



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار - عنابة -

UNIVERSITÉ BADJI-MOKHTAR-ANNABA-

FACULTE DES SCIENCE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Thèse en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat

Spécialité : Biologie Animale et Environnementale

Option : Reproduction et Développement

Intitulé

L'effet protecteur d'un antioxydant naturel contre le stress oxydatif induit par le chlorure de cadmium

Présentée Par : M^{me}. KEHILI Nardjess

Membres du Jury :

Président:	ABDENNOUR Cherif	Prof	Université Badji M - Annaba
Promoteur:	SAKA Saad	Prof	Université Badji M - Annaba
Examinatrice:	MALLEM Leila	Prof	Université Badji M - Annaba
Examinatrice:	BOUSSEKINE Samira	MCA	Université L. Tébéssi – Tebessa

Année Universitaire: 2017-2018

Remerciements

*Je tiens à remercier en premier lieu **ALLAH** le tout puissant d'avoir éclair mon chemin et d'avoir guidé mes pas, et qui sans lui nous ne somme rien.*

*Tout d'abord, mes sincères et profonds remerciements s'adressent à la personne qui m'a proposé le sujet de thèse et qui m'a encadré tout au long de ces années d'études : **Pr. Saad. Saka**. J'ai beaucoup apprécié sa confiance et sa grande Disponibilité, ses conseils pertinents m'ont permis de mener à terme ce projet.*

*J'exprime ma profonde gratitude au professeur **Boulaḳoud Mohamed Salah**, pour ses précieux conseils au laboratoire ainsi que pour l'intérêt et le soutien chaleureux dont il a toujours fait preuve. Un personnage exceptionnel qui nous a transmis la passion de la biologie et je prie Dieu le Miséricordieux de l'accueillir dans son vaste Paradis.*

J'exprime mes profonds remerciements aux membres de jury qui ont bien voulu juger ce travail :

***M. ABDENNOUR Cherif**, professeur à l'université d'Annaba qui m'a fait l'honneur de présider ce jury de thèse,*

***M^{me} MALLEM Leila** professeur à l'université d'Annaba qui a bien voulu examiner ce travail,*

***M^{me} BOUSSEKINE Samira** maitre de conférence A à l'Université L. Tébessi – Tebessa qui ma fait l'honneur d'accepté examiner ce travail.*

*Mes sentiments de reconnaissance s'adressent à ma chère sœur : **Amel**, pour son aide précieuse et chaleureuse et son inestimable collaboration.*

*Je ne remercierais jamais assez l'ingénieur du laboratoire écophysiologie animale «**Rym Benchikh**» pour les nombreux services qu'ils m'ont rendus durant la réalisation de ce travail, qu'ils trouvent ici le témoignage de mes remerciements les plus amicaux.*

*Je tiens évidemment à remercier l'ingénieur du laboratoire Biochimie et Microbiologie appliquée «**M.Lazhar**» pour leur disponibilité et les nombreux services qu'ils m'ont rendus durant la réalisation de ce travail.*

*Je remercie également tous les membres du laboratoire d'Anatomie pathologie à l'hôpital «**IBN ROCHD**» Annaba, pour la réalisation des coupes histologiques.*

*Je tiens à remercier tous mes amis et collègues pour la présence permanente durant les décapitations et qui m'ont aidée à chaque fois que j'en ai eu besoin, spécialement : **Hakima, Meriem, Amira, Hayet, Mouna, Imen et samir**, et je les remercie aussi pour les sympatiques moments qu'on a passés ensemble.*

*Un grand merci à mes amies et mes collègues : **Asma et Linda** pour leur encouragement leur amour et leur soutien de tous les jours.*

Enfin, je voudrais rendre hommage aux êtres les plus chers à mes yeux, ceux qui seront éternellement à mes côtés : ma mère, mon père et mes sœurs. Je tiens à ce qu'ils sachent que leur encouragement est une part importante de la réussite de mes études. Je vous dédie ce travail.

À tous mes amis et collègues du laboratoire d'Ecophysiologie Animale.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail et ma profonde gratitude

A mes très chers parents en témoignage de ma reconnaissance pour leur patience, leurs sacrifices et leur soutien tout au long de mes études. Qu'Allah leurs prête santé.

A mes sœurs : Amel et Sara,

A ma fille : Djana tasnim,

A toutes mes amies et mes collègues.

Liste des abréviations

ADN	: Acide désoxyribonucléique
ALAT	: Alanine aminotransférase
ArOH	: α -tocophérol
ArO•	: Tocopheroxyle lipidique
ASAT	: Aspartate aminotransférase
CAT	: Catalase
CCMH	: Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine
Cd	: Chlorure de cadmium
CDNB	: 1-chloro, 2,4-dinitrobenzène
Cu/Zn-SOD	: Superoxyde dismutase
DTNB	: Acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) ou réactif d'Ellman
EDTA	: Ethylène diamine tétra-acétique
ERO	: Espèce réactive de l'oxygène
Fe²⁺	: Ion ferreux
Fe³⁺	: Ion ferrique
GB	: Globule blanc
GR	: Globule rouge
GSH	: Glutathion réduit
GSH-Px	: Glutathion peroxydase
GSH-R	: Glutathion réductase
GSSG	: Glutathion oxydé
Hb	: Hémoglobine
HT	: Hématocrite
HO°	: Radical hydroxyle
H₂O₂	: Peroxyde d'hydrogène
LDH	: Lactate déshydrogénase
LDL	: Lipoprotéines de densité légère
LOO•	: Radical peroxyde lipidique
LOOH	: Hydroperoxyde lipidique
LY	: Lymphocyte
MDA	: Malondialdéhyde
Mn-SOD	: Superoxyde dismutase
MO	: Monocytes

MT	: métallothionéine
NAC	: N-acetylcystéine
NADPH	: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NO•	: Monoxyde d'azote
RL	: Radical libre
¹O₂	: Oxygène singulet
•OH	: Radical hydroxyle
O₂•-	: Anion superoxyde
PAL	: Phosphatase alcaline
PLT	: Plaquettes
ROO°	: radicaux peroxydes
ROH	: Alcool
ROOH	: Hydroperoxyde lipidique
ROS	: Reactive oxygen species
Se	: Sélénium
Se-Cys	: Sélénocystéine
-SH	: Groupement sulfhydryle
SOD	: Superoxyde dismutase
TBA	: Acide thiobarbéturique
TCA	: Acide trichloroacétique
TQ	: thymoquinone

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les propriétés chimiques du Cadmium	24
Tableau 2 : Les Propriétés physicochimiques du cadmium	24
Tableau 3: Teneur du cadmium dans l'environnement	25
Tableau 4: Emissions de cadmium en Europe	26
Tableau 5: Classification botanique du Nigelle	41
Tableau 6: Composition chimiques (%) des graines de <i>Nigella sativa</i> selon la région	41
Tableau 7: Les acides aminés des protéines de <i>Nigella sativa</i>	42
Tableau 8: Les principaux phospholipides d'huile fixe de <i>nigella sativa</i>	43
Tableau 9: Composition des huiles fixes de <i>nigella sativa</i> Tunisienne	44
Tableau 10: Les composés de mono terpènes d'huile essentielle de <i>nigella sativa</i>	44
Tableau 11: Composition du régime alimentaire pour un 1 kg d'aliment	53
Tableau 12: Rapports organo-somatiques (%) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours (chaque valeur représente la moyenne \pm SD de 10 rats)	79
Tableau 13: Concentrations de la formule numérique sanguine (FNS) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours (chaque valeur représente la moyenne \pm SD de 10 rats)	82
Tableau 14: Concentration sérique du bilan rénal chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours (chaque valeur représente la moyenne \pm SD de 10 rats)	85
Tableau 15: Concentrations du bilan biochimique chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours (chaque valeur représente la moyenne \pm SD de 10 rats)	87
Tableau 16: Concentrations du bilan lipidique chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours (chaque valeur représente la moyenne \pm SD de 10 rats).	90

Tableau 17: Taux de glutathion tissulaire (nM/mg prot) et du malondialdéhyde hépatique (nM/mg tissu) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours (chaque valeur représente la moyenne \pm SD de 10 rats)	91
Tableau 18: Activité des enzymes antioxydantes dans le foie des rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et la nigelle pendant 30 jours (chaque valeur représente la moyenne \pm SD de 10 rats)	95

Liste des Figures

Figure 1: La balance radicaux libre/ antioxydants	4
Figure 2: Les principales réactions conduisant au métabolisme des ERO	6
Figure 3: Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants	7
Figure 4: Métabolisme des espèces réactives de l'oxygène	8
Figure 5 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire	17
Figure 6: Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés	18
Figure 7 : Principales classes de dommages de l'ADN	19
Figure 8: Principales circonstances pathologiques s'accompagnant d'un stress oxydant primitif ou secondaire	21
Figure 9 : Aspect du Cadmium	23
Figure 10 : La voie du cd dans le corps	31
Figure 11: Ostéoporose (Amincissement et fragilisation de l'os). À gauche, la substance osseuse normale. À droite, la substance osseuse d'une personne atteinte d'ostéoporose	33
Figure 12: Résumé des effets moléculaires impliqués dans la carcinogenèse du cadmium	35
Figure 13 : L'impact du cadmium sur ses cibles cellulaires conduit à la production des ERO	37
Figure 14: Mécanismes d'induction du stress oxydant par le Cd	37
Figure 15: (A) Fleur de nigella sativa (B) Graines de nigella sativa	38
Figure 16: Aspect morphologique de la plante nigella sativa	40
Figure 17: Structure chimique des principaux alcaloïdes de N. sativa	45
Figure 18: Usages traditionnels de nigella sativa	47
Figure 19: Schéma récapitulatif du protocole expérimental	56
Figure 20: Variations du rapport hépato-somatique (%) chez les rats témoins et traités par le Chlorure de cadmium et/ou la nigelle après 30 jours de traitement	80
Figure 21: Variations du rapport réno-somatique (%) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle après 30 jours de traitement	80
Figure 22: Variations du rapport spléno-somatique (%) chez les rats témoins et	80

traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle après 30 jours de traitement	
Figure 23: Variations du rapport cardio-somatique (%) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle après 30 jours de traitement	81
Figure 24: Variations du rapport gono-somatique (%) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle après 30 jours de traitement	81
Figure 25: Variations du rapport epididymo-somatique (%) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle après 30 jours de traitement	81
Figure 26: Variations des rapports surrénalo-somatique (%) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle après 30 jours de traitement.	82
Figure 27: Variation du nombre des globules blancs ($10^3/\mu\text{L}$) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours	83
Figure 28: Variation du nombre des globules rouges ($10^6/\mu\text{L}$) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours	83
Figure 29: Variation du taux d'hémoglobine (g/dL) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours	84
Figure 30: Variation du pourcentage de l'hématocrite (%) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours.	84
Figure 31: Variation du taux des plaquettes ($10^3/\text{L}$) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours	84
Figure 32: Variation du taux des lymphocytes ($10^3/\text{L}$) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours	85
Figure 33 : Variation de la concentration sérique de l'urée (mg/dL) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours	86
Figure 34 : Variation de la concentration sérique de la créatinine (mg/dL) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours.	86
Figure 35 : Variation de la concentration sérique de l'acide urique (mg/dL) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours	86
Figure 36: Variation de la concentration du glucose sanguin (mg/dL) chez les rats témoins et traités après 30 jours de traitement.	87

Figure 37: Variation de la concentration des protéines totales (mg/dL) chez les rats témoins et traités après 30 jours de traitement	88
Figure 38: Variation de la concentration de lactate déshydrogénase (U/L) chez les rats témoins et traités après 30 jours de traitement.	88
Figure 39: Variation de la concentration de l'alanine amino-transférase (U/L) chez les rats témoins et traités après 30 jours de traitement	88
Figure 40: Variation de la concentration de l'aspartate aminotransférase (U/L) chez les rats témoins et traités après 30 jours de traitement.	89
Figure 41: Variation de la concentration de phosphatase alcaline (U/L) chez les rats témoins et traités après 30 jours de traitement.	89
Figure 42: Variation du taux des triglycérides (mg/dL) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours.	90
Figure 43: Variation du taux du cholestérol (mg/dL) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours.	90
Figure 44: Variation du taux de glutathion hépatique (nM/mg prot) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours	92
Figure 45: Variation du taux de glutathion rénal chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours.	92
Figure 46: Variation du taux de glutathion splénique chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours.	92
Figure 47: Variation du taux de glutathion cardiaque chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours	93
Figure 48: Variation du taux de glutathion intestinal chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours.	93
Figure 49: Variation du taux de glutathion surrénale chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours	93
Figure 50: Variation du taux de glutathion testiculaire chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours	94
Figure 51: Variation du taux de glutathion épидидymaire chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours.	94
Figure 52: Variation du taux de MDA (nM/ g de tissu) hépatique chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et la nigelle pendant 30 jours.	94
Figure 53: Variation de l'activité enzymatique de la GPx (μ M GSH/mg prot) dans le	95

foie des rats témoins et traités	
Figure 54: Variation de l'activité enzymatique de la GST (mM GSH/min/mg prot) dans le foie des rats témoins et traités	96
Figure 55 : Variation de l'activité enzymatique de la CAT ($\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg prot}$) dans le foie des rats témoins et traités	96
Figure 56: Coupes histologiques du foie des rats témoins et traites par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours	97
Figure 57: Coupes histologiques du rein des rats témoins et traites par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours.	98

Résumé

Résumé

Le cadmium est un métal lourd toxique qui produit de graves problèmes de santé chez l'homme et éventuellement, il est impliqué dans plusieurs maladies humaines liées au stress oxydant. Cette étude a été conçue pour évaluer la capacité de la nigelle (*Nigella sativa*) à moduler le stress oxydant induit par le cadmium.

Quarante rats mâles de la race *Albinos wistar* ont été répartis en quatre groupes. Ils ont subi un traitement par voie orale pendant 30 jours par le chlorure de cadmium (CdCl_2) et/ou une diète contenant 5 % de nigelle. Le groupe (T) a servi de témoin et a reçu une diète normale; le groupe (0-N) a reçu une diète expérimentale avec 5 % de nigelle; le groupe (Cd-0) a reçu une dose orale de cadmium (5 mg/kg) avec une diète normale; le groupe (Cd-N) a reçu une dose orale de cadmium (5 mg/kg) avec une diète expérimentale contenant 5 % de nigelle.

Le traitement par le cadmium a provoqué un effet hématotoxique, néphrotoxique, hépatotoxique, ainsi qu'une perturbation du profil lipidique. En outre, le cadmium a un effet pro-oxydant exprimé par une diminution significative du taux de GSH tissulaire, de l'activité enzymatique de la GSH-Px et de la CAT. Cette action pro-oxydante a été montrée aussi par une augmentation du taux de MDA et de l'activité enzymatique de la GSH-ST. L'addition de la nigelle dans la nourriture des rats a révélé une réduction de l'effet toxique du cadmium en améliorant tous les paramètres étudiés.

Ces résultats suggèrent que la nigelle a une puissante activité antioxydante, qui peut atténuer l'intensité du stress oxydant induit par le cadmium, ainsi qu'un effet protecteur général réduisant les effets toxiques provoqués par ce métal.

Mots clés: chlorure de cadmium, toxicité, stress oxydant, *Nigella sativa*, glutathion.

Abstract

The cadmium is a toxic heavy metal which produces serious harmful health problems for humans and eventually, it implicates in several human diseases associated with oxidative stress. This study was designed to assess the capacity of the nigella (*Nigella sativa*) to modulate the cadmium-induced oxidative stress.

Forty male *Albino wistar* rats were divided into four groups. They were treated orally for 30 days by cadmium chloride and / or a diet containing 5 % nigella. The group (T) served as a control and received a normal diet; the group (0-N) received an experimental diet with 5 % of nigella; the group (Cd-0) received an oral dose of cadmium (5mg/kg) with a normal diet, The group (Cd-N) received an oral dose of cadmium (5 mg / kg) with an experimental diet containing 5 % nigella.

Treatment with cadmium caused a hematotoxic effect, nephrotoxic, hepatotoxic in addition to a disturbance of the lipid profile. In addition, cadmium has a pro-oxidizing effect expressed with a significant decrease in GSH tissue level, of the enzymatic activity of GSH-Px and CAT. This pro-oxidative action was also shown by an increase in the MDA level and the enzymatic activity of GSH-ST. The addition of the nigella to the rats food, revealed a reduction in the toxic effect of cadmium by improving all the parameters studied.

These results suggest that nigella has a powerful antioxidant activity, which can attenuate the intensity of cadmium-induced oxidative stress, as well as a general protective effect reducing the toxic effects caused by this metal.

Keywords: cadmium chloride, toxicity, oxidative stress, *Nigella sativa*, rats.

الملخص

الكادميوم عبارة عن معدن ثقيل سام يتسبب في العديد من المشاكل الصحية الخطيرة المتعلقة بالإجهاد التأكسدي التي تصيب الإنسان. تم إنجاز هذه الدراسة من أجل تقييم قدرة الحبة السوداء لتعديل الإجهاد التأكسدي الناجم عن الكادميوم.

أربعون فأر ذكر من فصيلة *Albino wistar* قسمت إلى أربع مجموعات و خضعت للمعاملة بكلوريد الكادميوم عن طريق الفم و نظام غذائي يحتوي على 5 % من الحبة السوداء لمدة 30 يوم. المجموعة (T) استعملت كشاهدة و تلقت نظام غذائي عادي، المجموعة (0-N) تلقت نظام غذائي يحتوي على 5 % من مسحوق الحبة السوداء؛ تلقت المجموعة (Cd-0) جرعة 5 ملغ/كغ من كلوريد الكادميوم عن طريق الفم مع نظام غذائي عادي؛ تلقت المجموعة (Cd-N) جرعة فموية 5 ملغ/كغ من كلوريد الكادميوم و نظام غذائي يحتوي على 5 % من الحبة السوداء.

تعرض الفئران إلى الكادميوم يتسبب في التأثير على الوظيفة الدموية و الكلوية و الكبدية مع اختلال التوازن الدهوني. إضافة إلى ذلك، للكادميوم تأثير مولد للأكسدة و المتمثل في انخفاض مستوى الجلوتاثيون النسيجي (GSH) و النشاط الأنزيمي للجلوتاثيون بيروكسيداز (GSH-xP) و الكاتالاز (CAT) بالإضافة إلى زيادة مستوى المالونديالدهيد (MDA) و النشاط الأنزيمي للجلوتاثيون -S- ترونسفيراز (TS-GSH). إضافة الحبة السوداء إلى النظام الغذائي أدى إلى التخفيف من حدة التأثير السمي للكادميوم و تعديل جميع المؤشرات الحيوية المدروسة.

أثبت النتائج المتحصل عليها أن الحبة السوداء تملك نشاط مضاد للأكسدة و الذي يمكن أن يقلل من حدة الإجهاد التأكسدي الناجم عن الكادميوم و التأثير الوقائي العام للحد من الآثار السامة الناجمة عن هذا المعدن.

الكلمات الدالة: كلوريد الكادميوم، السمية، الأكسدة، الحبة السوداء، الجلوتاثيون.

Table des matières

Introduction générale	1
-----------------------------	---

Partie bibliographique

Chapitre 1 : Le stress oxydant

1. Le stress oxydant	4
1.1. Définition du stress oxydant	4
1.2. Les radicaux libres	5
1.2.1. Définition des radicaux libres	5
1.2.2. Nature et sources des radicaux libres	5
1.3. Les antioxydants	6
1.3.1. Définition des antioxydants.....	6
1.3.2. Différents types d'antioxydants	7
1.3.2.1. Le système antioxydant enzymatique.....	7
1.3.2.2. Le systèmes antioxydant non enzymatiques	10
1.3.3. Mécanisme d'action des antioxydants	15
1.3.3.1. Mécanisme d'action des antioxydants piègeurs.....	15
1.3.3.2. Mécanisme d'action des antioxydants préventifs	15
1.4. Conséquences du stress oxydant	15
1.4.1. Oxydation des protéines	16
1.4.2. Peroxydation lipidique.....	17
1.4.3. Dommages de l'ADN	19
1.4.4. Implication du stress oxydant dans les pathologies	20

Chapitre 2 : Le cadmium

2. Le cadmium	22
2.1. Généralités	22
2.2. Les propriétés physico-chimiques du cadmium	23
2.3. Utilisation et sources des dérivés de cadmium	25
2.3.1. Source naturelle	25
2.3.2. Source industrielle	25
2.4. Pollution au cadmium dans l'environnement	27

2.5. Toxicocinétique du cadmium chez les êtres vivants.....	28
2.6. Toxicodynamie du cadmium.....	31
2.7. Le stress oxydatif et le cadmium	35

Chapitre 3 : Nigella sativa

3. Nigella sativa	38
3.1. Généralités	38
3.2. L’historique de la nigelle	39
3.3. Description botanique de la nigelle	40
3.4. Composition chimique des graines de nigella sativa	41
3.5. Utilisation de Nigella sativa	46
3.6. Les propriétés pharmacologiques de la nigelle	48
3.7. Effet indésirable de la nigelle	51

Partie pratique

Chapitre 4 : Matériel et méthodes

4. Matériel et méthodes.....	53
4.1. Produit chimique.....	53
4.2. Matériel biologique.....	53
4.2.1. Préparation de la poudre de la nigelle	53
4.2.2. Elevage des rats	53
4.2.3. Traitement des rats.....	54
4.2.4. Sacrifice et prélèvements des échantillons.....	54
4.2.4.1. Sacrifices des animaux	54
4.2.4.2. Prélèvement de certains organes.....	54
4.3. Méthodes de dosage.....	57
4.3.1. Mesure de la glycémie.....	57
4.3.2. Dosage des paramètres hématologiques.....	57
4.3.3. Dosage des paramètres biochimiques.....	57
4.3.3.1. Dosage de l’urée	57
4.3.3.2. Dosage de la créatinine.....	59

4.3.3.3. Dosage de l'acide urique	60
4.3.3.4. Dosage du cholestérol	61
4.3.3.5. Dosage des triglycérides.....	63
4.3.3.6. Dosage des protéines totales	65
4.3.3.7. Dosage de l'aspartate aminotransférase (ASAT).....	66
4.3.3.8. Dosage de l'alanine aminotransférase (ALAT).....	67
4.3.3.9. Dosage de la phosphatase alcaline (PAL).....	68
4.3.3.10. Dosage de la lactate-déshydrogénase (LDH)	69
4.3.4. Dosage des paramètres du stress oxydant	70
4.3.4.1. Dosage du glutathion (GSH)	70
4.3.4.2. Dosage du malondialdéhyde (MDA)	71
4.3.4.3. Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion- peroxydase (GSH-Px)	72
4.3.4.4. Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion-S-transférase (GSH-ST)	73
4.3.4.5. Dosage de l'activité enzymatique du catalase (CAT)	74
4.3.5. Dosage des protéines tissulaire	76
4.3.6. Etude histologique	76
4.3.6.1. Fixation des échantillons	76
4.3.6.2. Déshydratation des échantillons	77
4.3.6.3. Inclusion des échantillons	77
4.3.6.4. Confection des coupes histologiques.....	77
4.3.6.5. Coloration.....	78
4.3.7. Analyse statistique des résultats.....	78

Chapitre 5 : Résultats

5. Résultats	79
5.1. Étude physiologique	79
5.2. Étude hématologique	82
5.3. Étude biochimique	85
5.3.1. Influence du traitement sur la fonction rénale	85
5.3.2. Influence du traitement sur le bilan biochimique	87
5.3.3. Influence du traitement sur le profile lipidique.....	89
5.4. Étude des paramètres du stress oxydant	91
5.4.1. Influence du traitement sur le glutathion tissulaire et le malondialdéhyde hépatique ...	91

5.4.2. Influence du traitement sur l'activité des enzymes antioxydantes (GSH-Px, GSH-ST et CAT)	95
5.5. Etude histologique	96
5.5.1. Etude histologique hépatique	96
5.5.2. Etude histologique rénale	97

Chapitre 6: discussion

6. Discussion.....	98
Conclusion et perspectives	112
Références bibliographiques	114

Introduction générale

Introduction

Au des dernières années, la pollution par les métaux lourds est devenue l'un des problèmes environnementaux les plus graves (Elkhawaga, 2011). La découverte des métaux constitue une étape fondamentale dans l'histoire de l'homme, qui est présents dans tous les compartiments de l'environnement, en particulier dans l'eau et leurs concentrations varient suivant l'élément considéré. Depuis le début de la révolution industrielle, la pollution de l'environnement, y compris le sol, est accélérée de façon spectaculaire (Yanai et *al*, 2006).

Actuellement, le développement durable prend de plus en plus de place dans les politiques de développement à l'échelle mondiale. Par conséquent, il est hautement incompatible avec un environnement pollué par des composés toxiques comme les métaux lourds. Les activités humaines ont considérablement accru la libération de diverses molécules dans l'environnement dont certaines se révèlent toxiques non seulement pour la flore et la faune mais également pour l'espèce humaine (Moussavou, 2010).

La toxicité des métaux lourds a attiré beaucoup d'intérêt pour la recherche au cours des dernières années (Abam *et al*, 2008; Metwally et Fouad, 2008), en raison de ses répercussions profondes sur la santé. Par conséquent, des recherches sont en cours pour trouver des moyens plus efficaces de gérer la toxicité des métaux lourds, en particulier en utilisant des vitamines antioxydantes et des substances alimentaires naturelles qui susciteront des effets secondaires minimaux (Al-Hashem *et al*, 2009; Gaurav *et al*, 2010).

Les métaux lourds, composés stables et hautement persistants, sont des contaminants de l'environnement; qui peuvent être accumulés et transférés aux organismes supérieurs des réseaux trophiques entraînant de sérieux problèmes écologiques et de santé publique (Croteau *et al*, 2005; DeForest *et al*, 2007). Les métaux lourds sont des éléments non biodégradables et doivent par conséquent être extraits des sites pollués si l'on souhaite les éliminer. Les métaux lourds tels que le plomb, le cadmium, le cuivre, le zinc, et le mercure persistent dans l'environnement pendant de longues périodes. De plus ils sont continuellement rajoutés dans les soles par diverses activités : en agriculture par l'application de boues d'épuration ou dans l'industrie métallurgique. Ainsi, la phytoremédiation, technique récente peu onéreuse de dépollution, utilise les plantes pour la décontamination des sols pollués (Pilon-Smits, 2005;

Vangronsveld *et al*, 2009). Certains métaux sont souvent toxiques à faible concentration, ces composés provoquent divers effets nuisibles tels que l'allongement de la phase de latence, l'inhibition des activités enzymatiques (Nweke *et al*, 2007), l'altération de la structure de l'ADN (Bruins *et al*, 2000; Rathnayake *et al*, 2009). Des investigations récentes sur les mécanismes sous-jacents des métaux suggèrent que le stress oxydant, résultant du déséquilibre de la production de radicaux libres et de la défense antioxydante cellulaire, joue un rôle important dans la toxicité cellulaire induite par ces métaux (Shi *et al*, 2004).

