical Science-Pharmacy*, 1 (2): 57-60.
- **Toma C.C.; Ollivier E.; Delmas F.; DiGiorgio C. & Balansard G. (2007)**: Anti-leishmaniasis activity of some extracts isolated from *Nigella damascena* (Ranunculaceae). *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi*.111(1):285-289
- **Tritsch G.L. (1968)**: Localized conformational perturbation of human serum albumin: A study of the thyroxine binding site at the amino terminus. *Arch. Biochem. Biophys*, 127: 384-390.
- **Urano Y.; Sakai M.; Watanabe K. & Tamaoki T. (1984)**: Tandem arrangement of the albumin and alpha-fetoprotein genes in the human genome. *Gene*, 32: 255-261.
- **Voët D. & Voët J.G. (2005)**: Structures tridimensionnelles des protéines. in « *Biochimie* ». 2ème Edition de boek, pp: 242-244.
- **Wang C.; Wu Q-H.; Wang Z. & Zhao J. (2006)**: Study of the Interaction of Carbamazepine with Bovine Serum Albumin by Fluorescence Quenching Method. *Analytical Sciences*, 22: 435-438.
- **Wang Y.Q.; Zhang H, Zhang G.C., Tao W.H., Tang S.H. (2007)**: Interaction of the favonoid hesperidin with bovine serum albumin: A fuorescence quenching study. *Journal of Luminescence*, 126 : 211–218
- **Wang Y.Q.; Zhang H.M.; Zhang G.C.; Tao W.H. & Tang S-H. (2007)**: Binding of brucine to human serum albumin. *Journal of Molucular Structure*, 830: 40-45.
- **Watanab H.; Kragh-Hansen U.; Tanase S.; Nakajou K.; Mitarai M.; Iwao Y.; Maruyama T. & Otagiri M. (2001)**: Conformational stability and Warfarin-binding properties of human serum albumin studied by recombinant mutants. *Biochem.J*, 357: 269-274.

- **Watanab H.; Tanase S.; Nakajou K.; Maruyama T.; Kragh-Hansen U. & Masaki O. (2000):** Role of arg-410 and Tyr-411 in human serum albumin for ligand binding and esterase-like activity. *Biochem. J*, 439: 813-819.
- **Wenting A.; Yong J.; Chuan D.; Cheng Y.; Yoshihisa I. & Shaomin S. (2008):** Spectroscopic and molecular modeling of the binding of meso-tetrakis (4-hydroxyphenyl) porphyrin to human serum albumin. *Dye and pigments*, 81: 1-9.
- **Wenying H.; Ying L.; Jianniao T.; Huanxiang L.; Zhide H. & Xingguo C. (2005):** Spectroscopic studies on binding of shikonin to human serum albumin. *Journal of photochemistry and photobiology A: Chemistry*, 174: 53-61.
- **Yamasaki K.; Maruyama T.; Kragh-Hansen U. & Otagiri M. (1996):** Characterization of site I on human serum albumin: concept about the structure of a drug binding site. *Biochim. Biophys. Acta*, 1295: 147-157.
- **Yon J. (1969):** Structure et dynamique conformationnelle des proteines. *Edition Hermann*. Paris.
- **Yunis J.J.; Sawyer J.R. & Ball D.W. (1978):** Characterization of banding patterns of metaphase, prophase G-banded chromosomes and their use in gene mapping. *Cytogenet Cell Genet*, 22: 679-683.
- **Zhu-Sheng J.; Cong-Gang L.; Xi-An M.; Mai-Li L. & Ji-Ming H. (2002):** NMR Study on the Low-Affinity Interaction of Human Serum Albumin with Diclofenac Sodium. *Chem.Pharm.Bull*, 50 (8): 1017-1021.

Annexe

Représentation graphique de doubles inverses de Benesi-Hildebrand

L'interaction de la damascenine (A) avec la SAH (P) sur un seul type de site est représentée par l'équation hyperbolique :

$$(AP) = \frac{(A)_T (P)_t}{1/K_{A \text{ app}} + (P)_t}$$

La linéarisation de cette équation selon Benesi-Hildebrand donne :