Parmi les métaux lourds les plus toxiques est le cadmium est un métal lourd relativement rare dans l'écosystème et particulièrement toxique pour l'homme (Moulis *et al*, 2014). Il est considéré comme un polluant environnemental et industriel, car il est présent dans le sol, l'eau, l'air et la nourriture. Alors que l'alimentation et le tabagisme et l'ingestion accidentelle représente les modes fréquent de contamination, il est facilement absorbé par le tractus gastro-intestinal et tend à être persistant puisqu'il s'accumule dans les organes, surtout dans le foie et le rein (Bernhoft, 2008).

Cependant, le cadmium est hautement réactif engendrant la formation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) conduisant au développement d'un stress oxydatif (Siedlecka et Krupa, 2002). En effet, le cadmium est connu pour affecter directement le système de défense cellulaire (Ercal *et al*, 2001), peuvent causer des dommages oxydatif aux membranes lipidiques, à l'ADN et protéine, et leur oxydation peut conduire à un dysfonctionnement cellulaire et une lésion tissulaire. Ces réactions se traduisent par une modification des activités des enzymes antioxydants (glutathion peroxydase, superoxyde dismutase, catalase) et soutiennent indirectement le système de défense antioxydant en catalysant la conjugaison des polluants avec GSH (glutathion-s-transférase). De plus, de nombreuses études permettent de penser que ce métal peut induire de multiples cancers comme certains affectant le rein, le poumon, les testicules ou la prostate (Rousselet, 2007).

Depuis des siècles, l'homme s'est servi des plantes pour de multiples usages. Avec celles-ci, il a ainsi pu se nourrir, se chauffer, se loger ou encore se soigner. Ce qu'on appelle aujourd'hui médecine traditionnelle correspond aux synthèses des différentes expériences thérapeutiques de ces générations de médecins. Les médecines indiennes, chinoises, égyptiennes, gréco-romaines et arabes comportent de des très anciens et encore réputés,

remèdes à base de plantes utilisés à des fins thérapeutiques (Badr-Eddine, 2015). Parmi ceux-ci, nous retrouvons la nigelle (*Nigella sativa*) communément appelée cumin noir est traditionnellement été utilisées comme remède naturel pour nombreuses pathologies telles que l'hypertension, le diabète, la fièvre, la migraine, l'inflammation, les problèmes gastro-intestinales...etc. (Salama, 2010), ainsi qu'une épice pour plus de 2000 ans (Reham, 2015). Il a été rapporté que la graine noire contient un certain nombre d'ingrédients pharmacologiquement actifs, y compris les antioxydants (Erkan *et al*, 2008; Mariod *et al*, 2009), La thymoquinone est le constituant actif de nigella sativa, qui possède une forte action antioxydante (Ojha *et al*, 2015; Sener *et al*, 2016).

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'impact d'un polluant toxique (cadmium) sur des rats blancs et l'action protectrice possible d'une épice riche en antioxydants naturels (*Nigella sativa*) contre le stress oxydant induit par ce polluant.

Chapitre 1 :
Le stress oxydant

1. Le stress oxydant

1.1. Définition du stress oxydant

Lorsque l'un des systèmes protectifs de l'organisme contre la toxicité des radicaux libres (RL) montre un échec, l'action des radicaux libres devient incontrôlable, ce qui conduit à des dommages au niveau des molécules, des cellules, des organes et potentiellement à la mort de l'organisme (Durackova *et al*, 2008). La conséquence des effets nocifs des RL et des métabolites réactifs est dite «stress oxydant». Ce terme est défini initialement comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les pros oxydants et les antioxydants en faveur des premiers (Barouki, 2006; Jenkins *et al*, 2007). Cette définition ne signale aucun effet délétère d'un tel changement sur la fonction des tissus et n'indique pas l'origine de ce déséquilibre s'il est dû à une augmentation de la production des oxydants ou à une diminution de la capacité réductrice des tissus (Barouki, 2006) (figure 1). Selon les points de vue actuels, le stress oxydant peut être défini comme étant un déséquilibre entre la production et l'élimination des métabolites réactifs de l'oxygène et du nitrogène en faveur de leur production conduisant à des dommages potentiels (Durackova, 2008) et à des dégâts cellulaires irréversibles (Abuja et Albertini, 2001).

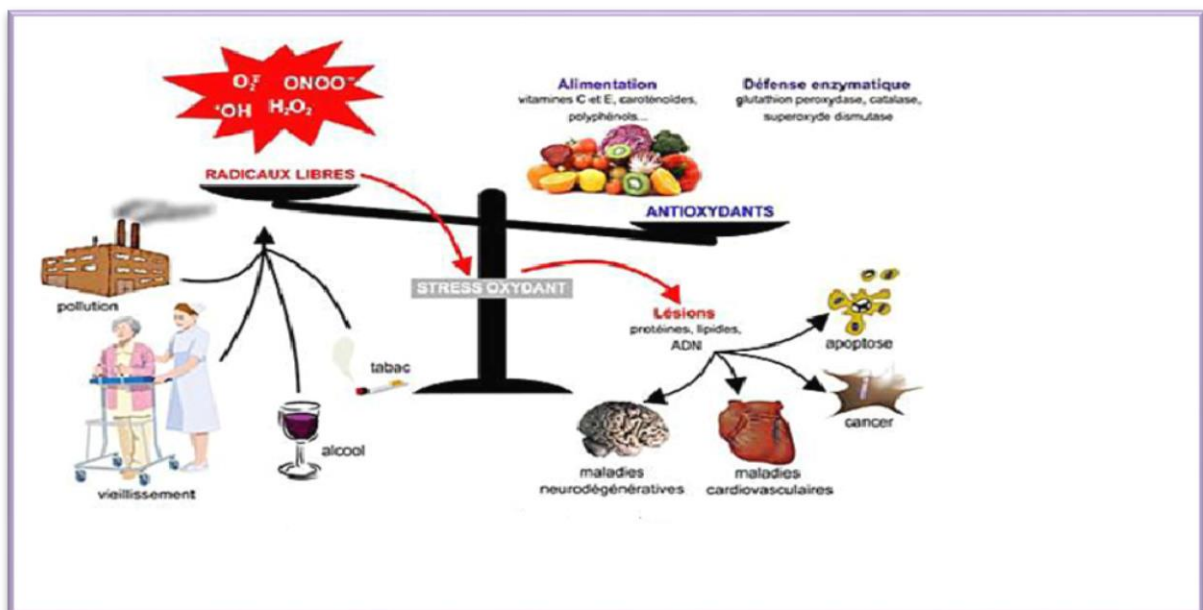


Figure 1: La balance radicaux libre/ antioxydants (Durackova, 2008)

1.2. Les radicaux libres

1.2.1. Définition des radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes, ions ou molécules) qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié) sur leur couche externe et capables d'existence indépendante (Mac Laren, 2007). Ils peuvent être dérivés de l'oxygène (espèces réactives de l'oxygène, ERO) ou d'autres atomes comme l'azote (espèces réactives d'azote, ERA). La présence d'un électron célibataire confère aux radicaux libres une grande réactivité (demi-vie courte) et ils peuvent être aussi bien des espèces oxydantes que réductrices. De part sa structure particulière, il a tendance à attirer les électrons d'autres atomes et molécules pour gagner en stabilité (Delattre *et al*, 2005a).

1.2.2. Nature et sources des radicaux libres

L'oxygène représente, après l'azote, le deuxième élément le plus abondant dans l'atmosphère (21 %). Il a été caractérisé en les années 1772-1774 par Lavoisier, un chimiste français. L'oxygène est un élément indispensable à la vie des organismes aérobies. Ces organismes utilisent l'oxygène pour oxyder les substrats riches en carbone et en hydrogène. Cependant, quand on oxyde les molécules avec l'oxygène, ce dernier est réduit et forme des intermédiaires radicalaires, très réactifs connus sous le nom espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ces dernières sont des molécules contenant de l'oxygène mais dont la réactivité est bien supérieure à celle de la molécule d'O₂. Ces ERO comprennent des radicaux tels l'anion superoxyde (O₂^{•-}) ou le radical hydroxyle (HO[•]); et les espèces non radicalaires telles le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), l'oxygène singulet (¹O₂) (Garrel *et al*, 2007). L'anion superoxyde et le radical hydroxyle sont très instables par comparaison au H₂O₂ qui diffuse librement et possède une durée de vie plus longue. La réactivité d'un radical dépend de sa nature. Ainsi, parmi les radicaux formés chez les êtres vivants, l'anion radicalaire superoxyde (O₂^{•-}) n'est pas très réactif mais constitue un des radicaux précurseurs pouvant être activés en d'autres espèces plus réactives. Sa faible réactivité (O₂^{•-}) permet son utilisation par l'organisme comme médiateur régulant des fonctions biologiques. Par contre, les radicaux comme les peroxydes (ROO[•]) et surtout le radical hydroxyle (HO[•]), sont extrêmement réactifs, et ce avec la plupart des molécules biologiques. Le peroxyde d'hydrogène est un oxydant faible et peu réactif en absence des métaux de transition. Cependant, en présence du

cuiivre cuivreux (Cu^+) ou du fer ferreux (Fe^{2+}), le H_2O_2 peut se décomposer en HO^- et HO° selon la réaction de Fenton. Le radical HO° a une vitesse de réaction très grande avec la majorité des molécules, si bien qu'il réagit à l'endroit même où le métal catalyse sa formation (figure 2).

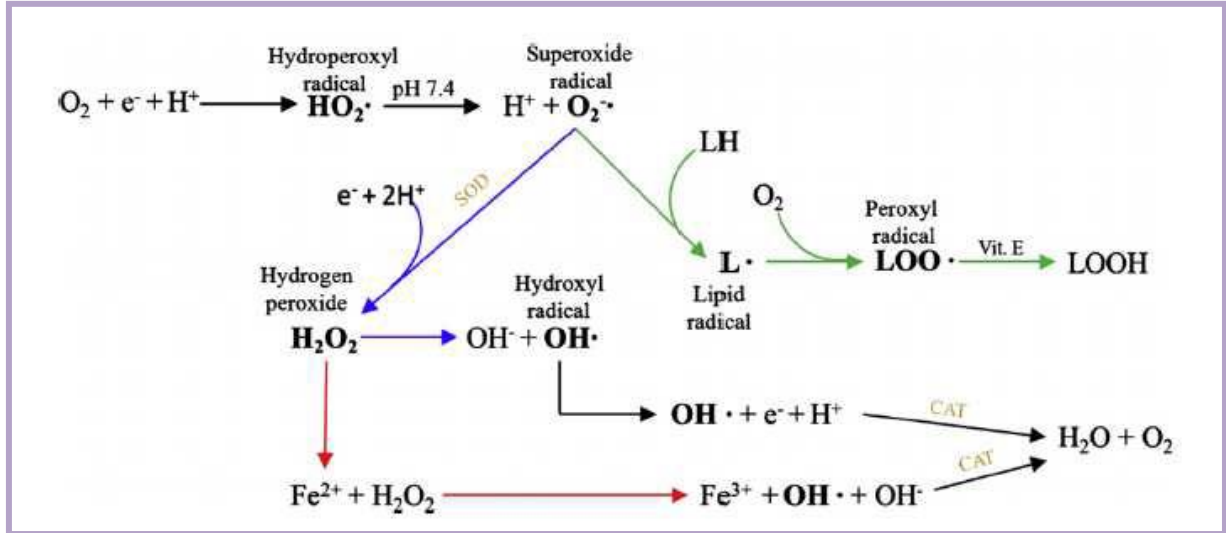


Figure 2: Les principales réactions conduisant au métabolisme des ERO (Carocho et Ferreira, 2013)

L'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) est une autre espèce oxygénée très réactive. C'est une molécule à l'état excité qui peut réagir avec différents accepteurs d'électrons pour produire des peroxydes. L'oxygène singulet n'apparaît que dans des cas particuliers comme pendant les processus de photo sensibilisation où une molécule excitée transfère son énergie à l'oxygène et l'active en oxygène singulet. Il a pour cible biologique les membranes, les acides nucléiques et les protéines (Favier, 2003).

1.3. Les antioxydants

1.3.1 Définition des antioxydants

Le terme d'antioxydant désigne toute substance qui, présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat (Pastre et Priymenko, 2007). Les antioxydants peuvent empêcher ou retarder les processus d'oxydation causés par les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Heo *et al*, 2007). Ils ont la capacité de contrecarrer les effets néfastes des radicaux libres dans les tissus, ils sont donc censés pour protéger contre le cancer, l'artériosclérose, les maladies cardiaques et plusieurs autres maladies métaboliques (Bandyopadhyay *et al*, 2007).

Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytique spécifiques. Mais aussi à des petites molécules hydro-ou liposolubles. Les systèmes antioxydants peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine (Delattre *et al*, 2005a).

1.3.2. Différents types des antioxydants

Les cellules utilisent éventuellement de nombreuses stratégies antioxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leur niveau d'espèces réactives de l'oxygène. Ils sont équipés de divers systèmes antioxydants distribués dans tous les compartiments de l'organisme, qu'ils soient intracellulaires, membranaires ou extracellulaires (Powers et Sen, 2000). Dans le système de défense antioxydant de notre organisme, on distingue des systèmes enzymatiques et des systèmes non enzymatiques.

1.3.2.1. Le système antioxydant enzymatique

Les enzymes existent à l'état endogène et permettent de protéger les cellules contre les radicaux libres produits de manière physiologique au cours du métabolisme cellulaire normal. Les principaux systèmes enzymatiques comprennent les super oxydes dismutases (SOD), la catalase (CAT) et plusieurs formes de glutathion peroxydases (GSH-PX) (Jacob *et al*, 2006; Garrel *et al*, 2007; Menon et Goswami, 2007) (figure 3).

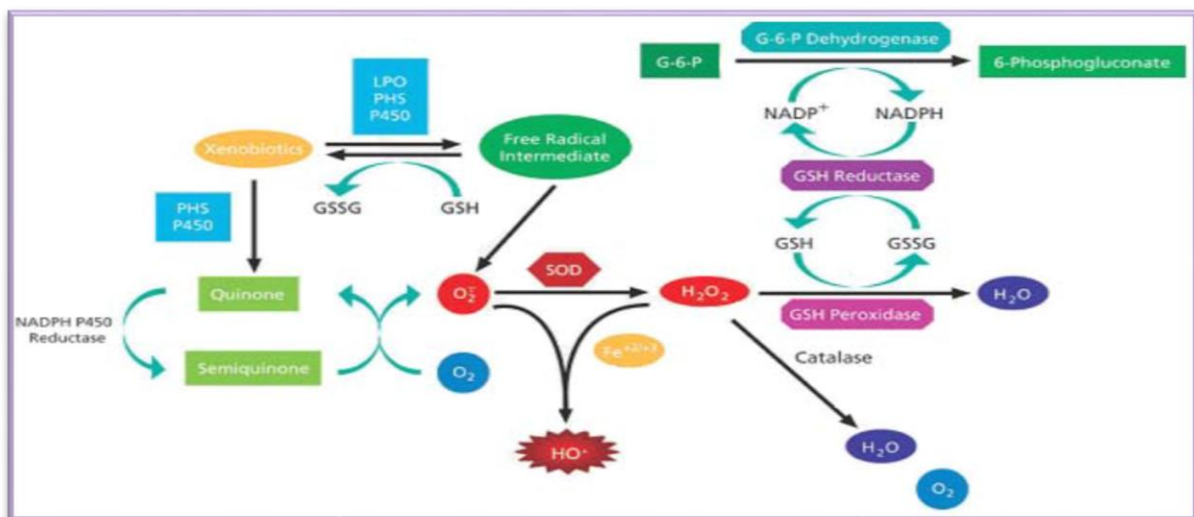
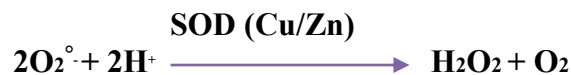


Figure 3: Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants (Descamps, 2004).

✚ **Les superoxydes dismutases (SODs):** le superoxyde dismutase est l'un des antioxydants enzymatiques intracellulaires les plus efficaces (Rahman, 2007), ce sont des métallo-enzymes retrouvées dans toutes les cellules animales ou végétales. Leur structure forme un puits hydrophobe au centre de la protéine, puits dans lequel se glisse l'anion superoxyde. Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au cœur de l'enzyme dont la nature distinguera un type précis (Chandel et Budinger, 2007). Il existe trois types de SOD chez l'homme notamment : la SOD à cuivre-zinc présent dans le cytoplasme (Cu-ZnSOD), la SOD à manganèse (Mn-SOD) présent dans les mitochondries, et une SOD extracellulaire c'est une SOD à cuivre-zinc (Cu/Zn-SOD) (Zelko *et al*, 2002). La SOD convertit le superoxyde en peroxyde d'hydrogène et oxygène moléculaire selon la réaction suivante (Matès, 2000).



Les différentes SODs catalysent la même réaction avec une efficacité comparable. Elles accélèrent la vitesse de dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (Desideri et Falconi, 2003; Rahman *et al*, 2006; Garrel *et al*, 2007) (figure 4).

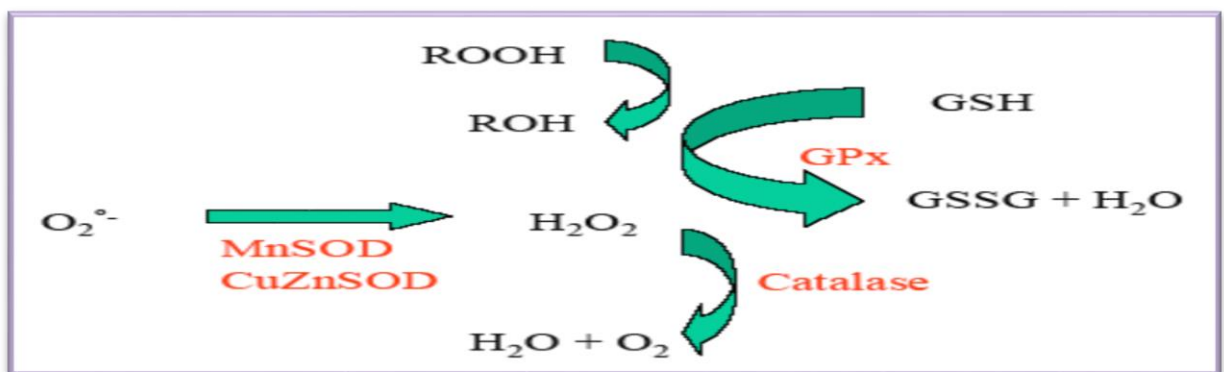


Figure 4: Métabolisme des espèces réactives de l'oxygène (Descamps, 2004)

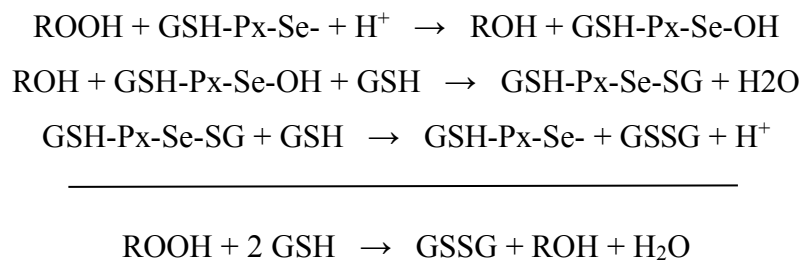
La catalase (CAT): la catalase est une enzyme héminique capable de transformer le peroxyde d'hydrogène (généralement produit par les SOD) en eau et oxygène moléculaire (Bonfont-Rousselot *et al*, 2003). Elle est essentiellement présente dans les peroxysomes, mais aussi dans les mitochondries et dans les érythrocytes (Deaton et Marlin, 2003). La réaction catalysée par cette enzyme est une dismutation du peroxyde d'hydrogène :



La catalase est une enzyme dépendante du fer, qui entre en compétition avec la GSH-Px pour l' H_2O_2 , son utilisation devenant importante quand les quantités d' H_2O_2 sont élevées (Sayre *et al*, 2005; Finaud *et al*, 2006). Il est une enzyme tétramérique, chaque sous unité comporte un groupement ferriprotophyrine dans son site actif avec un atome de fer à l'état Fe^{3+} et une molécule de NADPH. La fixation du NADPH par la catalase lui confère une protection contre l'attaque de l' H_2O_2 (Delattre *et al*, 2005a).

✚ **La glutathion peroxydase (GSH-Px):** la glutathion peroxydase est une enzyme dépendante du sélénium (Akbas *et al*, 2005). Elle contient un seul résidu sélénio-cystéine (Se-Cys) dans chacune de ces quatre sous-unités identiques, ce qui est essentiel pour l'activité enzymatique. Il existe plusieurs isoenzymes de la GSH-Px trouvées chez les mammifères. Bien que leur expression soit ubiquitaire, les niveaux de chaque isoforme varient selon le type de tissu (Favier, 2003).

L'ensemble des GSH-Px sélénio-cystéine catalysent la réduction des hydroperoxydes minéraux ou organique en eau et en alcool lipidique respectivement, tandis que le glutathion réduit (GSH) est transformé en glutathion oxydé (GSSG). Toutes ces enzymes contiennent dans leurs sous-unités un à quatre atomes de sélénium selon l'isoenzyme (Delattre *et al*, 2005a). Elles fonctionnent toutes selon le même mécanisme catalytique suivant:



La première étape est une oxydation du groupement sélénol de l'enzyme par un hydroperoxyde pour former un acide sélénique (réaction 1). La seconde étape conduit à la formation d'une liaison covalente entre le soufre du GSH et le sélénium de l'enzyme (réaction 2).

La dernière étape est la régénération de l'enzyme sous sa forme réduite grâce à l'action d'une deuxième molécule de GSH qui rompt le pont sélénio-sulfure (réaction 3) (Favier, 2003). L'activité antioxydant de ces peroxydases est cependant très dépendante de l'apport nutritionnel en sélénium (Favier, 2003; Delattre *et al*, 2005a).

On distingue 5 isoenzymes de la GSH-Px contenant du sélénium chez les eucaryotes: la GSH-Px1 ou cGSH-Px cytoplasmique et mitochondriale, la GSH-Px2 ou giGSH-Px gastro intestinale, la GSH-Px3 ou pGSH-Px plasmatique, la GSH-Px4 ou HP-GSH-Px localisée à l'interface de la membrane interne et du cytoplasme et la GSH-Px5 ou snGSH-Px épидидymaire, La plus abondante est la GSH-Px1. Elle est exprimée dans la plupart des cellules (Comhair et Erzurum, 2002).

1.3.2.2. Systèmes antioxydant non enzymatiques

La défense antioxydant est composée d'antioxydants endogènes, qui sont synthétisés par le corps, et d'antioxydants exogènes, obtenue à partir de l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamine C, vitamine E, caroténoïdes, ubiquinone, coenzyme Q, flavonoïdes, glutathion et acide lipoïque.

Systèmes antioxydant endogène non enzymatiques

- **Le glutathion réduit (GSH):** le GSH est formé à base d'un tri peptide (γ -Glu-Cys-Gly ou acide γ -glutamique-cystéine-glycine). Sous l'action de la GSH-Px il désintoxique les ERO (H_2O_2 , peroxydites, peroxydes lipidiques, etc.) en formant du GSSG (glutathion oxydé) composé de deux molécules de GSH (Clarkson et Thompson, 2000; Hellsten *et al*, 2001; Pittaluga *et al*, 2006; Lyn Patrick, 2006; Douris *et al*, 2009). Le GSH est un antioxydant peptidique abondant dans l'organisme où il joue un important rôle de protection des tissus et des protéines transporteuses d'ions redox actifs comme l'hémoglobine, la transferrine, la ferritine, l'albumine. Le GSH est capable de régénérer les vitamines E et C oxydées. Il est détoxifiant au niveau hépatique et peut se lier aux métaux toxiques (mercure, arsenic, ect.) (Clarkson et Thompson, 2000; Hargreaves *et al*, 2002; Lyn Patrick, 2006).

- **L'acide urique:** l'acide urique comme produit final du métabolisme des purines, augmente dans le plasma lors d'efforts physiques intenses, ou lors d'une exposition à l'hypoxie (altitude, apnée, ischémie-reperfusion) (Baillie *et al*, 2007). Il a été proposé comme un des meilleurs antioxydants du plasma *in vivo*, où il pourrait contribuer à 35-60 % de la capacité antioxydante totale (Waring *et al*, 2003; Finaud *et al*, 2006; Johnson *et al*, 2009). L'acide urique peut être oxydé en différents produits dont le prédominant est l'allantoïne qui augmente également dans les muscles en cas d'effort (Hellsten *et al*, 2001), puis est régénéré par la vitamine C (Vasconcelos *et al*, 2007). Il subsiste certains doutes quant à une réelle fonctionnalité antioxydante de l'acide urique, dont l'augmentation peut aussi bien avoir des conséquences pro que antioxydantes (Patterson *et al*, 2003; Baillie *et al*, 2007; Sautin *et al*, 2007; Gersch *et al*, 2009; Johnson *et al*, 2009).
- **La bilirubine:** est un produit terminal de la dégradation de l'hème et résulte essentiellement du catabolisme de l'hémoglobine par les cellules réticuloendothéliales. Ce composé liposoluble est capable de piéger les radicaux peroxy, l'oxygène singulet et le radical hydroxyle, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (Algeciras-Schimmich *et al*, 2007). La bilirubine est oxydée par certaines espèces recyclée par la biliverdine réductase (Halliwell et Gutteridge, 2007).

Systèmes antioxydant exogène non enzymatiques

- **Vitamine E:** la vitamine E est un terme générique pour tous les tocophérols et les tocotriénols. Desquels existent 8 dérivatifs et dont l'alfa-tocophérol est le plus abondant (Shils *et al*, 2006). La vitamine E agit directement sur une grande variété d'ERO pour former un radical peu réactif. Par la suite la vitamine E oxydée pourra être reconvertie principalement par la vitamine C, mais également par d'autres composés comme le glutathion réduit, la vitamine A et l'ubiquinol. La vitamine E est liposoluble et a été démontrée comme le principal antioxydant dans les membranes des cellules, en particulier celles des mitochondries (Morris et Carson, 2003; Shils *et al*, 2006; Traber et Atkinson, 2007). Elle Pourrait augmenter l'activité des SOD et des CAT (Margaritis *et al*, 2003; Lyn Patrick, 2006). Pour certains auteurs, même si le potentiel antioxydant de la

vitamine E est démontré *in vitro*, *in vivo* elle remplirait plutôt de nombreux rôles physiologiques non antioxydants de régulation du fonctionnement de la cellule. Sa faible concentration ne lui permettrait pas d'être un antioxydant prépondérant et son utilisation à cette fin pourrait compromettre le fonctionnement cellulaire (Azzi, 2007; Atkinson *et al*, 2008).

- **Vitamine A:** la vitamine A est un nom générique pour les rétinoïdes et les provitamines A ou les caroténoïdes dont plusieurs centaines sont répertoriés (Wolinsky, 1998). Les rétinoïdes (rétinol, rétinol et acide rétinoïque) sont présents dans les aliments d'origine animale (lait, foie, jaune d'œuf), alors que les provitamines A (bêta-carotène, lutéines, lycopènes, etc.) se rencontrent dans de nombreux fruits et légumes. Le bêta-carotène est le principal précurseur de la vitamine A. Les autres caroténoïdes peuvent être de puissants antioxydants, mais ils sont moins connus et abondants (Shils *et al*, 2006). La vitamine A est responsable de la neutralisation de singulet d'oxygène, d'anion super oxyde, de peroxydites, de radicaux lipidiques et son action se fait dans les milieux lipidiques. Dans les huiles végétales, la vitamine A ne serait efficace qu'en présence de vitamine E et il existe une étroite collaboration entre ces deux vitamines liposolubles. La vitamine A agit sur les ERO en formant un radical de vitamine A qui pourra agir comme antioxydant en réagissant avec un autre radical pour former un non radical, ou sera régénéré en vitamine A (Clarkson et Thompson, 2000; Morris et Carson, 2003; Shils *et al*, 2006, Finaud *et al*, 2006; Bleys *et al*, 2006; Fisher-Wellman et Bloomer, 2009). En excès la vitamine A pourrait agir comme prooxydants, et favoriser l'oxydation de l'ADN (Shils *et al*, 2006; van Helden *et al*, 2009).
- **Vitamine C:** la vitamine C ou acide L-ascorbique est hydrosoluble. Elle joue un rôle de prévention de l'oxydation dans le plasma et les fluides extracellulaires, dont elle est considérée comme le plus important antioxydant (Delattre *et al*, 2005a). Son action est directe et indirecte, elle agit directement sur les ERO (superoxydes, hydroxyle, singulet oxygène, radicaux lipidiques) et indirectement par son action de régénération de la vitamine E et du GSH. L'organisation spatiale de la vitamine C lui permet de se lier à la phase aqueuse de la vitamine E oxydée dans la membrane cellulaire, et de rapidement lui céder son électron. Après avoir cédé son électron, la vitamine C forme un radical très peu réactif, qui sera ensuite reconverti en vitamine C par une enzyme réductase, qui utilise du

GSH (Clarkson et Thompson, 2000; Morris et Carson, 2003; Shidfar *et al*, 2003; Bleys *et al*, 2006; Lyn Patrick, 2006; Duarte et Jones, 2007; Mac Laren, 2007; Fisher- Wellman et Bloomer, 2009). La vitamine C est principalement antioxydant, mais en doses trop élevées et dans le processus de défense immunitaire, elle peut exercer un action pro-oxydante au travers de son habilité à réduire l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}) qui est un puissant catalyseur de plusieurs réaction redox comme la réaction de Fenton/Haber-Weiss (Sayre *et al*, 2005 ; Mac Laren 2007; Duarte et Jones, 2007). En augmentant la disponibilité du fer ferreux, la vitamine C pourrait favoriser les dommages causés à l'ADN (Duarte et Jones, 2007) et paradoxalement stimuler la réparation de l'ADN oxydé (Duarte *et al*, 2009).

- **Les polyphénols:** les polyphénols constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Les polyphénols sont des métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance, ou la production (Yusuf, 2006). Les polyphénols comprennent une multitude de structures chimiques, à partir de molécules simples comme les acides phénoliques, aux composés hautement polymérisés, tels que les tannins condensés. La famille la plus abondante de polyphénols présents dans l'alimentation humaine, est les flavonoïdes. Les flavonoïdes sont constitués de deux noyaux aromatiques, le phénol et la pyridine, reliés par trois atomes de carbone qui proviennent souvent d'un hétérocycle oxygéné (Galleano *et al*, 2010). Les flavonoïdes sont des piègeurs efficaces des radicaux libres les plus pro-oxydants, particulièrement impliqués dans la peroxydation lipidique. De plus, ils ont une activité chélatrice des métaux tels que cuivre et fer, qui, à l'état libre, peuvent être à l'origine de la production de radicaux libres par les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss (Puppo, 1992).
- **Caroténoïdes:** les caroténoïdes dont la vitamine A, sont d'excellents piègeurs d'espèces radicalaires grâce à leur système conjugué de doubles liaisons. Ils sont responsables de la couleur jaune, orange et rouge des fruits et des légumes (Rao et Rao, 2007), et ils sont des colorants importants dans les oiseaux, les insectes, les poissons et les crustacés (Stahl et Sies, 2005). Les caroténoïdes sont les antioxydants liposolubles et qui sont une source importante de la vitamine A (Rao et Rao, 2007). L'activité antioxydante est connue pour

être l'une des propriétés biologiques les plus importantes des caroténoïdes (Polyakov *et al*, 2006), elle résulte de la capacité de la double liaison conjuguée à délocaliser les électrons non appariés (Rahman, 2007; Van Stijn *et al*, 2008). Les caroténoïdes sont des éboueurs éminents de l'oxygène singulet et des radicaux peroxydes (Deaton et Marlin, 2003). Il existe plusieurs membres dans la famille des caroténoïdes, mais le caroténoïde le plus connu et étudié est le β -carotène, qui est un puissant antioxydant capable d'étancher rapidement l'oxygène singulet (Fusco *et al*, 2007).

➤ **Les oligoéléments**

a) Le sélénium (Se) est un oligo-élément de numéro atomique 34 et de masse atomique 78,96 (Reilly, 2006). il joue un rôle clé dans la protection des cellules et de leurs constituants contre l'attaque radicalaire. Cette fonction est due à sa présence dans le site actif des glutathions peroxydases séléno-dépendantes, et à l'activité biologique antiradicalaire des séléno-protéines (Burk, 2002). Le sélénium a un grand nombre de fonctions biologiques dans l'organisme humain, l'action la plus importante et la plus connue est son effet antioxydant (Navarro-Alarcón et López-Martínez, 2000).

b) Le zinc (Zn) est un oligo-élément de numéro atomique 30 et de masse atomique 66,39 (Mader, 2010). Le zinc joue un rôle antioxydant indirect en assurant la stabilisation de la Cu-Zn SOD. Cependant, au-delà de cette fonction, le zinc possède d'autres propriétés antioxydantes pour lesquelles le mécanisme précis reste encore incomplètement connu (Powell, 2000):

- ✓ Le zinc inhibe la production des espèces radicalaires de l'oxygène ERO par les métaux de transitions, en entrant en compétition avec le fer et le cuivre dans la réaction de Fenton.
- ✓ Le zinc protège les groupements thiols (SH) des protéines contre l'oxydation induite par le fer, en empêchant la formation de ponts disulfure intramoléculaires.
- ✓ L'activité antioxydante du zinc pourrait également passer par l'induction de metallothionéines pouvant piéger les ERO (Delattre *et al*, 2005a).

Autres antioxydants: des propriétés antioxydantes ont été attribuées à des acides aminés, comme la méthionine, la taurine, la glutamine, la N-acetylcystéine (NAC) (Sayre *et al*, 2005 ;

Lyn Patrick, 2006). Ils pourraient être des précurseurs directs ou indirects de la synthèse du GSH dont ils renforcent l'action et seraient capables de piéger et de neutraliser les ERO (Clarkson et Thompson, 2000; Lyn Patrick, 2006; Abilés *et al*, 2008; Sayre *et al*, 2005; Fisher-Wellman et Bloomer, 2009).

1.3.3. Mécanisme d'action des antioxydants

Les antioxydants sont divisés en deux catégories en fonction de leur mécanisme d'action.

1.3.3.1. Mécanisme d'action des antioxydants piégeurs

Les cellules utilisent de nombreuses stratégies antioxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leur niveau d'espèces réactives de l'oxygène. Certains composés antioxydants comme la vitamine E, la vitamine C ou les caroténoïdes et les polyphénols apportés par l'alimentation, agissent en piégeant les radicaux et en captant leur électron célibataire et en les transformant en molécules ou ions stables. Ce type d'antioxydant est appelé piégeur ou éboueur (scavenger ou chain breaking antioxidants). Il existe de plus, des composés endogènes synthétisés par les cellules et jouant le même rôle; le plus important est le glutathion réduit (GSH) qui protège non seulement contre les radicaux oxygénés, mais aussi contre les peroxydes ou le NO• (Favier, 2003).

1.3.3.2. Mécanisme d'action des antioxydants préventifs

Une autre stratégie utilisée dans la lutte contre le stress oxydant, elle est de nature enzymatique, visant à détruire les superoxydes et les peroxydes. Ainsi, les superoxydes dismutases sont capables d'éliminer l'anion superoxyde par une réaction de dismutation. Cette réaction est catalysée par un métal situé au site actif d'enzyme. Les principales enzymes capables de détruire le peroxyde d'hydrogène sont les catalases à cofacteur fer et les glutathions peroxydases à cofacteur sélénium. Il existe de nombreuses autres enzymes antioxydantes comme les peroxy redoxines, l'hème oxygénase, la glutathion sélénio-indépendant (glutathion S-transférase), les thio-redoxines réductases ou les thio-redoxines peroxydases (Favier, 2003).

1.4. Conséquence du stress oxydant

L'équilibre entre les effets positifs et négatifs des radicaux libres est particulièrement fragile. La production de ces radicaux peut être régulée par l'organisme vivant. Les systèmes de

régulation se composent d'enzymes, de protéines, de molécules antioxydantes de petite taille et d'oligoéléments indispensables pour l'activité enzymatiques. Un déséquilibre de la balance antioxydante en faveur de la production des ERO constitue le stress oxydant. Le stress oxydant va dénaturer les lipides, les protéines, l'ADN et provoquer des pathologies (Curtin *et al*, 2002).

1.4.1. Oxydation des protéines

Les protéines sont des constituants cellulaires structurels et fonctionnels, essentiels, qui peuvent subir des modifications oxydatives. L'oxydation des acides aminés, surtout des acides aminés soufrés et acides aminés aromatiques, entraînent des modifications structurales des protéines, facilitant de ce fait leur agrégation ou leur dégradation par les protéases (Squier, 2001). Ces modifications s'accumulent avec l'âge dans de nombreux tissus et altèrent la fonction des organes (Levine et Stadtman, 2001). L'oxydation des acides aminés soufrés entraîne une perte des groupements thiols (Davis *et al*, 2001). Ces altérations concernent particulièrement les enzymes antioxydantes qui contiennent très souvent des groupements thiols (-SH). L'intégrité GSH des membranes cellulaires est également menacée par l'oxydation des protéines du fait de la modification du caractère antigénique et des propriétés fonctionnelles des protéines membranaires (récepteurs ou enzymes) (Gruber *et al*, 2006; Jacob *et al*, 2006). Ces protéines, en perdant leurs propriétés biologiques, deviennent non seulement beaucoup plus sensibles à l'action des protéases et notamment du protéasome, mais aussi très hydrophobes (figure 5).

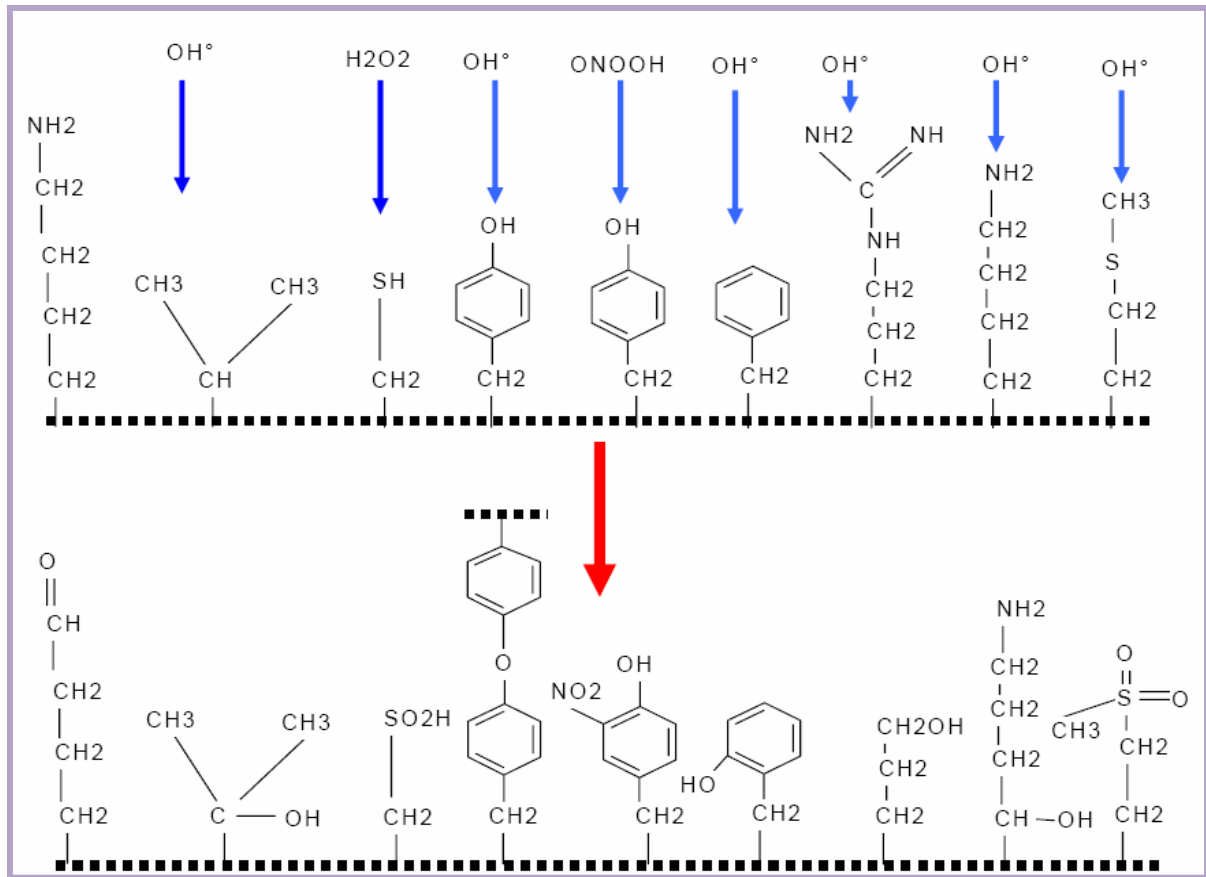


Figure 5 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (Favier, 2003)

1.4.2. Peroxydation lipidique

Les acides gras polyinsaturés sont les cibles privilégiées des ERO radicalaires en raison de leurs hydrogènes bis-allylique facilement oxydable. Plus l'acide gras est insaturé et plus il est susceptible d'être peroxydé, c'est-à-dire dégradé par un processus oxydant non enzymatique. Il s'agit d'un enchaînement de réactions radicalaires organisées en trois phases successives: l'initiation, la propagation et la terminaison (Halliwell, 1989). La phase d'initiation consiste en la création d'un radical d'acide gras ($\text{R}\cdot$) à partir d'un acide gras (RH) par soustraction d'un atome d'hydrogène provenant d'un groupement méthylène ($-\text{CH}_2-$) bis allylique. Cette déshydrogénation peut être provoquée par un initiateur radicalaire tel que le $\cdot\text{OH}$ et le $\text{HOO}\cdot$. Le radical lipidique $\text{R}\cdot$ subit ensuite un réarrangement moléculaire pour donner un radical avec une structure de diène conjugué, plus stable, qui peut réagir avec une molécule d' O_2 et former un radical peroxyde ($\text{ROO}\cdot$). Ce radical est suffisamment réactif pour arracher à nouveau, un hydrogène à un acide gras polyinsaturé voisin, propageant ainsi la réaction. Il est généralement admis que chaque radical $\text{R}\cdot$ peut être à l'origine d'une centaine de molécules

d'hydroperoxyde avant que survienne la phase de terminaison. L'hydroperoxyde lipidique (ROOH) formé peut être oxydé en présence de métaux de transition divalents de Fe^{2+} ou Cu^{2+} et entraîner la formation d'alcalanes et d'aldéhydes toxiques dont le malonyldialdéhyde (MDA) ou le 4-hydroxynonanal (4-HNE). La réaction en chaîne peut être interrompue (phase de terminaison) par l'association de deux radicaux libres et la formation d'un composé stable ou le plus souvent par la réaction du radical avec une molécule antioxydante (Delattre *et al*, 2005a) (figure 6).

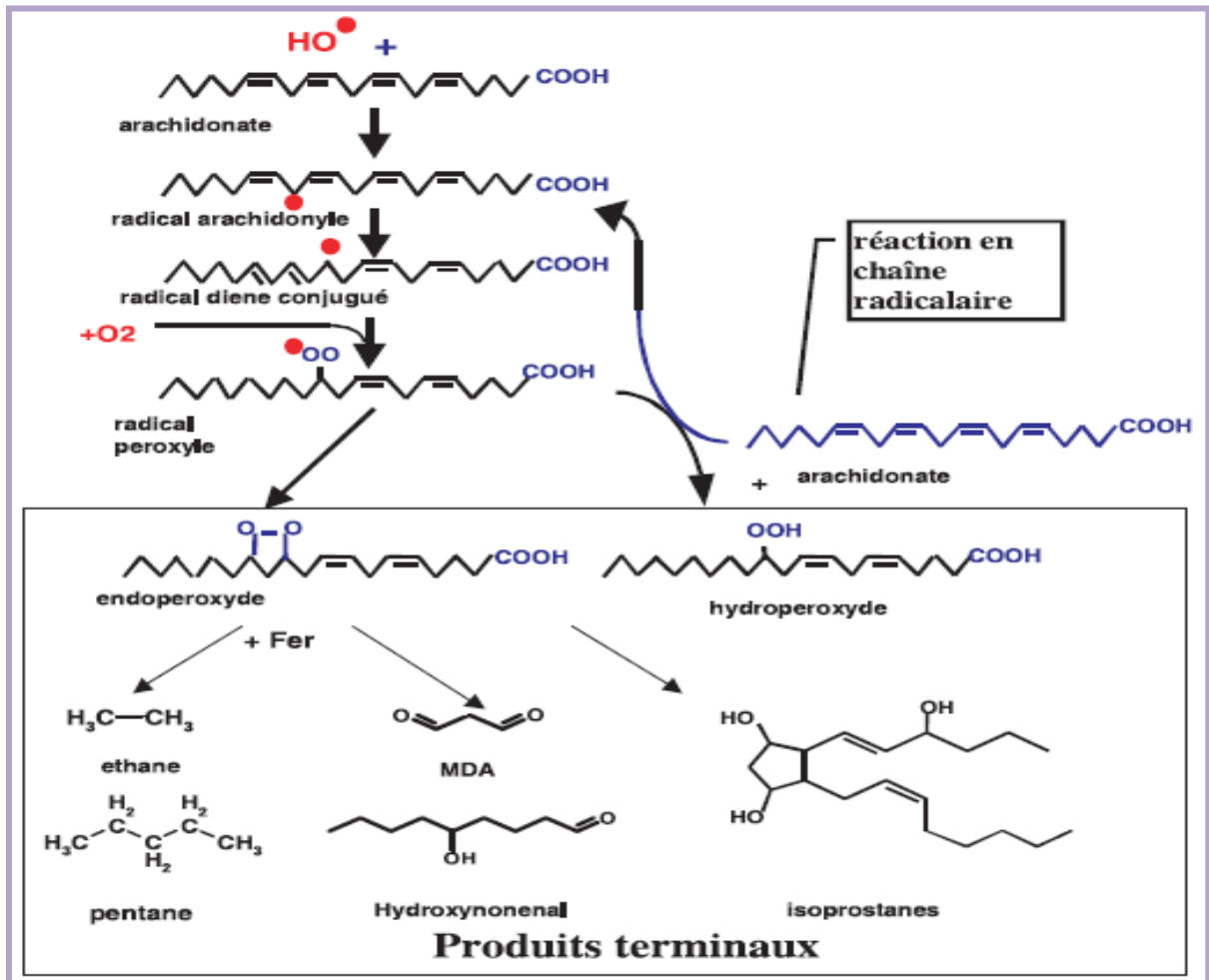


Figure 6: Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (Favier, 2003)

La peroxydation de lipides fournit ainsi une grande variété de produits, dont certains peuvent réagir avec les protéines et l'ADN. Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malonyldialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonanal (4-HNE) ont été étudiés comme marqueur de la peroxydation lipidique.

1.4.3. Dommage de l'ADN

La transmission des caractères héréditaires d'une génération à une autre repose sur l'acide désoxyribonucléique (ADN). Identifié dès la fin du 19^{ème} siècle par Miescher et collaborateurs, l'ADN a été modélisé en 1953, par Watson et Crick. Il existe au sein de la cellule procaryotique deux types d'ADN: l'ADN nucléaire et l'ADN mitochondrial. Ce dernier est la cible privilégiée des oxydations par les ERO du fait de son potentiel de réparation plus faible que celui de l'ADN nucléaire et de sa proximité directe de l'une des principales sources des ERO cellulaires: la chaîne respiratoire mitochondriale. Ainsi, le taux de bases oxydées serait 2 à 3 fois supérieur dans l'ADN mitochondriale par rapport à l'ADN nucléaire (Stevnsner *et al*, 2002). Selon la source des agressions, l'ADN est endommagé de différentes façons. On peut noter quatre classes principales de dommages: les coupures simples et doubles brins, les bases modifiées comme la 8-OHdG qui est un marqueur des dommages oxydatifs de l'ADN, les pontages ADN-ADN et ADN-protéines et les sites abasiques. La figure ci-dessous illustre ces différents dommages (Favier, 2003) (figure 7).

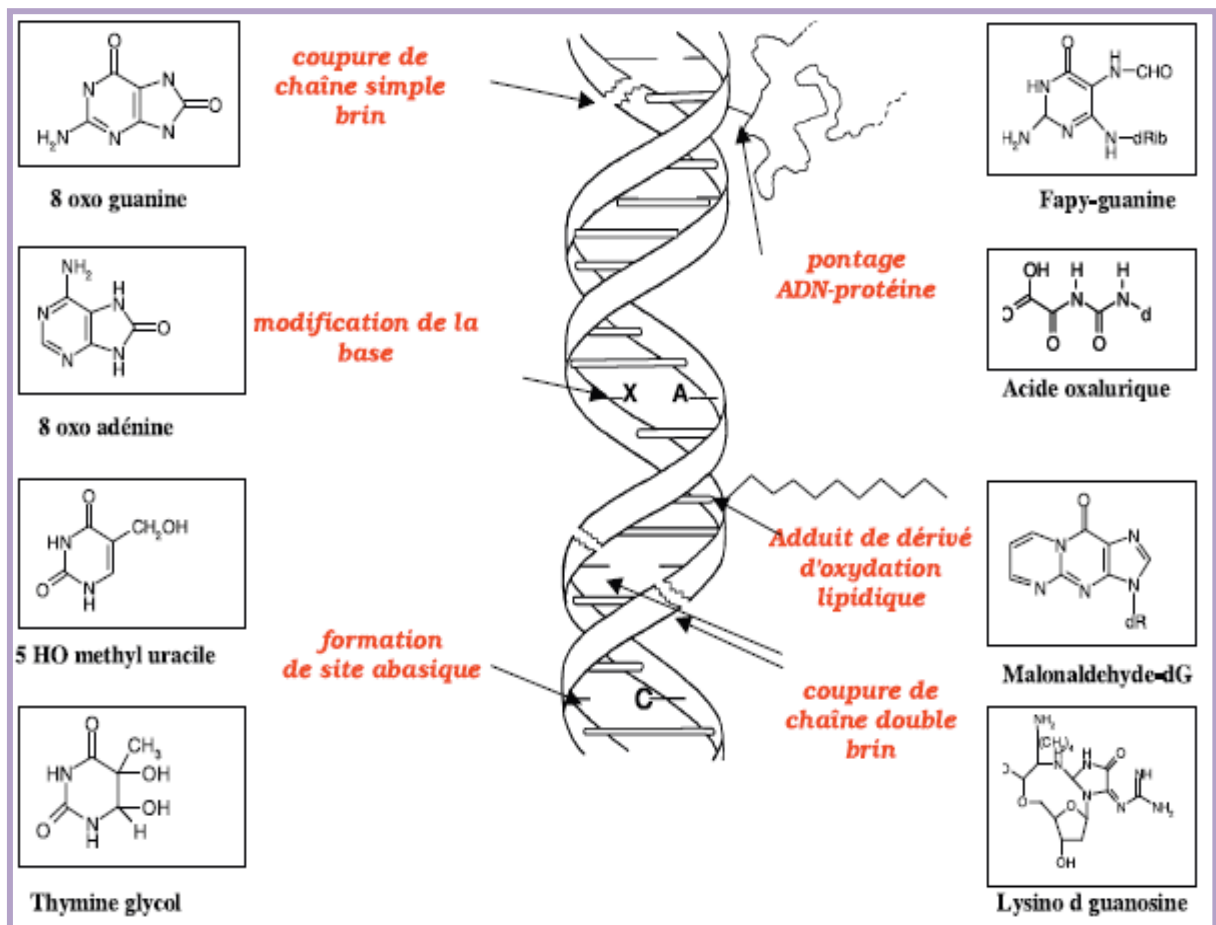


Figure 7 : Principales classes de dommages de l'ADN (Favier, 2003)

1.4.4. Implication du stress oxydant dans les pathologies

Le stress oxydant est potentiellement impliqué dans de nombreuses maladies comme facteur déclenchant, ou associé à des complications lors de leur évolution. Ces pathologies peuvent découler d'intoxications chimiques et médicamenteuses, d'exposition à des rayonnements, d'un syndrome d'hyperoxygénation, de phénomènes inflammatoires. La multiplicité des conséquences médicales de ce stress oxydant vient du fait que de nombreux organes ou tissus peuvent devenir la cible d'un stress oxydant (Bonnetfont- Rousselot *et al*, 2001; Sohal *et al*, 2002; Delattre *et al*, 2005b) (figure 8). Le stress oxydant est impliqué dans le développement des maladies comme: le cancer, les maladies neuro-dégénératives et le vieillissement accéléré.

Il est admis que le stress oxydant est un facteur potentialisant l'apparition de maladies multifactorielles comme les maladies cardiovasculaires, le diabète, et la maladie d'Alzheimer. Si le stress oxydant est réellement un facteur déclenchant ou participant au déclenchement de ces pathologies, il est logique de penser que la prise d'antioxydant peut retarder, prévenir l'apparition de telles maladies. De même, des études (Holzenberger *et al*, 2003; Delattre *et al*, 2005b) ont montré que le vieillissement s'accompagne d'une diminution des défenses antioxydantes, d'une augmentation de la production des ERO, et d'une diminution des systèmes de réparation et de dégradation des constituants oxydés. Une étude épidémiologique (Bonnetfont-Rousselot *et al*, 2001) a montré très clairement que la consommation régulière des antioxydants permet de diminuer l'incidence de l'apparition d'un stress oxydant et ces maladies.