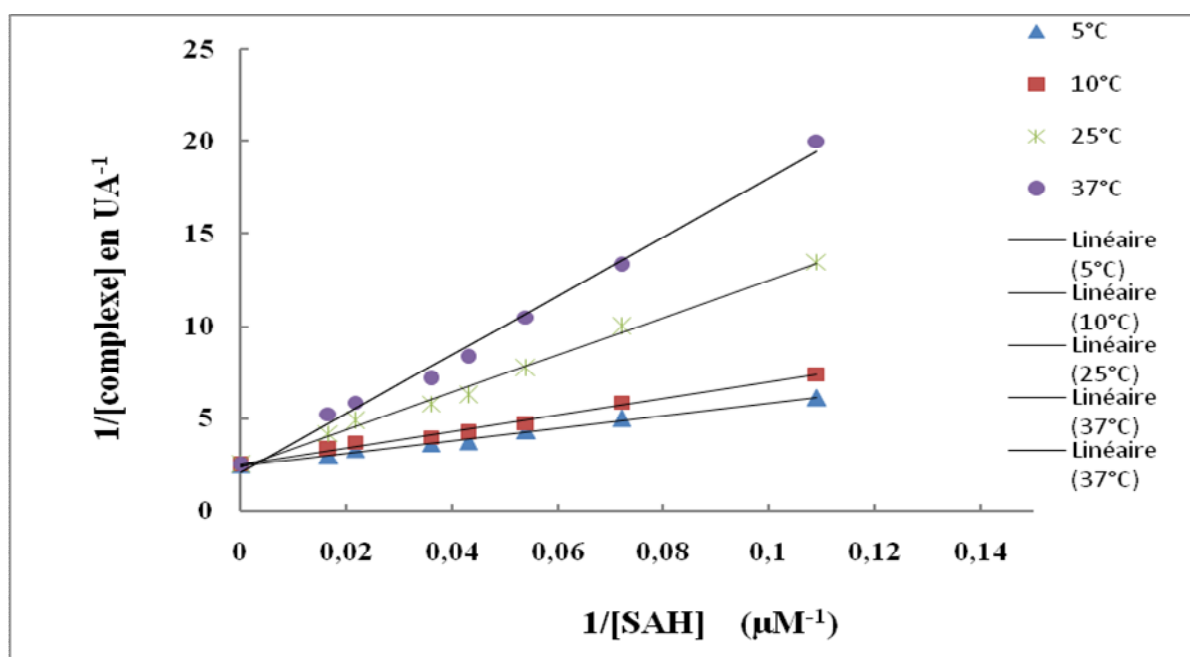
$$\frac{1}{(AP)} = \frac{1}{K_{A \text{ app}} (A)_T (P)} + \frac{1}{(A)_T}$$

(AP) : concentration du complexe formé damascenine-SAH (exprimé en DO à 320nm)

(P)_t : concentration de SAH

(A)_T : concentration totale de la damascenine

La représentation des résultats de titration de l'association de la damascenine à la SAH aux températures 5°, 10°, 25°, 37° donne les courbes suivantes dont l'ordonnée à l'origine représente l'inverse de la concentration du complexe max et l'abscisse à l'origine représente l'inverse de la concentration de SAH qui lie 50% de damascenine.



Glossaire

Algie dentaire : Synonyme de douleur dentaire ou rage de dents. Chez le nourrisson et le petit enfant on appelle aussi souvent cela aussi "feu de dent".

Antipyrétique : Médicament destiné à abaisser la température corporelle ou à diminuer la fièvre.

Carminative : Substance qui provoque l'expulsion des gaz intestinaux.

Choléra : Toxi-infection entérique épidémique contagieuse due au *Vibrio cholerae*, ou bacille virgule. Elle est caractérisée par des diarrhées brutales et très abondantes.

Colique : Une pathologie de la cavité abdominale. Dans le langage courant, la colique est associée à une douleur abdominale intense résultant de violentes contractions intestinales.

Congestion nasale : inflammation ou irritation locale, qui provoque un resserrement du passage de l'air dans le nez.

Cors : Des épaissements de la peau au niveau des zones de frottements des orteils.

Dartre : Plaque sèche squameuse ou durcie de la peau dans certaine dermatose.

Diaphorétique : Qui facilite la transpiration.

Diurétique : Substance qui augmente la production d'urine.

Emménagogue : Substances qui stimulent le flux sanguin dans la région pelvienne et l'utérus. Utilisées par des femmes pour stimuler l'apparition des règles.

Expectorant : Qui augmente l'expulsion du mucus de la trachée ou des bronches.

Galactagogue : Qui a la propriété de déterminer ou d'augmenter la sécrétion lactée.

L'asthme : Maladie du système respiratoire touchant les voies aériennes supérieures et notamment les deux bronches, caractérisée par une inflammation avec (œdème) de l'épithélium bronchique ; une bronchoconstriction ; une hyper-activité bronchique (chronique ou non) se manifestant par une sécrétion accrue de mucus, notamment due à un remodelage des voies respiratoires supérieures.

Paralysie faciale : Une atteinte de la motricité des muscles du visage. Le nerf atteint est le nerf facial correspondant à la septième paire des nerfs crâniens. Elle est de deux types : paralysie faciale périphérique et paralysie faciale centrale.

Rhumatisme : Ensemble de maladies inflammatoires (arthrite) ou dégénératives (arthroses) portant souvent sur les articulations et toujours douloureuses.