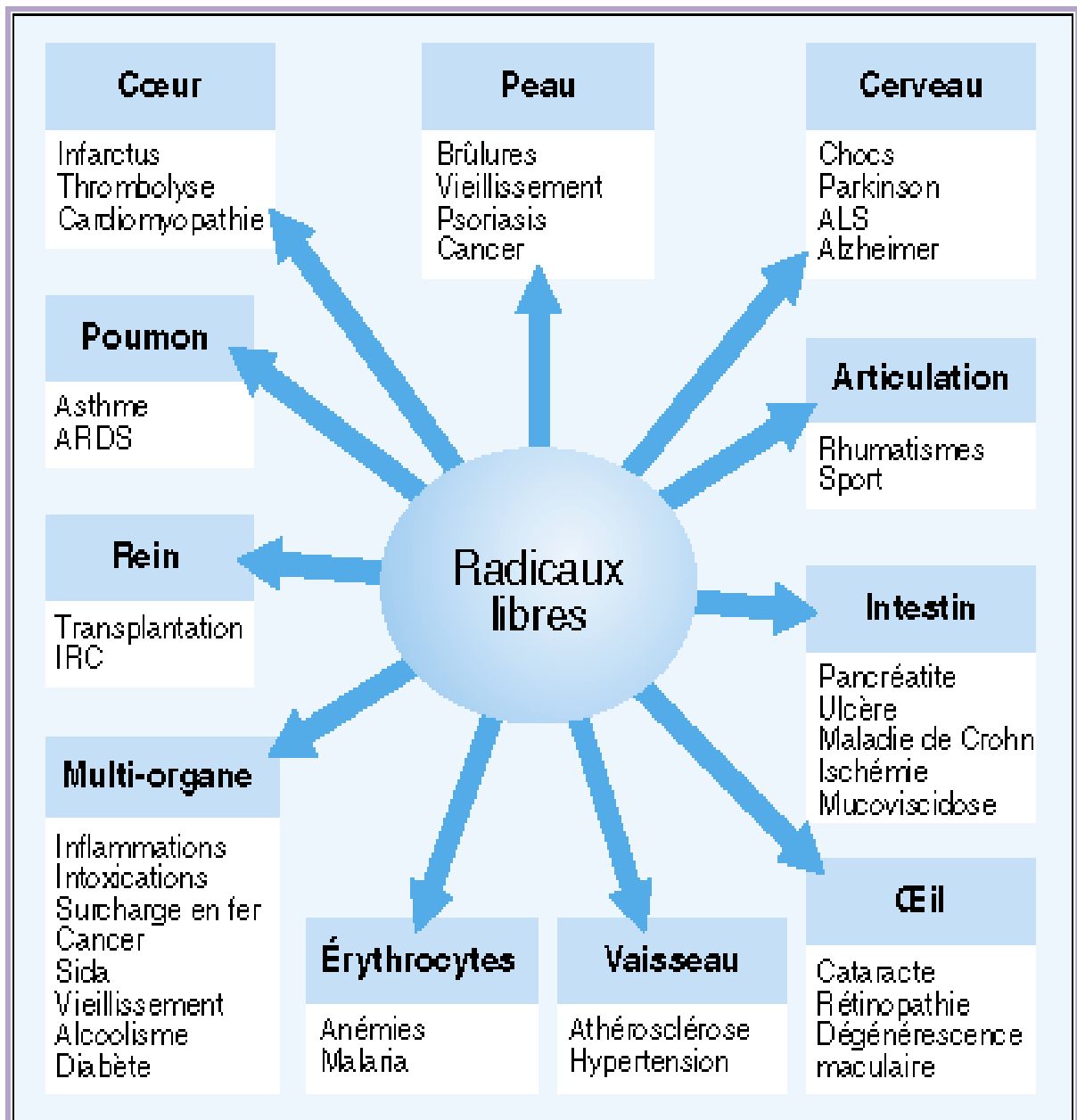


Figure 8: Principales circonstances pathologiques s'accompagnant d'un stress oxydant primitif ou secondaire (Favier, 1997).

ARDS: syndrome de détresse respiratoire aiguë; SIDA: syndrome immunodéficience acquise; ALS: sclérose latérale amyotrophique; IRC: insuffisance rénale chronique

Chapitre 2 :
Le chlorure de cadmium

2. Le cadmium

2.1. Généralités sur le cadmium

Le cadmium (Cd), du Grec kadmeia, fut découvert en 1808 par Magnus Martin af Pontin, mais c'est en 1817 que l'Allemand Friedrich Stromeyer le prépara pour la première fois. Le nom de Cadmium vient du latin cadmia (calamine), l'ancien nom pour " calamine" ou "galmei", un minerai de zinc (Goyer et Clarkson, 2001).

Le cadmium est un métal malléable d'aspect blanc bleuâtre, qui présente une grande résistance à l'oxydation et une bonne conductibilité électrique .Le cadmium est un métal lourd dangereux et toxique qui produit de graves problèmes de santé nocifs chez l'homme (Singh *et al*, 2007). Il est libéré dans l'atmosphère par les opérations d'extraction et de fusion, la combustion des combustibles (Zhang *et al*, 2012; Chen *et al*, 2014), la combustion des déchets municipaux, les boues des eaux usées (Edwards *et al*, 2013), Application de l'engrais phosphaté (Gill *et al*, 2013). Les humains peuvent obtenir du Cd des cultures, des feuilles de légumes et du tabac (Fan *et al*, 2009; Garcí'a-Esquinas *et al*, 2014), du sol (Guo et Zhou, 2006) et des fruits et des graines huileuses (Schwarz *et al*, 2014). Il est connu pour la cytotoxicité, la cancérogénicité, la mutagénicité et la production de radicaux libres connus pour stimuler la dégénérescence oxydante des lipides, des protéines, de l'ADN et l'initiation de diverses affections chez les humains et les animaux (Shalini *et al*, 2017).

Le cadmium est considéré comme un métal lourd non rédox, mais il peut induire un dommage oxydatif en créant des espèces d'oxygène réactif toxique (ERO). Le stress au cadmium entraîne des altérations dans l'homéostasie redox en affectant les activités des enzymes qui aident à maintenir l'homéostasie redox, ce qui génère des ERO en interférant avec la chaîne de transport d'électrons (Ahanger *et al*, 2014; Wu *et al*, 2014). ERO provoque la peroxydation des lipides membranaires, entraînant une perte d'intégrité membranaire et entraîne une fuite. En outre, ERO provoque également l'oxydation des acides nucléiques, des protéines et des chlorophylles, ce qui affecte le fonctionnement normal de la cellule (Alqarawi *et al*, 2014; Abd_Allah *et al*, 2015).

Le cadmium était inconnu jusqu'au 19^{ème} siècle, quand ses caractéristiques physico-chimiques ont été mises en évidence et utilisées plus tard dans les batteries, pour protéger l'acier contre

la corrosion ou encore comme stabilisant pour les plastiques et comme pigment dans les produits céramiques (Jarup, 2002).

Le cadmium stimule la formation de métallothionéines et des espèces réactives d'oxygène, causant ainsi des dommages oxydatifs aux érythrocytes et à divers tissus, ce qui entraîne une perte de fonctions membranaires. L'exposition à long terme augmente la peroxydation lipidique et provoque une inhibition de l'activité du superoxyde dismutase, ce qui entraîne des lésions oxydatives sur le foie, les reins et les testicules (Esther *et al*, 2013)

Les principales voies d'exposition de l'homme au cadmium sont l'alimentation (poissons, mollusques bivalves, végétaux dont les légumes riches en fibres) (Jarup, 2002; Satarug et Moore, 2004) et le tabagisme où le métal inhale se répartit entre une partie repoussée vers le tractus gastro-intestinal par action mucociliaire, une autre migre dans les terminaisons du bulbe olfactif des neurones et une dernière interagit avec les alvéoles pulmonaires (Satarug et Moore, 2004). Le cadmium est véhiculé dans le sang par une métallothionéine hépatique. L'association cadmium-protéine, de faible masse relative, traverse le glomérule et est réabsorbée par le tube contourné proximal, ce qui explique la toxicité rénale du cadmium. Il est principalement stocké dans le foie et les reins. Moins de 10 % du Cd absorbé sont excrétés dans l'urine et les fèces, ce qui explique les différents dommages cellulaires suite à une exposition chronique (Jarup, 2002) figure 9.

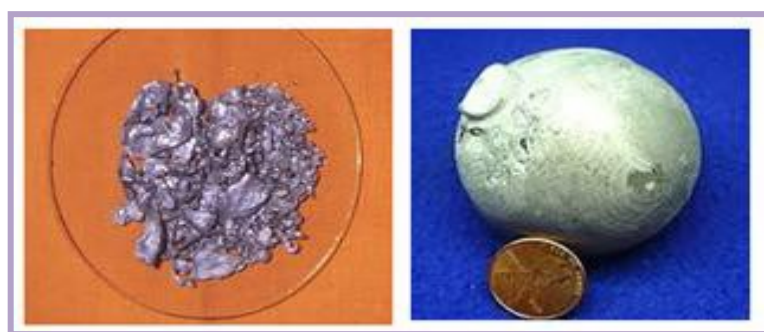


Figure 9 : Aspect du Cadmium (Arris, 2008)

2.2. Les propriétés physico-chimiques du cadmium

Le cadmium est un élément chimique dont le symbole est Cd, il possède de numéro atomique 48, du groupe du tableau périodique (Garin et Simon, 2004), leur masse molaire atomique est de 112,4 g/mol (Arris, 2008) (tableau 1 et 2), Le cadmium appartenant à la famille des métaux de transition, Il existe 8 isotopes naturels stables, 11 isotopes instables et de nombreux

isotopes métastables Ses propriétés chimiques présentent beaucoup de similitudes avec celles du zinc (Garin et Simon, 2004). C'est un élément rencontré en milieu aquatique sous divers formes physiques (dissoute, colloïdale, particulaire) et chimiques (minérale ou organique), a çune grande résistance à la corrosion; il a une bonne conductivité de l'électrifié; ses produits dérivés ont une bonne résistance à la forte température; il présent des caractéristique chimique proches de celles du calcium, en particulier le rayon ionique, facilitant ainsi sa pénétration dans les organismes. Il y est dispersé en petite quantité, soit entre 0,1 mg/kg et 5 mg/kg, majoritairement sous sa forme divalente complexée avec des sulfates, des oxydes et des carbonates (ATSDR, 2008).

Tableau 1 : Les propriétés chimiques du Cadmium (Arris, 2008).

Numéro atomique	48
Masse atomique	112 ,4 g/mol -1
Electronégativité de Pauling	1,7
Masse volumique	8 ,7 g.cm-3 à 20°C
Température de fusion	321°C
Température d'ébullition	767°C
Rayon ionique	0.154 nm
Isotopes	0,097 nm (+2)
Configuration électronique	Kr] 4d ¹⁰ 5s ²
Energie de première ionisation	866 kJ.mol-1
Energie de deuxième ionisation	1622 kJ.mol -1
Potentiel standard	-0,402 V
Découverte	1817. Son nom vient de la mine de zinc de Kadmos près de Thèbes

Tableau 2 : Les Propriétés physicochimiques du cadmium (Barbalace, 2012).

Propriétés	Valeurs
Masse molaire	112 ,41 g/mol
Pression de vapeur	7,5x10 ⁻³ mm Hg à 257
Solubilité dans l'eau	Non soluble à 20 °C
États d'oxydation	2 (0 et +2)

2.3. Utilisation et sources des dérivés de cadmium

2.3.1. Source naturelle

Le cadmium est présent dans l'environnement (roches, sédiments, sol, poussière, air, eau, plantes et animaux, tableau). Il est naturellement présent dans la croûte terrestre (0,11 µg/g) et les roches où il est généralement associé au zinc (Pinot *et al*, 2000). Il est présente dans des roches phosphatiques à des concentrations allant de 0,1 à 100 mg/g et dans les sols avec une concentration de 0,1 à 1 mg/g. La pluie et l'érosion naturelle font en sorte que le Cd rejoint le milieu aquatique et intègre le cycle de l'eau. L'activité volcanique est une source naturelle majeure d'émission de cadmium atmosphérique. Les volcans marins sont aussi à l'origine de la présence de ce métal en mer, mais la quantification de la part de Cd apportée par ces processus n'a pas encore été réalisée (Pichard, 2005) (tableau 3).

Tableau 3: Teneur du cadmium dans l'environnement (Pinot *et al*, 2000)

Milieux	Concentration du Cd
Croute terrestre	0,11µg/g
Roches phosphatiques	0,1 - 100 mg/g
Sols	0,1 - 1 mg/g
Sols de surface	0,07 - 1,1 µg/g
Poussière ménagère	0,42 - 6,6 µg/g
Air de régions inhabitées	< 1 ng/ m ³
Eau non pollué (en générale)	< 1 µg/L
Eau de mer	0,02 - 0,1 µg/L
Eaux côtières et eaux douces	< 0,1 µg/L

2.3.2. Source industrielle

Les activités anthropiques contribuent à l'augmentation des concentrations des métaux dans l'environnement. Durant la seconde moitié du siècle précédent, la production et la consommation du cadmium ont augmenté considérablement dans la plupart des pays industrialisés (Pinot *et al*, 2000). Les quantités mondiales de Cd retrouvées dans l'environnement ont été estimées entre 25 000 à 30 000 tonnes par an, dont 4 000 à 13 000 tonnes sont générées par les activités humaines telles que les exploitations minières et la consommation des combustibles fossiles (Denmark, 2002). Toutefois, Mahler *et al* (2006) rapportent que cette contamination d'origine anthropique tend à diminuer dans certains pays

certainement grâce aux réglementations liées à l'utilisation et au rejet du Cd mises en place au cours de ces dernières décennies. Le cadmium est principalement obtenu (comme sous-produit) à partir des extractions minières de zinc afin d'être utilisé dans le secteur industriel et la manufacture de divers produits. Il est utilisé essentiellement dans les applications suivantes (Al Kaddissi, 2012):

- ✓ Les batteries (nickel- cadmium).
- ✓ Pigments de peinture (plastique, verre et l'émail).
- ✓ Stabilisant dans le traitement des polymères de PVC.
- ✓ Dans l'industrie de plastique.
- ✓ Dans la préparation d'alliages spéciaux.

Ces usages conduisent à répandre le Cd dans l'environnement à cause des émissions atmosphériques, des effluents liquides, des eaux usées, des déchets solides, de boues et de vases. En France, quelques cours d'eau souffrent de contaminations importantes au Cd à cause des activités anthropogéniques comme par exemple le Riou Mort, petit affluent du Lot où les concentrations annuelles moyennes peuvent atteindre 22 µg Cd/L (Morin *et al*, 2007). Les concentrations en Cd des eaux côtières de Patras en Grèce peuvent atteindre la concentration de 9 µg/L. Les concentrations de Cd retrouvées dans le delta de l'Ebre en Espagne sont de l'ordre de 4,24 à 5,22 µg Cd/L. Dans l'estuaire Reghaia en Algérie les concentrations de Cd peuvent atteindre 200 à 1000 µg/L (Al Kaddissi, 2012). Le tableau 4 résume les sources les plus importantes et les quantités d'émission de Cd en Europe.

Tableau 4: Emissions de cadmium en Europe (Pinot *et al*, 2000)

Émissions du cadmium en Europe	Cadmium (tonnes/an)
Dépôts de déchets solides	4425
Rejets issues des incinérations	29
Emissions des industries d'acides phosphoriques	157
Déchets solides issues de la production du fer et de l'acier	300
Combustion du pétrole	49
Fertilisants	374
Epanchages et boues d'épuration	52
Activités industrielles	55
Cycle de l'eau	98

2.4. Pollution au cadmium dans l'environnement

Le cadmium ne se dégrade pas dans l'environnement, mais des processus physiques et chimiques peuvent modifier sa spéciation, sa mobilité, sa biodisponibilité et son temps de séjour dans différents milieux. Chaque compartiment de l'environnement représente une source d'exposition. L'évaluation des émissions atmosphériques de cadmium en France était de 9,4 tonnes en 2002. Les rejets industriels varient fortement suivant les activités et les régions mais les émissions atmosphériques de cadmium proviennent principalement de la métallurgie. Le traitement des ordures ménagères est responsable en France par exemple d'environ 7 % des émissions de cadmium (4 mg/kg de matière sèche). Les sels de cadmium, très peu volatils, sont présents dans l'air sous forme de très fines particules solides (fumées ou poussières). Lors d'expositions professionnelles ou environnementales, ces particules peuvent être inhalées et se déposer principalement dans les alvéoles pulmonaires. La valeur guide pour la concentration du cadmium dans l'air, proposée par le bureau Européen de l'Organisation Mondiale pour la Santé est de 5 ng/m³. En plus des rejets atmosphériques, une partie du cadmium part directement dans le sol et les eaux. Cette pollution résulte essentiellement des activités métallurgiques, minières et agricoles. L'utilisation d'engrais phosphatés introduit par exemple une pollution par le cadmium dans l'eau et donc au niveau de la chaîne alimentaire (82 tonnes par an). Les normes européennes fixent une limite pour l'eau potable à 5 µg/L de cadmium.

L'eau est un élément très important pour la pollution par les métaux lourds, car elle sert d'une part de vecteur, mais peut également entraîner des modifications chimiques selon la salinité ou la température, ce qui est essentiel puisque les divers composés du cadmium présentent des effets toxiques variables selon leur solubilité et donc leur facilité d'assimilation par un organisme (Jumarie *et al*, 2001). L'exemple de la pollution de la Gironde par le cadmium et le zinc illustre ce double rôle de l'eau. L'origine de cette pollution doit en effet être cherchée bien en amont, au niveau du bassin de Decazeville, où une ancienne mine de zinc (usine de Vieille Montagne) a laissé près d'un petit ruisseau, le Riou Mort, des terrils d'extraction riches en cadmium, et en zinc (Audry *et al*, 2004). L'augmentation progressive de la salinité dans l'estuaire provoque la désorption du cadmium des particules en suspension qui se retrouve sous forme Cd²⁺, CdCl⁺, et CdCl₂, espèces beaucoup plus bio disponibles pour les organismes aquatiques et notamment pour les bivalves filtreurs. Conséquence directe de cette

pollution: une concentration en Cd particulièrement élevée dans les huîtres de l'embouchure (Boutier *et al*, 2000).

2.5. Toxicocinétique du cadmium chez les êtres vivants

2.5.1. Absorption du cadmium dans l'organisme

Les fumées et les vapeurs de cadmium sont principalement absorbés par la voie respiratoire. De façon générale, le site de déposition et la sévérité de l'atteinte pulmonaire dépendent principalement des caractéristiques physico-chimiques des particules de cadmium (spéciation, granulométrie, degré d'hydro solubilité etc.), de sa concentration atmosphérique et de la dose inhalée (Schwartz et Blaski, 2000). Les particules fines de grande taille (diamètre aérodynamique $> 5 \mu\text{m}$) se déposent préférentiellement au niveau des voies aériennes supérieures et celles de plus petite taille ($< 5 \mu\text{m}$) dans le poumon profond, dans les bronchioles et les alvéoles. En revanche, les nanoparticules inhalées ($< 100 \text{ nm}$) ont des mouvements de diffusion dus aux mouvements thermiques des molécules inhalées et exhalées au contact de celles-ci. Cette propriété affecte le comportement de déposition classiquement observé avec un aérosol de particules de taille micrométrique, conduisant ainsi à une déposition massique moins importante au niveau alvéolaire et plus importante au niveau du nasopharynx et de l'arbre trachéo-bronchique (Oberdorster *et al*, 2005). L'absorption par voie respiratoire est variable (10 à 30 % pour les poussières d'oxyde de cadmium et 25 à 50 % pour les fumées d'oxyde de cadmium). L'absorption par voie digestive est faible (environ 5 %) et est facilitée par la carence martiale (Andersen *et al*, 2004) et par des régimes carencés en fer, en calcium et en zinc (Olsson *et al*, 2002; Reeves et Chaney, 2002; Reeves et Chaney, 2004) et diminuée par des régimes riches en fibres (Andersen, 2004). Il est important de noter que le cadmium fixé à des protéines est mal absorbé. L'âge semble être également un facteur important. En effet, un âge inférieur à 40 ans est associé significativement à une augmentation de l'absorption digestive de cadmium (Horiguchi *et al*, 2004). L'exposition par contact cutané est très négligeable, voire quasi nulle et ne sera pas abordée ici (Nordberg *et al*, 2007).

2.5.2. Distribution et métabolisme du cadmium dans l'organisme

Après avoir été absorbé au niveau des épithéliums pulmonaires et/ou intestinaux, le Cd se retrouve dans la circulation sanguine lié à une fraction de haut poids moléculaire (correspondant à l'albumine) et à une fraction de faible poids moléculaire (Nordberg *et al*, 2007). Cette dernière fraction correspond à la métallothionéine (MT) possédant un poids

moléculaire de 6 à 7 KDa, composée de 60 à 70 acides aminés et très riche en cystéine (30 %). La MT fixe les métaux, dont le cation métallique Cd^{2+} , par l'intermédiaire des groupements thiols (-SH) de ses nombreuses cystéines. Dans ce cas, il y a formation du complexe MT-Cd. Sous forme complexée, le Cd ne peut exercer son effet toxique et ainsi l'organisme est protégé. La MT libre est appelée thionéine. La synthèse de la MT sanguine et tissulaire est induite par la présence de certains métaux dont le Cd et le Zn (Nordberg *et al*, 2007).

Ainsi, le Cd circulant dans le sang se retrouve complexé à la MT, et qui est distribué aux autres parties de l'organisme. Le Cd se retrouve essentiellement dans le cortex du rein et dans le foie; en effet, chez les humains faiblement exposés, environ 50 % de la charge corporelle est retrouvée dans le cortex des reins, 15 % dans le foie et 20 % dans les muscles (Nordberg *et al*, 2007), mais la thyroïde, le pancréas, les testicules et la vésicule biliaire peuvent également en contenir en concentrations assez élevées. Des études ont montré que l'accumulation de Cd dans le corps humain augmente avec l'âge. Les femmes ont montré avoir des niveaux sanguins plus élevés de cadmium que les hommes, car on croit que les femmes absorbent plus de cadmium que les mâles après une exposition orale. (Olsson *et al*, 2002) et qu'au cours des années, il s'accumule jusqu'à atteindre une concentration maximale vers l'âge de 50 ans. Ces pourcentages de répartition varient selon l'âge, l'exposition quotidienne, mais aussi le tabagisme (López-Herranz *et al*, 2016).

2.5.3. Elimination du cadmium

Le transport du cadmium dans le sang s'effectue sous forme liée à des MT, à l'albumine ou dans les érythrocytes. Dans les reins, la faible dimension du complexe Cd-MT facilite son passage à travers les glomérules vers les tubules rénaux où il pénètre facilement par pinocytose dans les cellules tubulaires où il est dissocié puis réabsorbé par les cellules du tubule proximal jusqu'à une dose critique, contrairement au complexe Cd-albumine qui ne passe pas la barrière glomérulaire du fait de son haut poids moléculaire. En se liant notamment à la mégaline et à la cubiline apicales. Les vacuoles de pinocytose fusionnent avec les lysosomes dont les enzymes dégradent les MT et libèrent ainsi le cadmium. Lorsque la concentration critique est dépassée, des atteintes tubulaires surviennent correspondant à une enzymurie, protéinurie de bas poids moléculaire, une augmentation de l'excrétion urinaire de cadmium sous la forme complexée aux métallothionéines ou libre (EFSA, 2009).

2.5.4. Excrétion

Le processus d'excrétion est faible mais important d'un point de vue toxique et son ralentissement entraîne un risque d'accumulation accrue du Cd pouvant mener à des effets toxiques. Une faible proportion de Cd absorbé est excrétée principalement par l'urine et les fèces (0,01 - 0,02 % de la charge corporelle totale de Cd quotidienne) le contenu des fèces en Cd représente un bon indicateur de la consommation quotidienne par voie alimentaire, tandis qu'il n'est pratiquement pas éliminé par la sueur, les ongles ni les cheveux. L'excrétion du Cd par l'urine augmente avec l'âge (comme son accumulation dans l'organisme), et proportionnellement à la charge corporelle totale (Nordberg *et al*, 2007).

Aussi, une faible proportion de Cd d'origine biliaire et pancréatique se retrouve excrétée dans les fèces sous forme complexée au glutathion réduit (GSH) grâce au groupement thiol (-SH). La sécrétion biliaire permet d'éliminer les molécules non excrétées par le rein mais elle peut être contrebalancée par un cycle entéro-hépatique. En effet, la bile contenant le GSH-Cd est déversée dans le duodénum par l'ampoule de Vater (Braunwald *et al*, 2001). Ce conjugué peut subir une hydrolyse et redonner naissance au Cd libre qui est alors à nouveau réabsorbé au niveau du duodénum et transporté au foie par la veine porte-hépatique. A ce niveau là, le foie déverse la bile contenant les nouveaux complexes GSH-Cd dans la lumière duodénale ce qui reproduit le cycle entéro-hépatique. Ce dernier peut être la cause d'un effet toxique prolongé du Cd qui est ainsi éliminé plus lentement, ce augmente d'autant plus sa demi-vie. La faible et lente excrétion du Cd est due à sa grande rétention par l'organisme. En effet, sa demi-vie biologique a été évaluée pour le foie, les muscles et les reins. Elle varie de 10 à 30 ans soit 15 à 40 % de la vie humaine. En raison de sa longue demi-vie biologique et de sa réabsorption au niveau des tubules proximaux, le Cd s'accumule dans les reins durant la majeure partie de la vie humaine (Stohs *et al*, 2000) (figure 10).

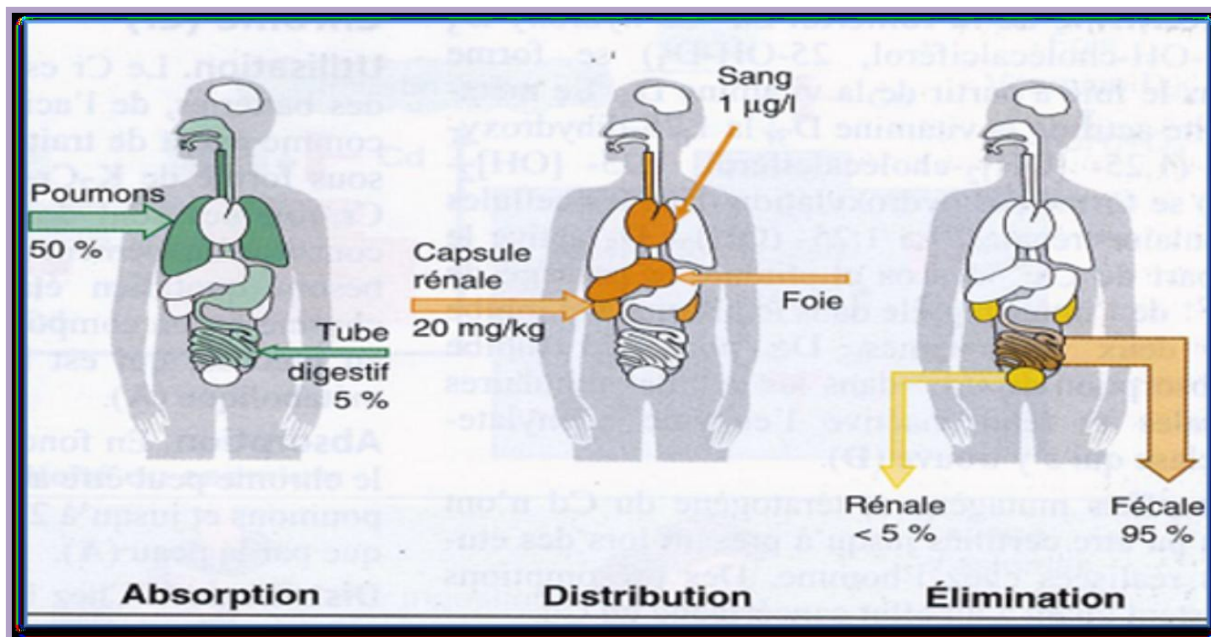


Figure 10 : La voie du cd dans le corps (Evelyne, 2006)

2.6. Toxicodynamie du cadmium

Le cadmium est toxique pour l'environnement et même très toxique sous toutes ses formes (métal, vapeur, sels, composés organiques). Cette toxicité a été observée sur des microbes et des champignons du sol, des insectes, des micro-organismes aquatiques. Incontestablement, le cadmium pose un vrai problème de toxicité du fait que ce ne soit pas un élément indispensable à l'organisme mais qu'il soit électrophile, qu'une fois absorbé, il ne subisse aucune dégradation métabolique et que par sa forte rétention dans l'organisme il soit très faiblement éliminé résultant en une longue demi-vie biologique chez l'homme (Carrière *et al*, 2001). L'OMS classe le cadmium parmi les agents cancérigènes de type I, et beaucoup d'effets nocifs sur la santé humaine ont été associés à une exposition aiguë ou chronique au cadmium. Les organes cibles sont souvent les organes d'absorption (épithéliums intestinal et pulmonaire) mais indépendamment de la voie d'absorption, des effets toxiques sur les reins, le foie, les os et les poumons sont connus et le Cd pourrait exercer un puissant effet oestrogénique *in vivo*, imitant ainsi l'action d'hormones féminines (Johnson *et al*, 2003). De sa part, le centre international de recherche sur le cancer (CIRC) classé le cadmium comme un cancérigène pour l'homme. de nombreuses études ont démontré que ce métal peut induire de multiples cancers au niveau des reins, des poumons, des testicules ou de la prostate (Picot A, 2006).

➤ **Toxicité aiguë:** une intoxication aiguë peut être le résultat de l'ingestion d'une concentration importante de Cd provenant de boissons ou de nourritures contaminées. En effet, il a été rapporté que l'ingestion de boissons contenant une concentration élevée de Cd cause des nausées, des vomissements et des douleurs abdominales importantes (Nordberg *et al*, 1985). Une exposition à des vapeurs contenant du Cd est aussi susceptible de causer une toxicité aiguë. Des études démontrent aussi qu'une inhalation aiguë de Cd peut causer la mort chez les animaux de même que chez l'humain. Plusieurs cas d'expositions aiguës accidentelles et mortelles ont été rapportés chez l'homme. Pendant ces expositions aiguës, les symptômes initiaux relativement faibles durant quelques jours sont suivis d'œdème pulmonaire sévère et de pneumonie menant au décès causé par un arrêt respiratoire (Seidal *et al*, 1993).

➤ **Toxicité chronique:** de façon réaliste, c'est suite à des expositions répétées à de faibles doses que la population générale risque d'être affectée par la toxicité du Cd. Les effets d'une exposition chronique sur différents organes seront détaillés ci-dessous.

✚ **Atteinte osseuse:** plusieurs études ont montré une forte relation entre l'intoxication par le cadmium et des dommages osseux. Le cadmium entraîne un dérèglement du métabolisme du calcium. Ce dérèglement peut mener à des troubles de la masse osseuse comme l'ostéomalacie ou l'ostéoporose. La maladie *Itai-Itai*, décrite initialement au Japon en 1967, entraîne des perturbations du métabolisme du Ca avec apparition d'une décalcification osseuse entraînant de troubles ostéomalaciques, d'insuffisance rénale, de douleurs osseuses et de fractures. Cette maladie est due à une ingestion de riz contaminé par le cadmium ayant été déversé en amont dans les cours d'eau irriguant les rizières. Des études sur des animaux de laboratoire indiquent que les sujets plus jeunes sont plus susceptibles que les adultes à subir une perte de la masse osseuse suite à une exposition orale au Cd. Ces études démontrent aussi que plus la diète est pauvre en calcium, en protéines, en fer ou en gras, plus l'absorption de cadmium sera importante (Reeves et Chaney, 2002; Reeves et Chaney, 2004). Après avoir ressenti dans un premier temps des douleurs dans le dos et les jambes, les victimes sont la cible de fractures spontanées du squelette. Ses symptômes incluent des dommages nécrotiques au niveau des reins et du foie, des lésions ostéoporotiques et ostéomalaciques, ainsi qu'une fragilité accrue aux fractures, particulièrement chez les femmes post-ménopausées. L'étiologie de la maladie *Itai-itaï*, mot japonais pour « aïe-aïe », est généralement attribuée aux dysfonctions rénales perturbant l'activation de la vitamine D (Ernie, 2006). La figure 11 illustre une ostéoporose humaine résultant d'une exposition lente au cadmium.



Figure 11: Ostéoporose (Amincissement et fragilisation de l'os). À gauche, la substance osseuse normale. À droite, la substance osseuse d'une personne atteinte d'ostéoporose (Goyer et Clarkson, 2001)

✚ **Atteinte pulmonaire:** le contenu en cadmium du tabac est élevé à cause des propriétés des plantes *Nicotiana* qui peuvent accumuler le cadmium en se préservant de ses effets délétères. Le cadmium présent dans le tabac varie entre 0,5 à 1 μg /cigarette. L'oxyde de cadmium produit au cours de la combustion est fortement biodisponible. Environ 10 % de l'oxyde de cadmium inhalé se dépose dans les alvéoles pulmonaires et 30 à 40 % passe dans la circulation sanguine par un mécanisme non élucidé à ce jour mais qui pourrait utiliser le transporteur DMT1 (Divalent Metal Transporter 1). Les fumeurs ont donc une concentration sanguine de cadmium 4 à 5 fois plus élevée que les non-fumeurs et ils accumulent 2 à 3 fois plus de métal dans les reins (Satarug et Moore, 2004). Aussi, comme dans le cas d'une intoxication aigüe par inhalation de particules atmosphériques, le cadmium sous forme de très fines particules solides issues de la combustion du tabac peut s'accumuler et se déposer dans les alvéoles pulmonaires. Il en résulte des fibroses interstitielles et des emphysèmes (Hart *et al*, 2001) allant même jusqu'aux adénocarcinomes pulmonaires. Les mécanismes par lesquels le cadmium engendre ces pathologies ne sont pas entièrement compris mais sa capacité à produire un stress oxydant semble importante dans le mécanisme de cancérogenèse (Waalkes, 2003).

✚ **Atteinte rénale:** le rein semble être l'organe le plus touché par les méfaits du cadmium (Barbier *et al*, 2005). Le Cd peut se lier aux métallothionéines (MT-Cd) du foie et être transporté aux reins via la circulation systémique. Une fois dans les reins, les complexes MT-Cd sont stockés dans les lysosomes où ils seront catabolisés. Le Cd ainsi libéré peut à

nouveau se lier aux MTs intracellulaires où induire de la néphrotoxicité (Goyer et Clarkson, 2001). Environ la moitié de la quantité de Cd accumulée dans le corps est présente dans les reins. De fortes expositions à long terme causent des dommages rénaux principalement aux cellules du tubule rénal et du glomérule (Berglund *et al*, 2000). Le premier signe de lésions rénales causées par le Cd est habituellement une dysfonction tubulaire mise en évidence par l'augmentation de l'excrétion de protéines ayant un faible poids moléculaire dont la β 2-microglobuline, l' α -microglobuline et la N-acétyl glucosaminidase (Thevenod, 2003) et de dommages pouvant être caractérisés par l'augmentation de l'excrétion urinaire de glucose, d'acides aminés et de calcium suite à une capacité affaiblie de réabsorption (Goyer, 1996).

✚ **Atteinte du système reproducteur:** le cadmium semble interférer avec la voie stéroïdogénique ovarienne. De faibles concentrations de cadmium stimulent la biosynthèse ovarienne de progestérone alors que des concentrations élevées la bloquent (Henson et Chedrese, 2004). L'exposition des femmes enceintes au cadmium est associée à un poids de naissance faible et à une augmentation de l'avortement spontané. Le cadmium pourrait également exercer un puissant effet oestrogénique *in vivo* et avoir des effets décelables en provoquant un développement mammaire et utérin à des concentrations comparables à celles mesurées dans l'environnement (Johnson *et al*, 2003).

✚ **Cancérogénicité du cadmium:** il existe plusieurs preuves de la cancérogénicité du cadmium, notamment en ce qui concerne le cancer rénal chez l'homme (Il'yasova, 2005). L'IARC, 2012 (International Agency for Research on Cancer) a en conséquence classifié le cadmium comme un élément carcinogène du groupe I. Les mécanismes moléculaires de la carcinogenèse induite par le cadmium ne sont pas encore compris. On peut cependant citer que la régulation de la signalisation mitogène est altérée par le cadmium, ainsi que les mécanismes de réparation et d'acquisition d'une résistance apoptotique (Goyer *et al*, 2004) (figure 12).

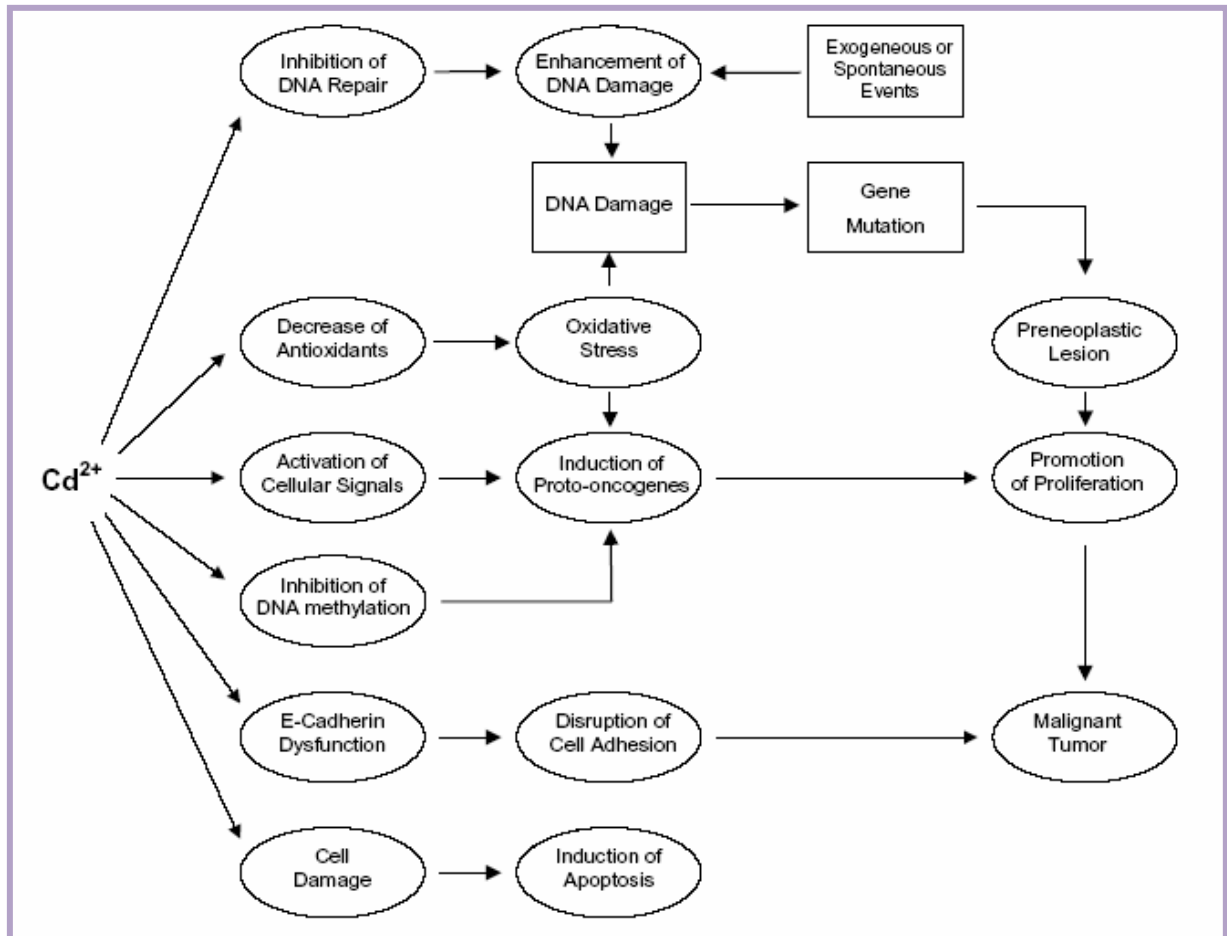


Figure 12: Résumé des effets moléculaires impliqués dans la carcinogenèse du cadmium (Waisberg *et al*, 2003).

- Dans la première colonne, sont décrites les cibles biochimiques immédiates du Cd.
- La deuxième colonne présente les conséquences au niveau de la physiologie cellulaire: inhibition de la réparation de l'ADN; inhibition des antioxydants entraînant ainsi le stress oxydant; activation des signaux et induction des proto oncogènes cellulaires; inhibition de la méthylation de l'ADN; rupture de l'adhérence cellule-cellule.
- La colonne de droite montre les liens probables entre les différentes étapes dans la carcinogenèse.

2.7. Le stress oxydatif et le cadmium

Les effets toxiques du Cd sont essentiellement indirects. Ce métal lourd non oxydoréducteur en milieu biologique provoque une diminution des taux cellulaires des principaux systèmes antioxydants. Des expositions courtes au Cd semblent inhiber les enzymes antioxydantes comme la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GSH-Px) (Szuster-Ciesielska *et al*, 2000). Par contre des expositions prolongées entraînent une augmentation des activités de certaines enzymes (Potts *et al*, 2001; Waisberg *et al*, 2003) et de l'expression de certaines protéines comme les métallothionéines, probablement à cause d'une adaptation suite à l'induction des gènes codant pour ces molécules. L'autre possibilité

expliquant l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) en présence de cadmium correspond au déplacement des métaux constituant la structure des SODs (Filipic *et al*, 2006; Huang *et al*, 2006).

Ces altérations des molécules antioxydantes et de l'homéostasie des métaux physiologiques comme le calcium, le fer, le cuivre et le zinc peuvent se traduire:

- ✓ par une démétallation des protéines,
- ✓ une altération des fonctions cellulaires faisant intervenir des thiols réactifs (antioxydants, oxydoréductases, protéines fer-soufre, signalisation redox basée sur des thiols réactifs),
- ✓ une interférence dans la signalisation dépendante du calcium (Aramini *et al*, 1995).

L'impact du cadmium sur toutes ces cibles peut entraîner l'augmentation de la quantité des ERO tels que les radicaux hydroxyles, superoxyde, ou le peroxyde d'hydrogène (Waisberg *et al*, 2003; Fotakis *et al*, 2005; Oh *et al*, 2006). Les ERO vont engendrer une situation de stress oxydant dans la cellule et donc des dommages oxydatifs au niveau des macromolécules biologiques (peroxydation lipidique, lésions de l'ADN, modifications oxydatives des protéines) (Hansen *et al*, 2006; Lopez *et al*, 2006; Hansen *et al*, 2007). Gichner *et al*, 2004, ont démontré qu'aux faibles concentrations de Cd, les lésions induites sur l'ADN sont liées préférentiellement aux mécanismes indirects. Certains auteurs ont démontré que le Cd peut interférer avec la chaîne respiratoire de la mitochondrie et induit la production des ERO. En effet, il s'intercale entre la semi-ubiquinone et le cytochrome b du complexe III de la chaîne respiratoire. La semi-ubiquinone devient instable et transfère un électron à la molécule d'oxygène pour former l'anion superoxyde (Wang *et al*, 2004) (figures 13 et 14).

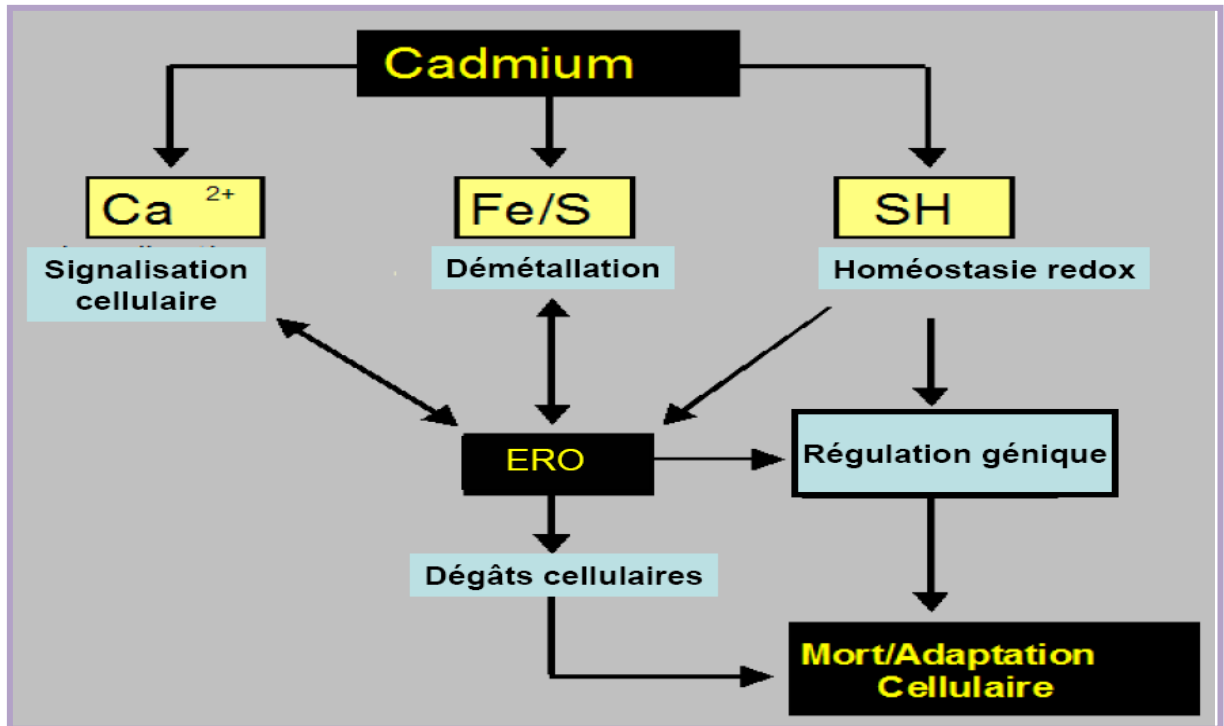


Figure 13 : L'impact du cadmium sur ses cibles cellulaires conduit à la production des ERO (Fotakis *et al*, 2005; Oh *et al*, 2006)

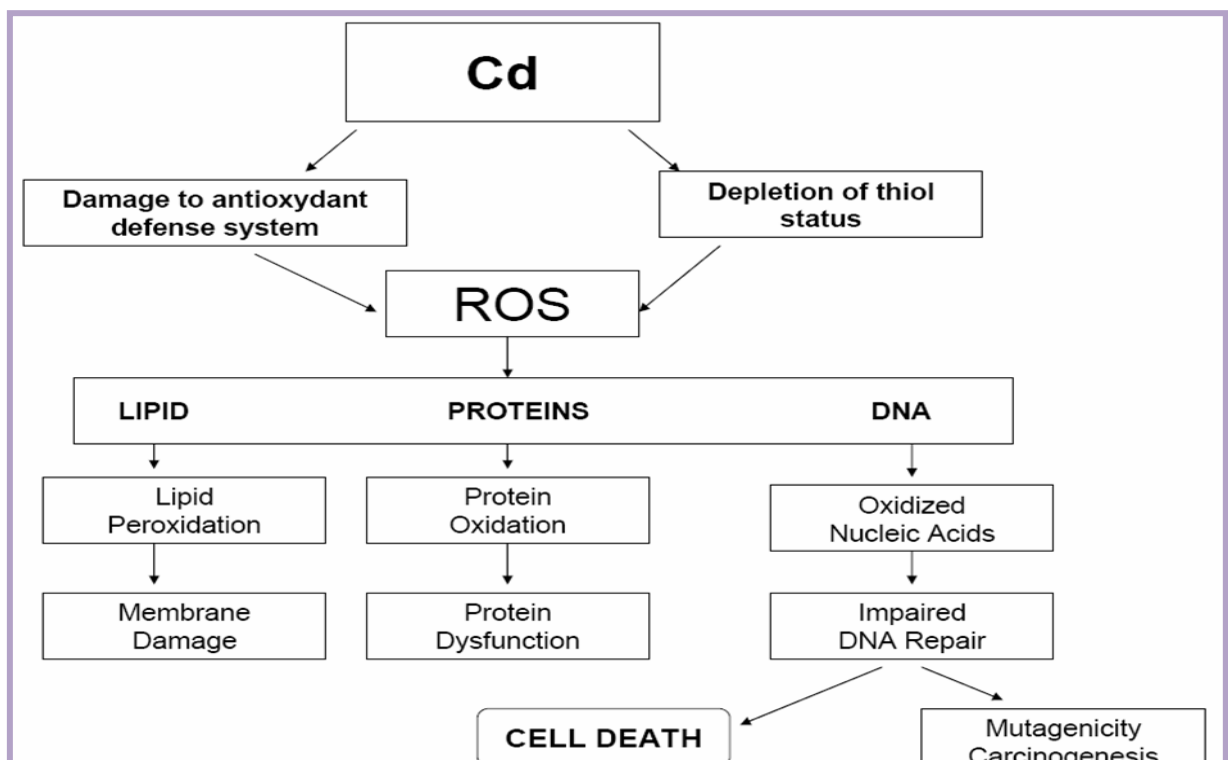


Figure 14: Mécanismes d'induction du stress oxydant par le Cd (Ercal *et al*, 2001).

Chapitre 3 :
Nigella sativa

3. Nigella Sativa

3.1. Généralités

L'utilisation de produits naturels comme médicaments a considérablement augmenté au cours de la dernière décennie pour traiter de nombreuses pathologies au lieu de l'utilisation de drogues synthétiques en raison de leur sécurité, de leur disponibilité et de leur facilité d'administration (Heba *et al*, 2014).

La nigelle nous offre des petites graines aromatiques menées d'une noire intense communément connues sous le nom de "Cumin noir" en français, "Black seed" en anglais, "Sanoudj", "habbet essouda" et "habbet el baraka" dans presque tout les pays arabe (Majdalawieh et Fayyad, 2016). La nigelle est une plante herbacée appartenant à la famille des renonculacées (Guignard, 2001). C'est une herbe originaire du moyen orient, de l'Europe centrale et de l'ouest de l'Asie (Aljabre *et al*, 2005), elle est maintenant cultivée dans plusieurs régions du monde surtout dans le bassin méditerranéen et en Inde (Talbi *et al*, 2015). Elle se développe sur les terres semis arides au sein de communautés naturelles ou prédominent les thérophytes (Antuono et hamaza, 2002; Badary *et al*, 2003). Traditionnellement utilisée dans les pays arabes, dans le sous-continent indien et en Europe depuis des millénaires à des fins culinaires et médicinales. C'est un remède naturel pour de nombreuses pathologies, notamment pour le traitement de l'asthme, de l'inflammation, de la toux, de l'eczéma, des états grippaux, l'hypertension, les maladies cardiovasculaires, les problèmes digestifs, la diarrhée et stimulants de l'appétit, etc. (Khan *et al*, 2011; Majdalawieh et Fayyad, 2015) (figure 15).

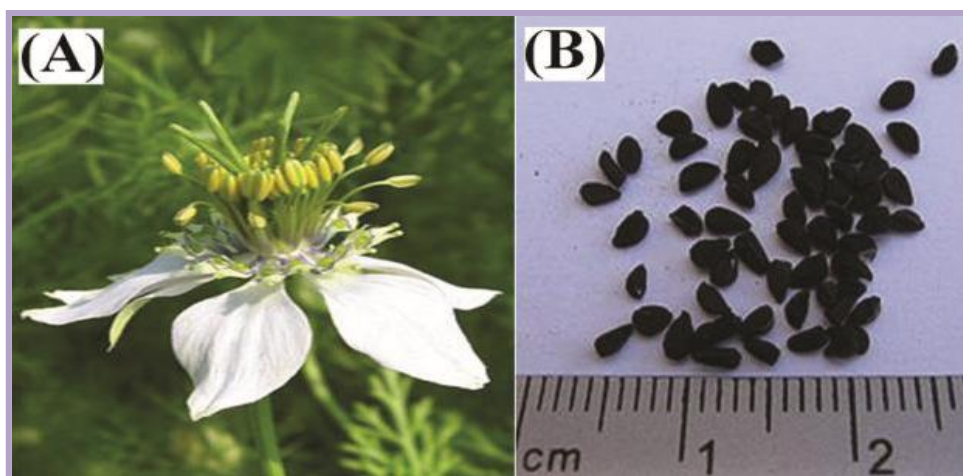


Figure 15: (A) Fleur de nigella sativa (B) Graines de nigella sativa (Dollah *et al*, 2013)

3.2. L'historique de la nigelle

La nigelle tient une place importante parmi les plantes médicinales les plus utilisées et ce, depuis plus que 2000 ans. Connue depuis l'antiquité romaine, elle fit partie des condiments observés sur les papyrus, les peintures murales et les sculptures de l'Égypte ancienne (Teuscher *et al*, 2005). Des archéologues ont trouvé une fiole d'huile de cumin noir dans le tombeau du Pharaon Toutânkhamon (1353-1343 av. J. C.). Selon certaines sources, cette huile était utilisée comme produit de beauté par Cléopâtre et Néfertiti. C'était aussi l'un des précieux remèdes prodigués par les médecins personnels des pharaons qu'ils exploitaient pour son action digestive après les repas copieux et aussi contre les maux de tête, de dents, les infections diverses, les inflammations et allergies en tous genres (Saidi, 2010).