Sinusite : Une inflammation d'un ou de plusieurs des quatre sinus (maxillaire, frontale, sphénoïdal, éthmoïdal).

Vermifuge : Médicament permet d'éradiquer les parasites intestinaux ou vers.

Vitiligo : Maladie de la peau résulte de la destruction des mélanocytes (cellules de la peau, lui donnant sa couleur « marron »), d'où son aspect de dépigmentation ou tache blanche sur la peau.

Verrues : Tumeurs cutanées bénignes non cancéreuses. Elles ont pour origine l'infection de la peau par un virus, le papillomavirus humain (HPV) dont on dénombre une cinquantaine de types différents, certains donnant plus volontiers certaines verrues.

Résumé: *Nigella damascena*, est une plante annuelle herbacée de la famille des Renonculacées. Sa graine présente plusieurs effets thérapeutiques. La méthode d'extraction utilisée montre que cette graine contient **1,88%** d'alcaloïdes. L'analyse par HPLC et CCM montre la présence d'une fraction majoritaire qui ne peut être que de la damascenine. Nous nous sommes intéressés à l'étude de l'interaction de la damascenine avec le sérum albumine humaine en utilisant la spectroscopie UV-visible comme méthode d'étude. Les résultats obtenus montrent que la SAH interagit avec la damascenine sur un seul type de site de liaison. L'affinité de liaison est évaluée par la constante de dissociation apparente, $K_{d\ app}$. Les valeurs des $K_{d\ app}$ mesurées aux températures 278, 283, 298 et 310K sont respectivement 13,44, 17,7, 42,3 et 74,3 μ M. Les fonctions thermodynamiques standards, $\Delta H^{\circ\ app}$ et $\Delta S^{\circ\ app}$ du processus d'association de l'alcaloïde avec l'albumine, déterminées à partir de la représentation graphique de l'équation de Van't Hoff sont respectivement de -38,776 KJ/mol et -46,21 J/mol. Ces valeurs indiquent que les interactions de stabilisation du complexe damascenine-SAH sont majoritairement de type van der Waals et impliquent probablement des liaisons hydrogène.

Abstract: *Nigella damascena* is a herbaceous annual plant of the family of Renonculacea. The seed presents several therapeutic effects. The method of extraction used shows that this seed contains **1,88%** of alkaloid. Analysis by HPLC and CCM shows the presence of a majority fraction who can be only of the damascenine. We are interested in the study of the interaction of the damascenine with the serum human albumin by using the UV-visible spectroscopy like method of study. The results obtained show that the SAH interacts with the damascenine on only one type of site of binding. The affinity of binding is evaluated by the constant of apparent dissociation, $K_{d\ app}$. The values of $K_{d\ app}$ measured at temperatures 278, 283, 298 and 310K are respectively 13,44, 17,7, 42,3 and 74,3 μ M. The thermodynamic functions standards, $\Delta H^{\circ\ app}$ and $\Delta S^{\circ\ app}$ of the process of association of alkaloid with albumin, given starting from the chart of the equation of Van' T Hoff are respectively of -38,776 KJ/mol and -46,21 J/mol. These values indicate that the interactions of stabilization of the complex damascenine-SAH are mainly of type van der Waals and probably imply hydrogen bonds.

ملخص: نجبلا داما سينا هي نبتة عشبية سنوية من عائلة رنونكولاسي. بذورها لديها العديد من الآثار العلاجية. طريقة الاستخراج المستعملة تبين أن البذور تحتوي على **1,88%** من الألكالويدات. التحليل بواسطة طريقة التسجيل اللوني في وسط سائل عالية القدرة HPLC و التسجيل اللوني على طبقة رقيقة CCM يبين وجود لطخة غالبية التي لا يمكن أن تكون إلا الداماسنين. نهتم بدراسة الرابطة بين الداماسنين وألبومين مصل الإنسان. التحليل بواسطة السيكتروسكوبيا فوق البنفسجية والمرئية تبين أن هذه الرابطة قد تمت على موقع واحد. الدراسة الحرارية مكننتنا من تحديد ثابت الترابط الظاهري في درجات حرارة 278, 283, 298, 310 كالفن على التوالي 13,44, 17,7, 42,3, 74,3 ميكرومول وتقييم المعايير الحرارية $\Delta H^{\circ\ app}$, $\Delta S^{\circ\ app}$ المحددة من طرف بيان فنت هوف ان قيمهم هي على التوالي 38,776 -46,21 كيلو جول مول. هذه القيم تبين ان تأثيرات الإتزان للمعقد داماسنين البومين مصل الإنسان تسود عليها الروابط من نوع فاندر والس مع احتمال وجود روابط هيدروجينية.