La civilisation gréco-romaine a également excellé en terme de thérapie par les plantes, notamment grâce à Hippocrate (460-377 av. J. C.), surnommé le père de la médecine. Son *Corpus Hippocratum*, un ensemble de textes, mentionne près de 400 remèdes à base de plantes dont la nigelle. Discorde, préconisait l'usage des graines de la nigelle contre les maux de tête, les affections des yeux, les maux des dents et les morsures d'araignées. Galien conseille de les brûler pour tuer les moucheron et les moustiques et tragus les employait comme antihelminthiques (Chamseddine, 2006).

La popularité de la nigelle était raisonnée par la croyance idéologique de pouvoir guérir plusieurs maladies. En fait, cette plante a occupé une place spéciale pour son grand spectre d'application médicale dans la civilisation islamique, dû au hadîth du prophète Mohammed (salut et miséricorde soit sur lui): «*Soignez-vous en utilisant la graine de nigelle, c'est un remède contre tous les maux à l'exception de la mort*», ces paroles sont restées pour longtemps un mystère pour la science jusqu'à l'arrivée des techniques modernes qui ont réussi à prouver les vertus thérapeutiques des graines de cette plante miraculeuse (Talbi *et al*, 2015).

Abu Ali Al-Hussein Ibn Abdallah Ibn Sina, connu sous le nom d'Avicenne (980-1037), traite de la nigelle dans son ouvrage «le Livre de la guérison de l'âme» ou «*Kitab Al-Chifâ*». Il conseillait de griller les graines et de les réduire en poudre, puis de placer cette préparation dans une bourse en tissu et d'inhaler quotidiennement pour désobstruer les voies nasales, selon le même principe qu'un vaporisateur (Al-Nassimi, 1984). Les graines de la nigella

sativa, pulvérisées et utilisées en cataplasme avec du vinaigre, auraient une action résolutive dans les pustules et la gale surinfectée et auraient une action verrucide, si on ajoute du miel. Enfin, les médecins arabes connaissaient la toxicité de la nigella sativa à forte dose. De ce fait, ils recommandaient de ne pas dépasser une dose unitaire d'un demi-*Dirham* (1,62 g) et une dose journalière de deux *Dirhams* (6,48 g) (Ibn Al-Qaïm, 1957).

3.3. Description botanique du Nigelle

Nigella sativa (Renonculacée) est une plante annuelle herbacée, atteignant 30 à 60 cm de haut. Ses fleurs sont petites de 2,5 cm de diamètre avec pétales blanchâtres et sépales pétaloïdes et présentent de nombreuses étamines insérées sur le réceptacle (Ghedira, 2006; Ghedira et Le Jeune, 2010). Les feuilles, pennatiséquées, divisées en lobes étroits, sont lancéolées à linéaires et présentent des onglets nectarifères. Les feuilles inférieures sont petites et pétaloïdes et les supérieures sont longues. La plante est hermaphrodite à reproduction autonome, les fruits murs sont des capsules constituées de follicules soudés s'ouvrant par une fente interne, il contient de nombreuses graines qui sont blanches après la nouaison et prennent une couleur noir à maturité (Teuscher *et al*, 2005).

Les graines de *nigella sativa* sont ovoïdes de 2 à 3.5 mm qui présentent 3 à 4 ongles et la face supérieure est finement granuleuse et réticulée (Andreas et Oeggel, 2005; Ghedira, 2006) (figure 16). Le tableau 5 indique la classification botanique de la nigelle.



Figure 16: Aspect morphologique de la plante *nigella sativa* (Meziti, 2009)

Tableau 5: Classification botanique du Nigelle (Guignard, 2001).

Sous règne	Cormophyte
Supra embranchement	Rhizophyte
Embranchement	Spermaphyte
Sous embranchement	Angiosperme
Classe	Eudicotylédone
Sous classe	Audicots archaïques
Ordre	Renonculacées
Famille	Renonculacées
Sous famille	Helloboroidées
Genre	Nigella
Espèce	Nigella sativa

3.4. Composition chimique des graines de nigella sativa

Les travaux concernant la composition chimique des graines de la nigelle ont révélé la richesse de ces graines en plusieurs constituants tant de métabolites secondaires que primaires, dont la teneur varie selon les conditions géographiques et climatiques, ainsi que les méthodes d'extraction et de caractérisation pratiquées (Atta, 2003; Sultan *et al*, 2009). *Nigella sativa* contient des huiles essentielles, des acides gras, des phospholipides et plusieurs métabolites secondaires comme les alcaloïdes et les polyphénols. Elle contient plusieurs vitamines (A, B, B2, C et Niacine) et des sels minéraux (Ca, K, Fe, Zn, Mn et Se) (Salem, 2005). Le tableau 6 regroupe la composition biochimique de la graine de nigelle cultivée dans différents pays.

Tableau 6: Composition chimiques (%) des graines de Nigella sativa selon la région

Constituants	Nigella sativa (Tunisie)	Nigella sativa (Iran)	Nigella sativa (Egypte)	Nigella sativa (Turquie)
Protéines	26,70	22,60	20,80	14,10 - 26,40
Matière grasse	28,48	40,35	34,80	28,60 - 42,50
Humidité	8,65	4,08	7	06,40 - 09,40
Cendres	4,86	4,41	3,70	02,40 - 07,80
Carbohydrates	31,31	28,65	33,70	12,40 - 30,80
Fibres	-	-	-	04,60 - 11,90

Références	Cheikh-Rouhou <i>et al</i> , 2007	Cheikh-Rouhou <i>et al</i> , 2007	Atta, 2003	Aksoy <i>et al</i> , 2001
------------	--------------------------------------	--------------------------------------	------------	------------------------------

3.4.1. Les protéines

La graine de la nigella sativa est très riche en protéines (20 à 26 %). L'analyse des acides aminés de l'hydrolysate de ces protéines révèle la présence de 17 acides aminés, y compris 8 acides aminés essentiels. Quantitativement, les acides aminés constitutifs majoritaires sont non essentiels (69,81 %). L'acide glutamique est fortement présent (24,74 %) (Salem, 2005; El-Obeid *et al*, 2006) (Tableau 7).

Le fractionnement des protéines de nigella sativa par SDS-PAGE montre que des bandes de poids moléculaire allant de 10 à 94 KDa. La protéine la plus étudiée jusqu'à maintenant est la lipase qui catalyse les réactions de transestérification (Tuter *et al*, 2003; Meziti, 2009).

Tableau 7: Les acides aminés des protéines de Nigella sativa (Salem, 2005; El-Obeid *et al*, 2006).

Acides aminés	Teneur en pourcentage (%)
Acides aminés essentiels	30,19
Leucine	5,82
Valine	4,61
Lysine	4,04
Thréonine	3,65
Phénylalanine	3,61
Isoleucine	3,46
Histidine	3,35
Méthionine	1,65
Acides aminés non essentiels	69,81
Acide glutamique	24,74
Arginine	9,19
Acide aspartique	8,94
Glycine	5,61
Proline	4,90
Serine	4,31

Alanine	3,73
Tyrosine	3,59
Cystéine	1,96

3.4.2. L'huile

Les graines de nigella sativa renferment environ 0,4-2,5 % d'huile essentielle, plus de 30 % d'huiles fixes et 38 % de lipides totaux dont les phospholipides (Martin *et al*, 2001).

✚ **L'huile fixe:** l'huile fixe représente 37,9 - 39,2 % du poids de la graine. Elle est constituée principalement de lipides neutres 96,1 - 97,2 %, de lipides polaires 3 %, et de phospholipides 0,32 - 1,05 % (Ramadan et Mörsel, 2002). L'analyse des phospholipides par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a permis d'identifier principalement sept constituants qui sont regroupés dans le tableau 8.

Tableau 8: Les principaux phospholipides d'huile fixe de nigella sativa (Ramadan et Mörsel, 2002).

Constituants phospholipidiques	Teneurs en pourcentage (%)
phosphatidyl choline	46
Phosphatidyl ethanolamine	25
Phosphatidyl serine	12
phosphatidyl inositol	9,56
lysophosphatidyl choline	4,23
Phosphatidyl glycerol	1,51
Lysophosphatidyl ethanolamine	1,2

Une étude complémentaire sur les glycolipides de nigella sativa a permis de séparer et d'identifier six composés dont le plus abondant est le digalactosyl diacyl glycérol qui forme 55,6 % des glycolipides totaux (Ramadan et Mörsel, 2003). L'analyse phytochimiques de montre que le principal acide gras insaturé est l'acide linoléique suivi par l'acide oléique, alors que l'acide gras saturé majoritaire est l'acide palmitique. La présence d'autres acides gras; myristoleique, palmitoleique, margarique, arachidique, eicosenoique, behénique, lignocérique à été également détectée (Nickavar *et al*, 2003; Cheikh-Rouhou *et al*, 2007) (tableau 9).

Tableau 9: Composition des huiles fixes de nigella sativa Tunisienne (Cheikh-Rouhou *et al*, 2007), Iranienne (Nickavar *et al*, 2003; Cheikh-Rouhou *et al*, 2007) Egyptienne (Atta, 2003).

Acides gras (%)	Nigella sativa (Tunisie)	Nigella sativa (Iran)	Nigella sativa (Égypt)
AG saturés	22,70	17 – 25,5	24
Acide myristique	0,35	0,40 – 0,50	9,80
Acide palmitique	17,20	12,50 – 18,40	9,90
Acide stéarique	2,84	3,40 – 3,70	3,30
Autres	2,12	2,80	1
AG insaturés	77,30	74,8 – 82,5	73,50
Acide oléique	25	23,40 – 23,70	20,1
Acide linoléique	50,31	19,15 – 55,60	49
Autres	1,81	3,20	4,40

🌈 **L'huile essentielle:** l'huile essentielle représente entre 1,4-1,9 % du poids de l'huile fixe et 0,18 à 0,50 % du poids des graines (Benkaci *et al*, 2007). L'analyse de cette huile par GC-MS réalisée par Burits et Bucar (2000) a permis d'identifier 32 composants, dont la majorité d'entre eux sont des mono terpènes (tableau 10).

Tableau 10: Les composés de mono terpènes d'huile essentielle de nigella sativa (Burits et Bucar, 2000).

Composants de monoterpènes	Teneurs en pourcentage (%)
Thymoquinone	27,8 – 57
p-Cymène	7,07 - 15,83
Carvacrol	5,8 - 11,6
Longifolène	1,2 – 8
4-terpinol	1,98 - 6,59
t-Anethol	0,25 - 4,28

Contrairement à l'étude précédente, Moretti *et al* (2004) ont trouvé que le composant majeur est le p-cymene suivi du thymol alors que la thymoquinone présente un taux faible. Récemment, l'huile essentielle de nigella sativa cultivée au Sahara algérien (Timimoune et Adrar), extraite par deux méthodes différentes; l'hydrodistillation et distillation par micro-

onde a été analysée par CPG et CPG-SM (Chromatographie en phase gazeuse – Spectroscopie de Masse), 112 composés ont été identifiés et caractérisés, le p-cymène représente toujours le composé le plus abondant suivi de la thymoquinone (Benkaci *et al*, 2007).

3.4.3. Les Alcaloïdes

Plusieurs alcaloïdes ont été isolés à partir des graines de nigelle sativa. Les plus importants sont la nigelline, nigellicine, nigellidines, nigellimine, isoquinoline, indazole et N-oxy nigellimine (Gilani *et al*, 2004; Ghedira, 2006) et les alcaloïdes diterpènes dollablane-types nigellamines A1, A2, B1, B2 (Morikawa *et al*, 2004a), A3, A4, A5, et C (Morikawa *et al*, 2004b) (figure 17).

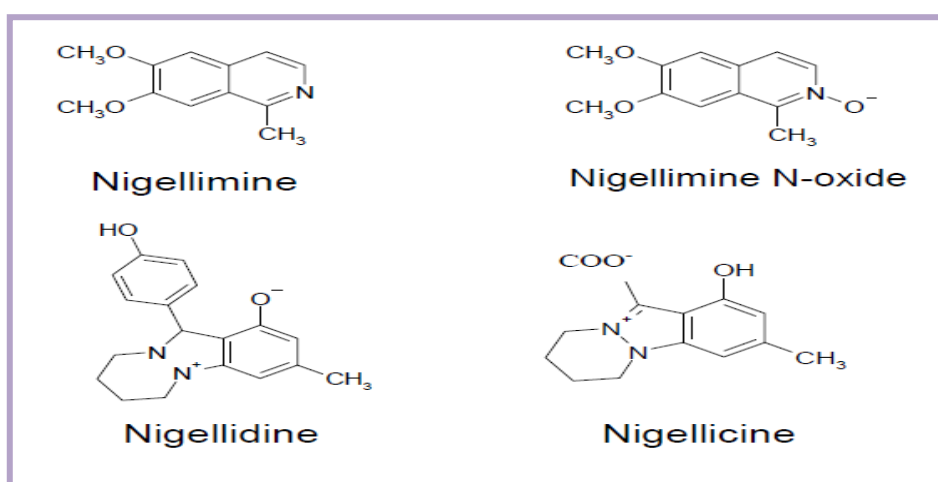


Figure 17: Structure chimique des principaux alcaloïdes de *N. sativa* (Ghedira, 2006).

3.4.4. Les Polyphénols et flavonoïdes

Les polyphénols de nigella sativa sont les plus actifs pharmacologiquement. A partir de l'huile, 4 constituants ont été isolés et identifiés structurellement par HPLC et RMN; la thymoquinone, le dithymoquinone, le thymohydroquinone et le thymol (Gilani *et al*, 2004; Ghedira, 2006). Des composés phénoliques de type flavonol-triglycosides ont été aussi identifiés dans les huiles des graines de NS (Merfort *et al*, 1997) et qui sont:

- ✓ quercétine 3-glycosyl (1→2) galactosyl (1→2) glucoside.
- ✓ kœmpférol 3-glycosyl (1→2) galactosyl (1→2) glucoside.
- ✓ quercétine 3-(6-feruloglucosyl) (1→2) galactosyl (1→2) glucoside

3.4.5. Les vitamines et les sels minéraux

La composition en vitamines a été déterminée et révèle la présence des vitamines B1, B2, B6 et de l'acide folique (Nergiz et Ötles, 2003). Ramadan et Mörsel (2002) ont analysé les vitamines liposolubles des graines de nigella sativa et ont pu identifier toutes les classes des tocophérols dans l'huile. Les tocophérols totaux constituent 0,05 % de l'huile, et sont constitués majoritairement de l' α -tocophérol (48 %) et du γ -tocophérol (28 %). Ces mêmes chercheurs ont pu également identifier d'autres vitamines liposolubles; la β -carotène (0,05 %) et la vitamine K1 (0,1 %). Dans une étude ultérieure, l'analyse par HPLC démontre que les teneurs en α et γ -tocophérols sont relativement élevées: de 5,65 à 11,39 mg/kg et de 2,26 à 6,95 mg/kg respectivement (Al-Saleh *et al*, 2006).

Des travaux sur la composition minérale de la graine de nigella sativa ont rapporté que sa teneur en potassium est importante (1,18 % de poids total de la graine) et que la teneur des autres éléments est variable par exemple: le calcium (0,188 %), le fer (0,0575 %), le sodium (0,0853 %) (Nergiz et Ötles, 2003). En revanche, la teneur des graines en sélénium a été également déterminée, et représente 0,13 à 0,20 mg/kg des graines (Al-Saleh *et al*, 2006).

3.5. Utilisation de Nigella sativa

3.5.1. Façons de consommation de la nigelle

Les graines de la nigelle entières ou moulues sont utilisées comme épice. Elles servent à saupoudrer le pain et les pâtisseries, les plats sucrés, les fromages et les sauces pour les rendre plus appétissants. Elles sont également utilisées en accompagnement des graines de sésame dans la cuisine traditionnelle d'Asie, et sont ajoutées à différents plats selon les envies. Les Orientaux et les Egyptiens en font une grande consommation, car ils pensent qu'en plus de son effet carminatif et diurétique, la graine de nigelle renforce le système immunitaire et stimule la lactation. Ils l'utilisent aussi à des fins alimentaires pour assaisonner les fruits et les légumes (Atta, 2003). En Algérie, le pain et les produits boulangers sont aromatisés avec la nigelle et au sud, principalement dans la région d'Adrar, elle constitue l'épice principale dans la préparation des soupes (Mokkedem, 2004).

3.5.2. La nigelle dans la médecine traditionnelle

Les graines de la nigelle ont été utilisées pour promouvoir la santé et combattre la maladie pendant des siècles, Cette plante a été un grand centre de recherche et a plusieurs utilisations

traditionnelles et par conséquent a été largement étudié pour ses constituants chimiques et les activités biologiques (Najmi *et al*, 2008). Les extraits de plantes de nigella sativa ont été couramment utilisés dans divers systèmes traditionnels de médecine comme Ayurveda, Siddha, Unani, Arabe, Islamique, etc. (Majdalawieh et Fayyad, 2015).

Dans la médecine Ayurvédique, le kalonji est utilisé en cas d'indigestion, de douleurs menstruelles, d'inflammation bronchique et comme anthelminthique. En médecine Unani, la graine de nigelle est considérée comme abortive et diurétique, elle est utilisée pour les ascites, la toux, la douleur oculaire, l'ictère, la paralysie, les hémorroïdes et la fièvre tierce. Ainsi en Malaisie, des cataplasmes de graines sont utilisés pour les maux de tête, les abcès, les ulcères nasaux, l'orchite et le rhumatisme. Les femmes Arabes utilisent la graine de la nigelle comme galactogène (Aggarwal et Kunnumakkara, 2009). Elle est traditionnellement utilisé pour le traitement de beaucoup de maladies dû à ses activités antivirales, anti-inflammatoire, antidiabétique, immuno-modulatrices, anticancéreuse, et des activités hepatoprotective (Khan *et al*, 2011; Ahmad *et al*, 2013). De plus, l'huile de graines de nigella sativa atténue les effets secondaires toxiques de plusieurs agents chimio-thérapeutiques (Uz *et al*, 2008). La figure 18 illustre les principaux usages de nigella sativa dans la médecine traditionnelle.

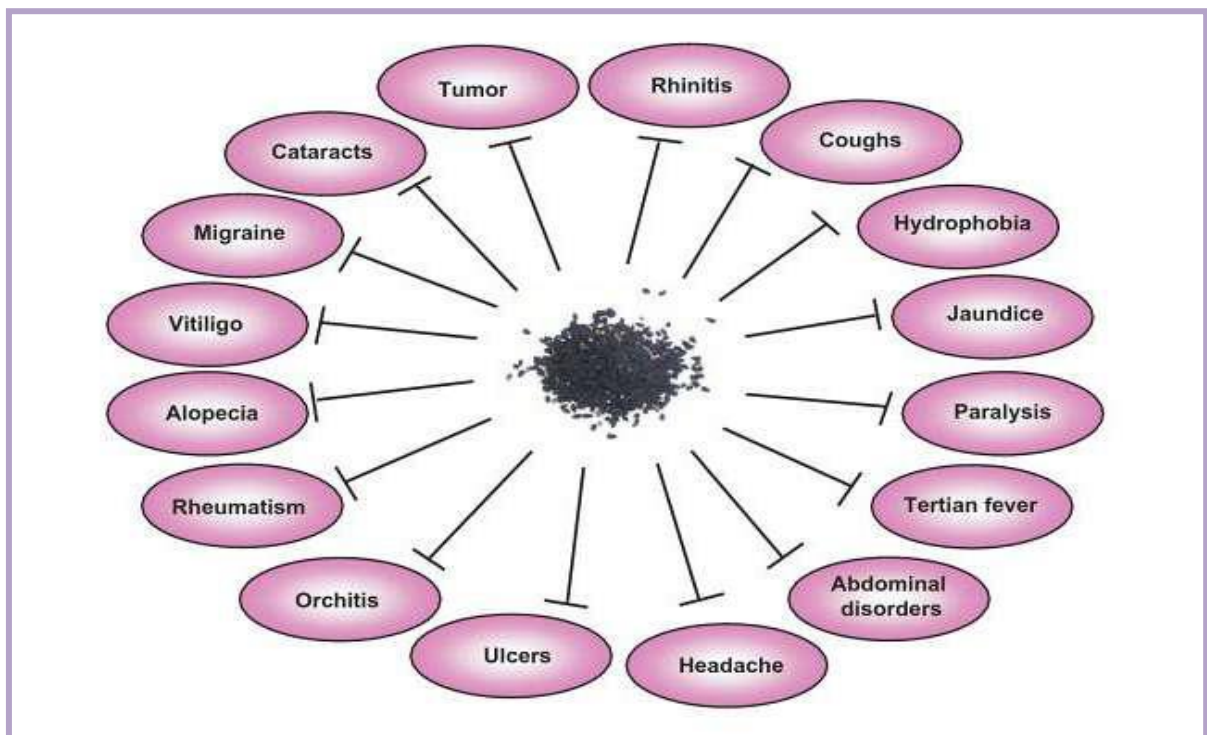


Figure 18: Usages traditionnels de nigella sativa (Aggarwal et Kunnumakkara, 2009).

3.6. Les propriétés pharmacologiques de la nigelle

Durant les vingt dernières années, plusieurs travaux ont porté sur l'étude de nigella sativa, notamment sur les effets dus aux extraits de la graine de cette espèce ainsi qu'aux principaux constituants (particulièrement la thymoquinone) sur divers systèmes biologiques (*in vivo* et *in vitro*) (Ghedira et Le Jeune, 2010).

3.6.1. Activité antioxydante de la nigelle

✚ **Activité antioxydante de la nigelle *in vitro*** : l'huile fixe de nigella sativa ainsi que la thymoquinone (TQ) (composé majoritaire dans l'huile essentielle) inhibe la peroxydation lipidique non enzymatique (auto-oxydation) dans les liposomes. La TQ, le carvacrol, le trans-anéthole et le 4-terpinéol exercent un important effet piègeur de radicaux libres (Burits et Bucar, 2000). Ces mêmes constituants sont responsables de propriétés antioxydantes variables sans présenter d'effet prooxydant (Swamy et Huat, 2003; Ilhan *et al*, 2005). L'huile fixe et ses fractions (lipides neutres, glycolipides et phospholipide) montrent une activité antioxydante vis-à-vis des deux radicaux libres stables (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl et le radical glavinoxyl). Cette activité antioxydante est corrélée avec la teneur en acides gras polyinsaturés, en composés insaponifiables et en phospholipides, de même que la valeur peroxyde initiale de l'huile (Ramadan et Morsel, 2003).

Le thymol, la thymoquinone et la dithymoquinone, constituants de Nigella sativa, ont un rôle de neutralisant des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Leur activité anti-radicalaire, vis-à-vis de l'anion superoxyde, du radical hydroxyle, ou encore de l'oxygène singulet, a été déterminée par chimioluminescence et spectrophotométrie (Kruk *et al*, 2000). Une autre étude phytochimique et biochimique, montre l'activité anti-radicalaire de la TQ sur des leucocytes polymorphonucléaires (Nagi et Mansour, 2000).

Une étude de comparaison de l'action de sept plantes médicinales, dont la nigelle, sur la déformation des érythrocytes, leur fragilité osmotique à 37 °C pendant 60 minutes dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 10 mM, leur dégradation protéique et peroxydation lipidique, a mis en évidence une action protectrice de la nigelle sur la dégradation érythrocytaire suite au stress oxydatif. La nigella sativa a une activité antioxydante, anti-radicalaire, peut donc être bénéfique dans les pathologies rhéologiques (Suboh *et al*, 2004).

✚ **Activité antioxydante de la nigelle *in vivo*** : l'administration de l'huile de nigella sativa et de la TQ chez des rats protège contre l'hyper-homocystéinémie induite par la méthionine en bloquant l'accumulation de l'homocystéine, l'une des causes de l'état du stress oxydant, conduisant à la protection contre la peroxydation lipidique et les changements du statut oxydatif (Ilhan *et al*, 2005). Par ailleurs, le traitement de rats soumis à un régime alimentaire contaminé par l'aflatoxine, avec l'huile de la nigelle, entraîne une protection importante contre l'hépatonephrotoxicité et les altérations oxydatives (réduction des taux de la GSH-Px, de la SOD, augmentation de la peroxydation lipidique et des altérations de l'ADN) induites durant l'aflatoxicose. Cet effet protecteur de l'huile de la nigelle est probablement attribué à leur effet piègeur de radicaux libres (Abdel-Wahhab et Aly, 2005). Une néphrotoxicité, une cardiotoxicité et un stress oxydant, induits par la doxorubicine chez des rats, ont été traités par la TQ; elle a ralenti l'hyperlipidémie néphrotique et la protéinurie et a induit les bio-marqueurs agissant contre le stress oxydatif (Badary et al, 2000).

3.6.2. Activité anti-inflammatoire de la nigelle

L'activité anti inflammatoire de la nigelle a été également étudiée. En effet l'administration de l'huile fixe et la thymoquinone par voie intra-péritonéale chez les rats et les souris respectivement avant le traitement par l'ovalbumine par voie nasale pour induire une allergie pulmonaire, inhibe de façon significative la réaction inflammatoire via l'inhibition de la production des cytokines et l'infiltration des cellules pro-inflammatoires vers le tissu pulmonaire (El Gazzar *et al*, 2006; Shahzad *et al*, 2009). D'autre part l'étude de Mansour et Tornhamre (2004) a établi que la TQ est capable d'inhiber le 5-lipoxygénase, et le leucotriène C4 synthase, des enzymes responsables de la synthèse des médiateurs pro-inflammatoires. Par ailleurs, Les polyphénols de la graine exercent un effet anti-inflammatoire via l'inhibition de l'œdème des pâtes induit par le carageenan chez les rats (Ghannadi *et al*, 2005). En 2007, El Gazzar et ses collaborateurs, ont rapportés que la TQ empêche la production de cytokines pro-inflammatoires induit par lipopolysaccharide (LPS) en bloquant l'expression de facteur de transcription de GATA et l'attache d'instigateur. Le composé empêche la production d'IL-5 (Interleukine) induit par LPS et l'expression de l'ARNm de l'IL-13 et la traduction.

3.6.3. Activité antimicrobienne de la nigelle

Les différents extraits des graines de nigella sativa présentent un large spectre d'inhibition vis-à-vis de nombreuses souches bactériennes. L'huile essentielle même diluée à 1 %, la

dithymoquinone ainsi que l'extrait méthanolique exercent une importante activité antimicrobienne sur des germes Gram positif et Gram négatif (Aljabre *et al*, 2005). L'huile de la nigelle possède également un pouvoir inhibiteur supérieur à celui de la gentamicine sur une vingtaine de souches de *L. monocytogenes* (Nair *et al*, 2005). L'activité antibactérienne de nigella sativa a été montrée contre plusieurs souches bactériennes telles que; *E. coli*, *B. subtilis*, *St. faecalis*, *S. aureus* et *P. aeruginosa* (Morsi, 2000; Khan *et al*, 2003).

Les différents extraits des graines de la nigelle (aqueux, de méthanol et de chloroforme) présentent un large spectre d'inhibition vis-à-vis de nombreuses souches bactériennes (Vahdati-Mashhadian et Rakhshandeh, 2005a). Bourgou et collaborateurs (2009) démontrent que l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle obtenue à partir des graines de la nigelle tunisiennes a été étudiée contre *S. aureus* (G+) et *E. coli* (G-). L'évaluation des activités des composés volatils présentés dans l'huile a suggéré que la TQ et le longifolène aient été en grande partie responsables de l'activité d'huile contre *St. aureus*, alors que la TQ possède une bonne activité contre *E. coli*.

3.6.4. Activité anticancéreuse de la nigelle

L'activité anti-tumorale des extraits ou de composés isolés de nigella sativa a été testée par plusieurs auteurs. L'extrait méthanolique brut préparé à partir des graines de nigella sativa présente une importante action cytotoxique sur le carcinome ascitique d'Ehrlich et sur le lymphome ascitique de Dalton tout en exerçant une cytotoxicité minimale vis-à-vis des lymphocytes normaux (Musa *et al*, 2004; Ghedira, 2006). L'extrait décocté des graines de nigella sativa exerce une forte activité cytotoxique sur les cellules hépatiques cancéreuses, notamment sur la synthèse d'ADN (Thabrew *et al*, 2005).

Les graines de nigella sativa ou ses constituants présentent une action préventive des cancers et/ou réductrice de la cytotoxicité des médicaments antinéoplasiques usuels. En effet, la thymoquinone exerce *in vitro* et *in vivo* un effet inhibiteur de la carcinogenèse de l'estomac et du fibrosarcome induit par 20-méthyl cholanthrène chez la souris (Badary et Gamal, 2001).

Par ailleurs, l' α -hédérine et la TQ exercent d'importantes propriétés anti tumorales vis-à-vis le carcinome de poumon, carcinome épidermoïde de larynx, adénocarcinome de colon et le Carcinome de pancréas, d'une manière dose et temps dépendante (Rooney et Ryan, 2005a).

3.6.5. Activité antidiabétique de la nigelle

Plusieurs études ont adressé les propriétés antidiabétiques de la nigelle (Haddad *et al*, 2006). Les effets des graines de nigella sativa sur certaines complications du diabète expérimental induit chez le lapin ont fait l'objet de nombreux travaux (Meral *et al*, 2001). Al-Hader *et al* (1993) rapportent que l'huile essentielle de la graine administrée par voie intra péritonéale (à raison de 50 mg/kg) abaisse de façon significative (de 15 à 23 %) la glycémie à jeun chez les animaux normo- et hyper glycémiques. L'insulinémie n'ayant pas été affectée par les traitements, l'effet hypoglycémiant observé se manifeste selon un mécanisme, non encore identifié, n'impliquant pas l'insuline (Hawsawi *et al*, 2001; El-Dakhakhny *et al*, 2002). La thymoquinone exerce aussi un effet antidiabétique via l'inhibition de la synthèse de monoxyde d'azote chez les rats rendus diabétique par le streptozotocine qui provoque la dégénération et la nécrose des cellules β du pancréas (El-Mahmoudy *et al*, 2005), et elle inhibe la gluconéogenèse hépatique qui participe aussi dans l'hyperglycémie chez les diabétiques (Fararh *et al*, 2005). D'autre part l'extrait aqueux de la graine exerce un effet antidiabétique via l'inhibition de l'absorption intestinale du glucose (Meddah *et al*, 2009).

3.7. Effet indésirable de la nigelle

La toxicité de la nigelle est bien connue par la plupart des herboristes. En effet, son utilisation est seulement à faible dose, que ce soit par la voie interne, externe, en fumigation ou en inhalation. Un surdosage des graines de nigella sativa peut être mortel (Zaghlol *et al*, 2012). D'après Meziti (2009) le surdosage thérapeutique peut provoquer des avortements. Cette toxicité, comme celles de la plupart des espèces de la famille des renonculacées, est due essentiellement à la présence de forte quantité de saponines et d'alcaloïdes dans les graines de nigelle. La toxicité potentielle de l'huile végétale des graines de nigella sativa a été recherchée chez des souris et des rats par la détermination des valeurs de la DL₅₀ et par l'examen de possibles changements biochimiques, hématologiques et histologiques. Une étude utilisant différents extraits (aqueux, méthanoliques, chloroformiques) des graines de la nigelle à différentes concentrations (7, 14 et 21 g/kg/j) a été entreprise. A tous ces dosages et dans tous les différents groupes étudiés, aucune mortalité n'est observée à 3^{ème} jour et 7^{ème} jour. Le poids des animaux est légèrement diminué. Des changements dégénératifs au niveau des cellules hépatiques sont par contre observés uniquement avec l'extrait aqueux à la dose de 6 g/kg/j (Vahdati-Mashhadian *et al*, 2005b).

En 2008, une réévaluation des DL₅₀ de la thymoquinone a été réalisée sur des souris et des rats. Chez la souris, la DL₅₀ de TQ après administration par voie intra-péritonéale a été de 104 mg/kg et de 870 mg/kg de poids corporel par voie orale. Les valeurs ont été de 57 mg/kg et 794 mg/kg chez le rat après injection intra-péritonéale et administration par voie orale respectivement. Les valeurs des DL₅₀ obtenues après injection intra-péritonéale et administration *per os* sont respectivement 10 à 15 fois et 100 à 150 fois supérieures aux doses de thymoquinone nécessaires pour obtenir un effet anti-inflammatoire, antioxydant ou anticancéreux (Al-Ali *et al*, 2008).

L'administration orale de poudre de graines de la nigelle chez des rats à faible dose (0,01 g/kg/j), à dose moyenne (0,1 g/kg/j) et à dose élevée (1 g/kg/j) pendant 28 jours a servi pour déterminer les effets toxiques de la plante sur la fonction hépatique. Les résultats ne révèlent pas de changements significatifs des activités des transaminases (ALAT, ASAT). Par ailleurs, les observations histopathologiques ne font apparaître que des changements très minimes de la stéatose hépatique pour les groupes traités à doses moyennes. Ils sont par contre significatifs avec les doses élevées. Aucun signe inflammatoire n'a été décelé quelle que soit la dose. Cette étude montre que l'administration de la nigelle jusqu'à la dose de 1 g/kg n'induit pas de toxicité hépatique (Dollah *et al*, 2013).

Suite à l'administration chronique sur 6 semaines d'extraits aqueux de nigella sativa, une étude histologique d'échantillons de reins, de pancréas et de foie montrent que ces tissus sont normaux et sains. Il est rapporté que le traitement de 344 rats par l'huile végétale de la nigelle durant 14 semaines est sans incidence du point de vue pathologique sur le foie, les reins, la rate et d'autres organes. Il en est de même au niveau des paramètres biochimiques sanguins et urinaires, ainsi que sur la prise de poids (Meddah *et al*, 2009).

Une étude publiée en 2012 a confirmé l'effet toxique de l'huile végétale de la nigelle des doses journalières de 15 et 25 ml/kg de poids corporel ont été administrées à des rats par voie orale durant un mois. Des modifications au niveau des structures histologiques du cortex rénal et à un moindre degré au niveau de leurs cellules hépatiques ont été rapportées (Zaghlol *et al*, 2012).

Chapitre 4 :
Matériels et méthodes

4. Matériel et méthodes

4.1. Produit chimique

Le chlorure de cadmium pur (Fluka Macédoine) a été dissous dans de l'eau minérale, le volume de chaque dose donnée a été ajusté afin d'obtenir une dose de 5 mg/kg de poids corporel de rat.

4.2. Matériel biologique

4.2.1. Préparation de la poudre de la nigelle

Les graines de la nigelle (*Nigella sativa*) ont été achetées au marché local, lavées, séchées à l'air et broyées avec un mélangeur en une poudre fine. Cette poudre a été conservée dans des récipients étanches à l'air et à température ambiante jusqu'à la formulation des régimes expérimentaux. La poudre de nigelle diététique a été donnée aux rats à raison de 5 %.

4.2.2. Elevage des rats

Nous avons utilisé quarante rats (*Albinos wistar*) provenant de l'institut Pasteur d'Alger, âgés de huit semaines avec un poids de 200 ± 20 g. Les animaux sont élevés au sein de l'animalerie de l'Université Badji Mokhtar Annaba. Ils ont été soumis à une période d'adaptation aux nouvelles conditions de l'animalerie, à une température de $(21 \pm 3 \text{ C}^\circ)$, une photopériode de 12 h/12 h. Les rats sont logés dans des cages en polyéthylène, tapissés d'une litière composée de copeaux de bois. Les cages ont été nettoyées et la litière changée une fois tous les deux jours. Les animaux ont été nourris par un régime alimentaire préparé selon Upreti *et al* (1989) (tableau 11). L'eau de boisson est servie dans des biberons *ad libitum*, et renouvelée quotidiennement.

Tableau 11: Composition du régime alimentaire pour un 1 kg d'aliment (Upreti *et al*, 1989)

Matière primaire	Pourcentage (%)	Quantité en g/kg
Amidon (maïs)	42	420
Saccharose	20	200
Soja	26	260
Composant Minéro-Vitaminique (CMV)	2	20
Huile	8	80
Son	2	20

4.2.3. Traitement des rats

Après une période d'un mois d'adaptation, les rats ont été répartis au hasard en quatre groupes de dix rats chacun, et traités quotidiennement pendant 30 jours par gavage à l'aide d'une sonde gastrique. Le protocole de traitement est expliqué comme suit:

- ✚ **Groupe 1 (0-0):** a servi de témoin et a reçu un régime alimentaire normal et de l'eau minérale par gavage (*per os*).
- ✚ **Groupe 2 (0-N):** est nourri par un régime alimentaire expérimental contenant 5 % de nigelle et de l'eau minérale.
- ✚ **Groupe 3 (Cd-0):** a reçu une dose orale (*per os*) de chlorure de cadmium (5 mg/kg) associée à un régime alimentaire normal.
- ✚ **Groupe 4 (Cd-N):** a reçu une dose orale (*per os*) de chlorure de cadmium (5 mg/kg) associée à un régime expérimental contenant 5 % de nigelle.

4.2.4. Sacrifice et prélèvements des échantillons

4.2.4.1. Sacrifices des animaux

À la fin de la période du traitement, les rats sont mis à jeun pendant la nuit. Ils sont sacrifiés le matin par décapitation. Pour chaque rat, la glycémie a été mesurée sur place par un glucomètre (Accu-check active) et le sang est immédiatement recueilli dans deux tubes étiquetés, l'un sec et l'autre contient l'EDTA comme anticoagulant:

- ✚ Les tubes à EDTA serviront pour la détermination de la formule de numération sanguine (FNS).
- ✚ Les tubes secs sont centrifugés à 3000 tours/minute pendant 15 minutes, les sérums récupérés serviront à la détermination des paramètres biochimiques (glycémie, acide urique, urée, créatinine, cholestérol, triglycéride, phosphatase alcaline, transaminase TGO/TGP, lactate déshydrogénase).

4.2.4.2. Prélèvement de certains organes

Après la dissection, le foie, les reins, les testicules, le cœur, la rate, la glande surrénale et une partie des intestins ont été prélevés et débarrassés de leurs tissus adipeux puis pesés. Un fragment de foie et de rein de chaque lots sont fixés séparément dans le Bouin alcoolique afin de réaliser des coupes histologiques, Une partie de ces organes ont été stockés au congélateur

à - 20 °C pour le dosage des paramètres de stress oxydant (GSH, MDA, GSH-Px, GSH-ST, CAT). La figure 19 résume les différentes étapes du protocole expérimental.

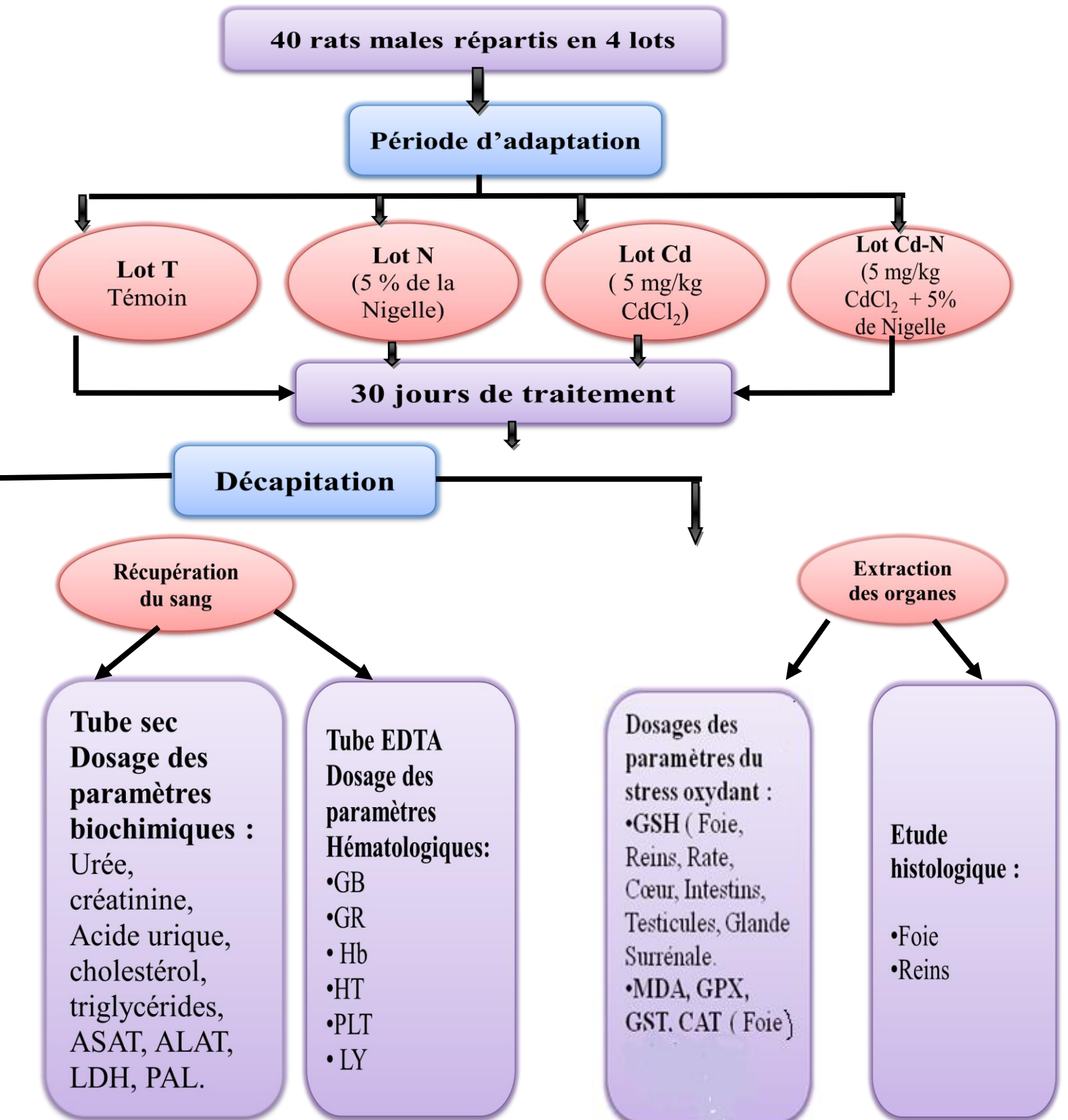


Figure 19: Schéma récapitulatif du protocole expérimental

4.3. Méthodes de dosage

4.3.1. Mesure de la glycémie

✚ **Principe:** le dosage du glucose sanguin a été effectué par un glucomètre qui utilise des bandelettes réactives. Ces dernières sont destinées à un usage diagnostique in vitro pour le test de la glycémie. Elles sont conçues pour mesurer le glucose dans le sang total capillaire. La bandelette réactive contient de la glucose-oxydase, une enzyme qui oxyde le glucose dans le sang et qui produit de l'acide D-gluconique et du peroxyde d'hydrogène.

✚ **Mode opératoire:** le lecteur se met en marche automatiquement par simple insertion de la bandelette réactive Accu-Chek (dans le sens des flèches et jusqu'à la butée).

- ✓ Le symbole d'une goutte clignote.
- ✓ Déposer la goutte de sang sur la zone de dépôt orange de la bandelette.
- ✓ La mesure est terminée au bout de 5 secondes environ, et le résultat apparaît à l'écran. La glycémie est donnée en g/L.

4.3.2. Dosage des paramètres hématologiques (FNS)

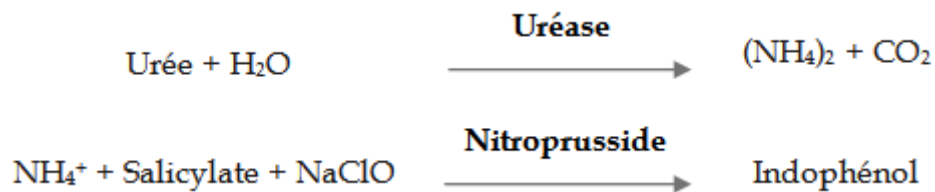
La mesure de la formule de numération sanguine (FNS) a été effectuée en utilisant un automate d'hématologie (ERMA INC). Le tube à EDTA contenant le sang est placé dans l'automate, et la mesure de la FNS commence. Au bout de 2 minutes les résultats s'affichent sur l'écran, et en suite on les imprime. Les paramètres hématologiques mesurés sont: les globules rouges (GR), les globules blancs (GB), l'hémoglobine (Hb), l'hématocrite (HT), les plaquettes (PLT) et les lymphocytes (LY).

4.3.3. Dosage des paramètres biochimiques

Les paramètres biochimiques mesurés sont: l'urée, la créatinine, l'acide urique, le cholestérol, les triglycérides, aspartate aminotransférase (ASAT), alanine aminotransférase (ALAT), lactate déshydrogénase (LDH), phosphatase alcaline (PAL).

4.3.3.1. Dosage de l'urée: le dosage de l'urée a été réalisé par la méthode enzymatique colorimétrique selon la fiche technique du Kit pré-utilisé (Spinréact - Espagne).

- ✚ **Principe:** l'uréase hydrolyse l'urée en ammonium (NH_4^+) et dioxyde de carbone (CO_2). Les ions ammonium formés réagissent avec le salicylate et l'hypochlorite en présence du nitroprussiate, pour former un indophénol vert selon les réactions ci-dessous:



L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration de l'urée dans l'échantillon (Kaplan, 1984).

✚ Réactifs

Réactif 1: Tampon	Phosphate pH 6,7	50 mM/l
	EDTA	2 mM/l
	Salicylate de sodium	400 mM/l
	Nitroprussiate de sodium	10 mM/l
Réactif 2: NaClO	Hypochlorite de sodium (NaClO)	140 mM/l
	Hydroxyde de sodium	150mM/l
Réactif 3: Enzymes	Uréase	3000 U/l
Urée calibrateur	Urée aqueuse (standard)	50 mg/dl

- ✚ **Réactif de travail:** dissoudre un comprimé de R3 dans un flacon de R1 et mélanger légèrement.

✚ Mode opératoire :

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1,0	1,0	1,0
Etalon (µL)	-	10	-
Echantillon (µL)	-	-	10

Mélanger et incuber 10 min à température ambiante (15-25°C).

	Blanc	Etalon	Echantillon
R2 (ml)	1,0	1,0	1,0

Mélanger et incuber 10 min à température ambiante (15-25°C). Lire l'absorbance (A) des échantillons et de l'étalon, contre le blanc à 580 nm. La couleur est stable pendant 30 minutes à 15°-25°C.

- ✚ **Calcul de la concentration:** la concentration de l'urée est calculée par la formule suivante:

$$\text{Concentration de l'urée (mg/dl)} = \frac{(A) \text{ échantillon}}{(A) \text{ standard}} \times 50 \text{ (standard conc.)}$$

4.3.3.2. Dosage de la créatinine: le dosage de la créatinine a été réalisé par la méthode cinétique colorimétrique selon la fiche technique du Kit pré-utilisé (Spinréact - Espagne).

- ✚ **Principe:** l'essai est basé sur la réaction de la créatinine avec le picrate de sodium comme décrit par Jaffé. La créatinine réagit avec le picrate alcalin formant un complexe rouge. L'intervalle de temps est choisi pour les mesures de telle sorte qu'il évite des interférences avec d'autres constituants de sérum. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration en créatinine dans l'échantillon (Murray, 1984a).

✚ Réactifs

Réactif 1: Réactif picrique	Acide picrique	17,5 mM/l
Réactif 2: Réactif alcalin	Hydroxyde de sodium	0,29 mM/l
Créatinine calibrateur	Créatinine aqueuse (standard)	2 mg/dl

- ✚ **Réactif de travail:** mélanger un volume de réactif 1 avec un volume de réactif 2. Le réactif du travail est stable pendant 10 jours à 15-25°C.

Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1,0	1,0	1,0
Etalon (µL)	-	100	-
Echantillon (µL)	-	-	100

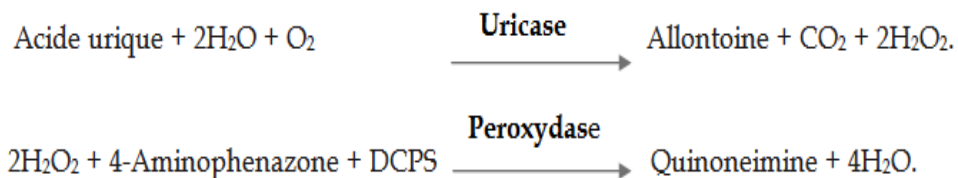
Mélanger, déclencher le chronomètre. Lire à 492 nm la densité optique (A1) après 30 secondes et la densité optique (A2) après 90 secondes.

Calcul de la concentration: la concentration de la créatinine est calculée par la formule suivante: $(\Delta A) \text{ Echantillon} - (\Delta A)$

$$\text{Concentration de la créatinine (mg/dl)} = \frac{\Delta A \text{ échantillon} - \Delta A \text{ blanc}}{\Delta A \text{ standard} - \Delta A \text{ blanc}} \times 2$$

4.3.3.3. Dosage de l'acide urique : le dosage de l'acide urique a été réalisé par la méthode enzymatique colorimétrique selon la fiche technique du Kit pré-utilisé (Spinréact - Espagne).

Principe: l'acide urique est oxydé par l'uricase en allantoiné et peroxyde d'hydrogène ($2 \text{H}_2\text{O}_2$) qui, sous l'influence de la peroxydase, du 4-aminophénazone (4-AP), et du 2-4 dichlorophénol-sulfonate (DCPS), forme un composé rouge de quinonéimine donné par les réactions suivantes:



L'intensité de la coloration rouge formée est proportionnelle à la concentration de l'acide urique dans l'échantillon (Schultz, 1984).

✚ Réactifs :

Réactif 1: Tampon	Phosphate pH 7,4	50 mM/l
	2-4 dichlorophénol sulfonate (DCPS)	4 mM/l
Réactif 2: Enzymes	Uricase	60 U/l
	Peroxydase (POD)	660 U/l
	Ascorbate oxydase	200 U/l
	4-Aminophénazone (4-AP)	1 mM/l
Acide urique calibrateur	Acide urique aqueux (standard)	6 mg/dl

✚ **Réactif de travail:** dissoudre le contenu d'une bouteille de R2 dans un flacon de R1. Mélanger légèrement. La couleur est stable pendant 30 minutes.

✚ Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1,0	1,0	1,0
Etalon (µL)	-	25	-
Echantillon (µL)	-	-	25

Mélanger et incuber 10 min à 15-25°C. Lire l'absorbance (A) des échantillons et de l'étalon, contre le blanc à 520 nm.

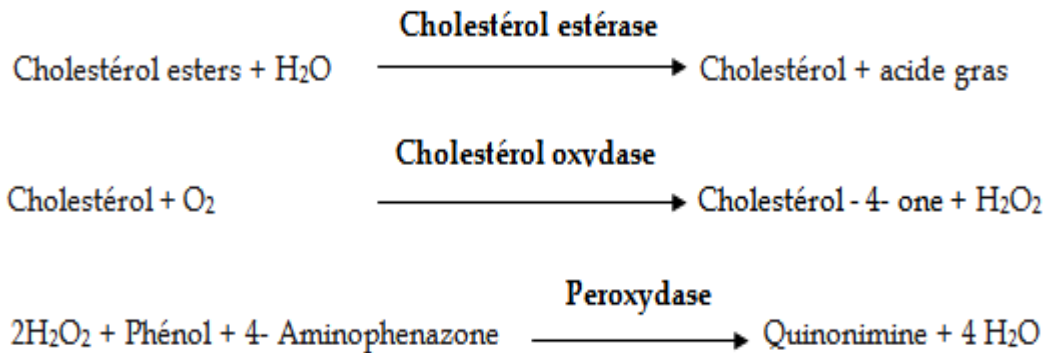
✚ **Calcul de la concentration:** la concentration de l'acide urique est calculée par la formule suivante:

$$\text{Concentration de l'acide urique (mg/dl)} = \frac{(A) \text{ échantillon}}{(A) \text{ standard}} \times 6 \text{ (standard conc.)}$$

4.3.3.4. Dosage du cholestérol: le dosage du cholestérol a été réalisé par la méthode enzymatique colorimétrique selon la fiche technique du Kit pré-utilisé (Spinréact - Espagne).

✚ **Principe:** le cholestérol et ses esters sont libérés à partir des lipoprotéines par des détergents. Le cholestérol estérase hydrolyse les esters et le H₂O₂ est formé dans la réaction d'oxydation enzymatique du cholestérol sous l'action du cholestérol oxydase. Le

peroxyde d'hydrogène réagit avec le phénol pour produire le qui non élimine, selon les réactions ci dessous:



L'intensité de la coloration rouge formée est proportionnelle à la concentration du cholestérol dans l'échantillon (Naito, 1984).

✚ Réactifs

Réactif 1: Tampon	PIPES pH 6,9	90 mM/l
	Phénol	26 mM/l
Réactif 2: Enzymes	Cholestérol estérase (CHE)	300 U/l
	Cholestérol oxydase (CHOD)	300 U/l
	Peroxydase (POD)	1250 U/l
	4-Aminophénazone (4-AP)	0,4 mM/l
Cholestérol calibrateur	Cholestérol aqueux (standard)	200 mg/dl

✚ **Réactif de travail:** dissoudre le contenu d'une bouteille de R2 dans un flacon de R1 et mélanger légèrement. Ce réactif est stable pendant 4 mois à 2-8°C ou 40 jours à 15-25°C.

✚ Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1,0	1,0	1,0
Etalon (µL)	-	10	-
Echantillon (µL)	-	-	10

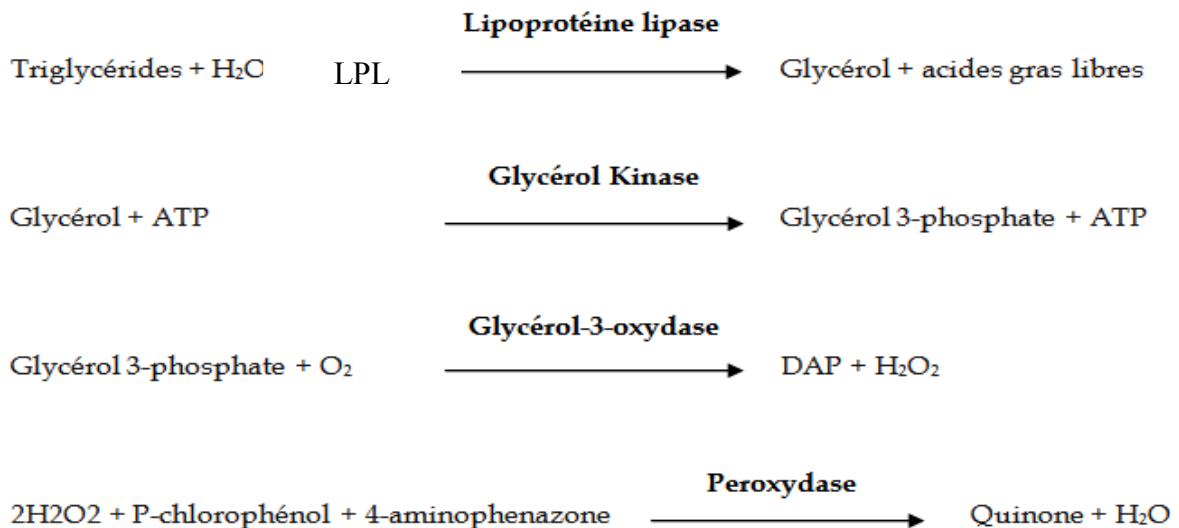
Mélanger et incubé 10 min à température ambiante. Lire l'absorbance (A) des échantillons et de l'étalon, contre le blanc à 505 nm. La couleur est stable pendant 60 minutes.

- ✚ **Calcul de la concentration:** la concentration du cholestérol est calculée par la formule suivante:

$$\text{Concentration du cholestérol (mg/dl)} = \frac{(\text{A}) \text{ échantillon}}{(\text{A}) \text{ standard}} \times 200 \text{ (standard conc.)}$$

4.3.3.5. Dosage des triglycérides: le dosage des triglycérides a été réalisé par la méthode enzymatique colorimétrique selon la fiche technique du Kit pré-utilisé (Spinréact - Espagne).

- ✚ **Principe:** les triglycérides incubés avec la lipoprotéinlipase (LPL), libèrent le glycérol et les acides gras libres. Le glycérol est converti en glycérol-3-phosphate (G3P) et adénosine-5-diphosphate (ADP) par la glycérol kinase et l'adénosine triphosphate (ATP). Le glycérol-3-phosphate (G3P) est alors converti par la glycérol phosphate déshydrogénase (GPO) en dihydroxyacétone phosphate (DAP) et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Dans la dernière réaction, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) réagit avec 4-aminophénazone (4-AP) et p-chlorophénol en présence de la peroxydase (POD) pour donner une coloration rouge. Le protocole comprend donc les réactions suivantes:



L'intensité de la coloration rouge formée est proportionnelle à la concentration des triglycérides dans l'échantillon (Bucolo et David, 1973).

✚ Réactifs

Réactif 1: Tampon	GOOD pH 7,5	50 mM/l
	p-Chlorophénol	2 mM/l
Réactif 2: Enzymes	Lipoprotéine lipase (LPL)	150000 U/l
	Glycérol kinase (GK)	500 U/l
	Glycérol-3-oxydase (GPO)	2500 U/l
	Peroxydase (POD)	440 U/l
	4-Aminophénazone (4-AP)	0,1 mM/l
	ATP	0,1 mM/l
Triglycérides calibrateur	Triglycérides aqueux (standard)	200 mg/dl

- ✚ **Réactif de travail:** dissoudre le contenu d'une bouteille de R2 dans un flacon de R1 et mélanger légèrement. Ce réactif est stable pendant 6 semaines à 2-8°C ou une semaine à 15-25°C.

✚ Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1,0	1,0	1,0
Etalon (µL)	-	10	-
Echantillon (µL)	-	-	10

Mélanger et incuber 10 min à température ambiante. Lire l'absorbance (A) des échantillons et de l'étalon, contre le blanc à 505 nm. La couleur est stable pendant 30 minutes.

- ✚ **Calcul de la concentration:** la concentration des triglycérides est calculée par la formule suivante :

$$\text{Concentration des triglycérides (mg/dl)} = \frac{(A) \text{ échantillon}}{(A) \text{ standard}} \times 200 \text{ (standard conc.)}$$

4.3.3.6. Dosage des protéines totales : le dosage de protéines a été réalisé par la méthode colorimétrique selon la fiche technique du Kit pré-utilisé (Spinreact-Espagne).

✚ **Principe:** Les protéines forment un complexe coloré en bleu violet intensif avec les ions de cuivre dans un milieu alcalin. L'iode est inclus comme un antioxydant. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration des protéines totales dans l'échantillon (Koller, 1984 ; Burtis *et al*, 2005).

✚ Réactifs

Réactif 1: Biuret	Sodium potassium tartrate	15 mmol/l.
	Sodium iodique	100 mmol/l.
	Potassium iodique	5 mmol/l.
	Sulfate de cuivre (II)	19 mmol/l.
Etalon	Sérum albumine bovin	7 g/dl

✚ Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (µl)	--	25	--
Echantillon (µl)	--	--	25

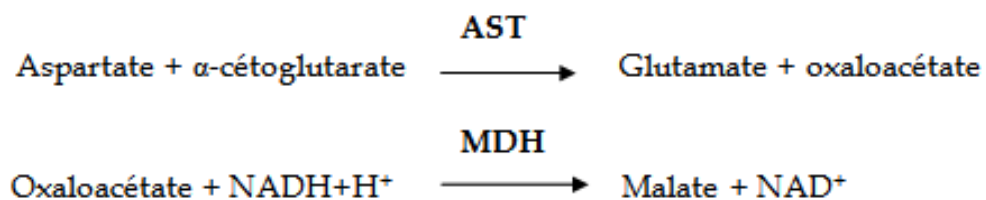
Mélanger, incuber pendant 5 min à 37°C, ou 15-20 min à une température ambiante. Lire les absorbances des échantillons et de l'étalon contre le blanc réactif à 540 nm. La coloration finale est stable au moins 30 minutes.

✚ **Calcul de la concentration:** la concentration des protéines totales est calculée par la formule suivante :

$$\text{Protéines totales (g/dl)} = \text{DO échantillon} / \text{DO étalon} \times \text{concentration de l'étalon (7 g/dl)}$$

4.3.3.7. Dosage de l'aspartate aminotransférase (ASAT): le dosage de l'aspartate aminotransférase a été réalisé par la méthode cinétique selon la fiche technique du Kit pré-utilisé (Spinréact - Espagne).

✚ **Principe:** l'aspartate aminotransférase (ASAT) appelée aussi la glutamate- oxaloacétate transaminase (GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'aspartate au α -cétoglutarate formant le glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate est réduit au malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH+H⁺ selon les réactions suivantes:



Le taux de la diminution de la concentration en NADH+H⁺, mesuré par photométrie, est proportionnel à l'activité catalytique de l'aspartate aminotransférase (Murray, 1984b).

✚ Réactifs

Réactif 1: Tampon	TRIS pH 7,8	80 mM/l
	L-Aspartate	200 mM/l
Réactif 2: Substrat	NADH	0,18 mM/l
	Lactate déshydrogénase (LDH)	800 U/l
	Malate déshydrogénase (MDH)	600 U/l
	α -cétoglutarate	12 mM/l

✚ **Réactif de travail:** dissoudre un comprimé de R2 dans un flacon de R1 et mélanger légèrement. Ce réactif est stable pendant 21 jours à 2-8°C ou 72 heures à 15-25°C.

✚ Mode opératoire

Réactif de travail (ml)	1,0
Echantillon (μL)	100

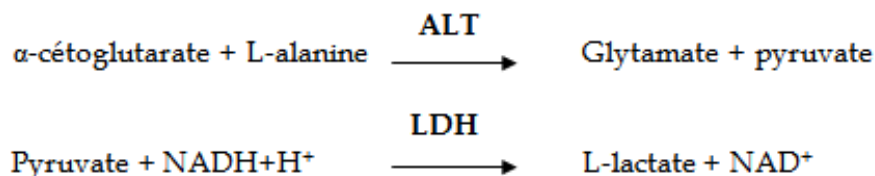
Mélanger et incuber pendant 1 minute. Lire l'absorbance initiale (A) de l'échantillon à 340 nm. Lancer le chronomètre et lire les absorbances pendant 3 minutes à une minute d'intervalle.

- ✚ **Calcul de la concentration:** l'activité catalytique de l'ASAT est calculée par la formule suivante :

$$\text{ASAT (U/l)} = \Delta A / \text{min} \times 1750$$

4.3.3.8. Dosage de l'alanine aminotransférase (ALAT): le dosage de l'alanine aminotransférase a été réalisé par la méthode cinétique selon la fiche technique du Kit pré-utilisé Spinréact (Espagne).

- ✚ **Principe:** l'alanine aminotransférase (ALAT) appelée aussi la glutamate-pyruvate transaminase (GPT) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'alanine au α -cétoglutarate formant le glutamate et le pyruvate. Le pyruvate est réduit au lactate par la lactate-déshydrogénase (LDH) et le NADH selon les réactions suivantes:



Le taux de la diminution de la concentration en NADH+H⁺, mesuré par photométrie, est proportionnel à l'activité catalytique de l'alanine aminotransférase (Murray, 1984c).

✚ Réactifs

Réactif 1: Tampon	TRIS pH 7,8	100 mM/l
	L-Alanine	500 mM/l
Réactif 2: Substrat	NADH	0,18 mM/l
	Lactate déshydrogénase (LDH)	1200 U/l
	α -cétoglutarate	15 mM/l

- ✚ **Réactif de travail:** dissoudre un comprimé de R2 dans un flacon de R1 et mélanger légèrement. Ce réactif est stable pendant 21 jours à 2-8°C ou 72 heures à 15-25°C.

- ✚ **Mode opératoire**

Réactif de travail (ml)	1,0
Echantillon (µL)	100

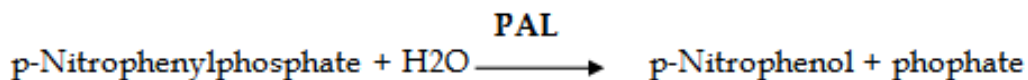
Mélanger et incuber pendant 1 minute. Lire l'absorbance initiale (A) de l'échantillon à 340 nm. Lancer le chronomètre et lire les absorbances pendant 3 minutes à une minute d'intervalle.

- ✚ **Calcul de la concentration:** l'activité catalytique de l'ALAT est calculée par la formule suivante:

$$\text{ALAT (U/l)} = \Delta A / \text{min} \times 1750$$

4.3.3.9. Dosage de la phosphatase alcaline (PAL): le dosage de la phosphatase alcaline a été réalisé par la méthode cinétique selon la fiche technique du Kit pré-utilisé (Spinréact -Espagne).

- ✚ **Principe:** la phosphatase alcaline (PAL) catalyse l'hydrolyse du p-nitrophényl phosphate à pH 10,4, libérant le p-nitrophénol et le phosphate, selon la réaction suivante:



Le taux de la diminution de la concentration en NADH+H⁺, mesuré par photométrie, est proportionnel à l'activité catalytique de la phosphatase alcaline (Wenger, 1984).

- ✚ **Réactifs**

Réactif 1: Tampon	Diéthanolamine (DEA) pH 10,4	1 mM/l
	Chloride de magnésium	0,5 mM/l
Réactif 2: Substrat	p-Nitophénylphosphate (pNPP)	10 mM/l

- ✚ **Réactif de travail:** dissoudre un comprimé de R2 dans un flacon de R1 et mélanger légèrement. Ce réactif est stable pendant 21 jours à 2-8°C ou 72 heures à 15-25°C.

- ✚ **Mode opératoire**

Réactif de travail (ml)	1,0
Echantillon (µL)	100

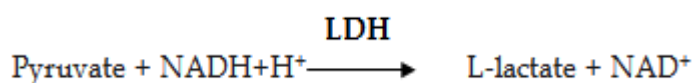
Mélanger et incuber pendant 1 minute. Lire l'absorbance initiale (A) de l'échantillon à 405 nm. Lancer le chronomètre et lire les absorbances pendant 3 minutes à une minute d'intervalle.

- ✚ **Calcul de la concentration:** l'activité catalytique de la PAL est calculée par la formule suivante:

$$\text{PAL (U/l)} = \Delta A / \text{min} \times 3300$$

4.3.3.10. Dosage du lactate déshydrogénase (LDH): le dosage du lactate déshydrogénase a été réalisé par la méthode cinétique selon la fiche technique du Kit pré-utilisé (Spinréact - Espagne).

- ✚ **Principe:** le lactate déshydrogénase (LDH) catalyse la réduction du pyruvate par le NADH, selon la réaction suivante:



Le taux de la diminution de la concentration en NADH+H⁺, mesuré par photométrie, est proportionnel à l'activité catalytique du lactate déshydrogénase (Pesce, 1984).

- ✚ **Réactifs**

Réactif 1: Tampon	Imidazole	65 mM/l
	Pyruvate	0,6 mM/l
Réactif 2: Substrat	NADH	0,18 mM/l

- ✚ **Réactif de travail:** dissoudre un comprimé de R2 dans un flacon de R1 et mélanger légèrement. Ce réactif est stable pendant 2 jours à 2-8°C ou 12 heures à 15-25°C.

- ✚ **Mode opératoire**

Réactif de travail (ml)	3,0
Echantillon (µL)	50

Mélanger et incubé pendant 1 minute. Lire l'absorbance initiale (A) de l'échantillon à 340 nm. Lancer le chronomètre et lire les absorbances pendant 3 minutes à une minute d'intervalle.

- ✚ **Calcul de la concentration:** l'activité catalytique du lactate déshydrogénase est calculée par la formule suivante:

$$\text{LDH (U/l)} = \Delta A / \text{min} \times 9690$$

4.3.4. Dosage tissulaire des paramètres du stress oxydant

4.3.4.1. Dosage du glutathion (GSH)

- ✚ **Principe:** le dosage du glutathion a été réalisé selon la méthode de Weckbecker et Cory (1988). Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5 mercapturique. Ce dernier résulte de la réduction de l'acide 5,5'-dithiobis- 2-nitrobenzoïque (réactif d'Ellman, DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion. Pour cela une déprotéinisation de l'homogénat est indispensable afin de garder uniquement les groupements thiol spécifiques du glutathion.
- ✚ **Préparation de l'homogénat:** le dosage du glutathion a été fait au niveau du foie, des reins, de la rate, des testicules et des intestins. 200 mg de chaque tissu ont été mis en présence de 8 ml d'une solution d'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA) à 0,02 M, puis ont été broyés à froid en utilisant un broyeur ultra son (4 °C) pour obtenir un homogénat.

✚ Mode opératoire

- Prélever 0,8 ml de l'homogénat.
- Déprotéiniser en ajoutant 0,2 ml d'une solution d'acide sulfosalicylique (SSA) 0,25 %
- Agiter le mélange et laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace.
- Centrifuger à 1000 tours/min pendant 5 min.
- Prélever 0,5 ml du surnageant.
- Ajouter 1 ml du tampon Tris-EDTA (0,4 M Tris + 0,02 M EDTA), pH 9,6.
- Mélanger et ajouter 0,025 ml de DTNB à 0,01 M (dissous dans le méthanol absolu).
- Laisser pendant 5 min à température ambiante pour la stabilisation de la couleur qui se développe instantanément.
- Lire les densités optiques à 412 nm contre le blanc.

✚ **Calcul de La concentration:** la concentration du glutathion est obtenue par la formule suivante:

$$[\text{GSH}] \text{ (nM GSH /mg protide)} = (\text{DO} \times 1 \times 1,525) / (13100 \times 0,8 \times 0,5 \times \text{mg protide})$$

- D0: Densité optique.
- 1: Volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0.8mL homogénat + 0,2 ml de l'acide salicylique).
- 1,525: Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0,5 ml surnageant +1 ml Tris + 0,025 ml DTNB).
- 13100: Coefficient d'absorbance du groupement –SH à 412 nm.
- 0,8: Volume de l'homogénat.
- 0,5: Volume du surnageant.

4.3.4.2 Dosage du malondialdéhyde (MDA)

✚ **Préparation de l'homogénat:** le dosage de MDA a été fait au niveau du foie. 500 mg de chaque tissu ont été mis en présence de 5 ml d'une solution de tampon phosphate (0,1 M, pH 7.4), puis ont été broyés à froid (4 °C) en utilisant un broyeur ultra son pendant 30 secondes pour obtenir un homogénat.

✚ **Principe:** le MDA est l'un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés (PUFA) médiées par les radicaux libres. Dans notre étude, les

taux du MDA hépatique et rénal ont été évalués selon la méthode d'Ohkawa *et al.* (1979). Le dosage repose sur la formation en milieu acide et chaud (100 °C) entre le MDA et l'acide thiobarbiturique (TBA) d'un pigment coloré absorbant à 530 nm, extractible par les solvants organiques comme le butanol.

✚ Mode opératoire

- Prélever 0,5 ml de l'homogénat.
- Ajouter 0,5 ml d'acide trichloracétique (TCA) 20 %.
- Ajouter 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA) 0,67 %.
- Mélanger et incuber au bain marie à une température de 100 °C pendant 15 minutes.
- Refroidir et additionner de 4 ml de *n*-butanol.
- Centrifuger pendant 15 minutes à 3000 tours/min.
- Récupérer le surnageant, et lire la densité optique à 530 nm contre le blanc.

✚ **Calcul de la concentration du MDA:** la quantité du MDA dans l'échantillon est exprimée en nM/gramme de tissu (foie ou reins). Elle est obtenue grâce à une courbe standard réalisée avec du 1,1', 3,3'-tetraethoxypropane faite dans les mêmes conditions.

4.3.4.3. Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GSH-Px)

✚ **Préparation de l'homogénat:** le dosage de la glutathion peroxydase a été fait au niveau du foie. 500 mg de chaque tissu ont été mis en présence de 5 ml d'une solution TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4), puis ont été broyés à froid (4 °C) en utilisant un broyeur ultra son pendant 30 secondes pour obtenir un homogénat.

✚ **Principe:** l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GSH-Px) a été mesurée par la méthode de Flohé et Günzler (1984). Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de la GPx selon la réaction suivante :



✚ Mode opératoire

- Prélever 0,2 ml de l'homogénat.

- Ajouter 0,4 ml de GSH (0,1 mM).
- Ajouter 0,2 ml de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4).
- Incuber au bain marie à 25°C, pendant 5 min.
- Ajouter 0,2 mL de H₂O₂ (1,3 mM) pour initier la réaction, laisser agir pendant 10 minutes.
- Ajouter 1 ml de TCA (1 %) pour arrêter la réaction.
- Mettre le mélange dans la glace pendant 30 minutes.
- Centrifuger durant 10 minutes à 3000 tours /minutes.
- Prélever 0,48 ml du surnageant.
- Ajouter 2,2 ml de la solution tampon TBS.
- Ajouter 0,32 ml de DTNB (1 mM).
- Mélanger et après 5 minutes lire les densités optiques à 412 nm contre le blanc.

✚ **Calcul de l'activité enzymatique de la GSH-Px:** la détermination de l'activité enzymatique de la GSH-Px se fait à l'aide de la formule suivante :

$$X = \frac{(\text{DO échantillon} - \text{DO étalon}) \times 0.04}{\text{DO étalon}}$$

$$\text{GPx } (\mu\text{mol GSH/mg protéine}) = \text{Quantité GSH disparu} \times \frac{5}{[\] \text{ de protéine}}$$

- X: Quantité de GSH réduit disparu (oxydé) dans 0.2 ml extrait dans 1 ml
- DO échantillon: Densité optique de l'échantillon
- DO étalon: Densité optique de l'étalon
- 0,04: Concentration de substrat (GSH)

4.3.4. 4. Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (GSH-ST)

✚ **Préparation de l'homogénat:** le dosage de la glutathion S-transférase a été fait au niveau du foie. 500 mg de chaque tissu ont été mis en présence de 5 ml d'une solution TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4), puis ont été broyés à froid (4 °C) en utilisant un broyeur ultra son pendant 30 secondes pour obtenir un homogénat.

✚ **Principe:** la mesure de l'activité des GSH-ST a été réalisée par la méthode de Habig *et al.* (1974), celle-ci consiste à fournir à l'enzyme un substrat en général du 1-chloro, 2,4-dinitrobenzène (CDNB), qui se conjugue facilement avec glutathion sous l'action de nombreuses formes de GSH-ST. La réaction de conjugaison de ces deux produits entraîne la formation d'une molécule nouvelle qui absorbe la lumière à 340 nm de longueur d'onde.

✚ **Mode opératoire:** la méthode utilisée dans cette étude consiste à faire agir les GSH-ST contenues dans l'homogénat sur un mélange (GSH + CDNB) à une température de 37 °C et à un pH de 6,5. La variation de la densité optique, due à l'apparition du complexe GSH-CDNB, est mesurée pendant 1 minute durant 5 minutes à une longueur d'onde de 340 nm.

Réactifs	Blanc (µL)	Essai (µL)
Tampon phosphate (0,1 M) pH 6,5	850	830
CDNB (0,02 M)	50	50
GSH (0,1 M)	100	100
Homogénat	-	20

✚ **Calcul de l'activité enzymatique de la GSH-ST:** l'activité enzymatique de la GSH-ST est obtenue par la formule suivante:

$$\text{GST (nmol GST / min / mg protéine)} = \frac{(\text{DO échantillon / min} - \text{DO blanc / min})}{9.6 \times \text{mg protéine}}$$

- DO échantillon/min: Densité optique de l'échantillon par minute.
- DO blanc/min: Densité optique du blanc par minute.
- 9,6: Coefficient d'extinction du GSH-CDNB exprimé en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

4.3.4.5. Dosage de l'activité enzymatique du catalase (CAT)

✚ **Préparation de l'homogénat:** le dosage de l'activité enzymatique du CAT a été fait au niveau du foie. 500 mg de chaque tissu ont été mis en présence de 5 ml d'une solution de

tampon phosphate (0,1 M, pH 7,4), puis ont été broyés à froid (4 °C) en utilisant un broyeur ultra son pendant 30 secondes pour obtenir un homogénat, ce dernier est centrifugé à 5000 tours/min pendant 15 minutes.

Principe: la méthode utilisée dans le dosage de l'activité enzymatique du CAT est celle d'Aebi (1984). La CAT catalyse la destruction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. L'activité du CAT a été mesurée à 240 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du H₂O₂ à une température d'incubation de 25 °C.

Mode opératoire

Réactifs	Blanc (µL)	Essai (µL)
Tampon phosphate (0,1 M) pH 7,5	800	780
H ₂ O ₂ (0,5 M)	200	200
Homogénat (S9)	-	20

On note que:

- Le zéro de l'appareil est réalisé par le tampon phosphate.
- La quantité de l'homogénat (S9) doit être déterminée en fonction de la quantité de protéines qui doit être comprise entre 1 et 1,5 mg/ml, soit une quantité de 10 à 20 µl de S9 dilué.
- L'activité décroît rapidement, il est important de mettre toujours le même temps de pipetage et le moment où on place la cuve au spectrophotomètre.
- La lecture de l'absorption se fait après 15 secondes de délai et durant 60 secondes de mesure.

Calcul de l'activité enzymatique du CAT: l'activité enzymatique de la CAT est calculée par la formule suivante:

$$\text{Activité CAT } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 / \text{min} / \text{mg protéine}) = \frac{\Delta \text{DO}}{\epsilon \times L \times X}$$

- ΔDO : Variation de la densité optique par minutes.
- ϵ : Coefficient d'extinction du H_2O_2 ($0,04 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{Cm}^{-1}$).
- L: Largeur de la cuve ou longueur du trajet optique (1 cm).
- X: Quantité des protéines en mg/ml.

NB: On note que le dosage de plusieurs paramètres est mesuré par rapport à 1 mg de protéines. C'est pour cela ce dosage doit être accompagné par le dosage des protéines.

4.3.5. Dosage des protéines tissulaire

✚ **Principe:** la concentration de protéines est déterminée selon la méthode de Bradford (1976) qui utilise le bleu de Coomassie (G 250) comme réactif. Ce dernier réagit avec les groupements amines ($-NH_2$) des protéines pour former un complexe de couleur bleu. (L'apparition de la couleur bleue reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité correspond à la concentration des protéines).

✚ Mode opératoire

- Prélever 0,1 ml de l'homogénat.
- Ajouter 5 ml du réactif de Bradford.
- Agiter et laisser reposer 5 min.
- Lire la densité optique à 595 nm, contre le blanc.

✚ **Calcul de la concentration des protéines:** la densité optique obtenue est rapportée sur une courbe d'étalonnage préalablement tracée. La concentration des protéines est déterminée par comparaison à une gamme étalon d'albumine sérique bovine (1 mg/ml) réalisée dans les mêmes conditions.

4.3.6. Etude histologique

Les coupes histologiques ont été réalisées à l'hôpital Ibn Roched d'Annaba, Service d'Anatomie Pathologique, suivant la technique décrite par (Houlot, 1984). La technique comporte les étapes suivantes:

4.3.6.1. Fixation des échantillons: elle a pour but d'immobiliser les structures cellulaires tout en conservant leurs morphologies. Le temps de la fixation est essentiel pour la

réussite de la technique histologique. Elle doit être réalisée rapidement après la décapitation des rats et prélèvement des organes. Des fragments de foie et de rein (surface 1 à 2 cm² et épaisseur 2 mm) ont été alors mis dans le liquide de Bouin alcoolique (voir préparation aux annexes) qui constitue le fixateur classique le plus utilisé. Il permet de durcir l'échantillon sans l'abîmer. Après 48 heures de fixation les pièces d'organes sont retirées du Bouin puis rincées à l'eau distillée. Les échantillons sont placés dans des cassettes spéciales à parois trouées afin de permettre le passage des liquides au cours des manipulations qui suivent.

4.3.6.2. Déshydratation des échantillons: comme la paraffine n'est pas miscible à l'eau, les échantillons doivent être alors complètement déshydratés avant l'inclusion dans la paraffine. Cette dernière n'est pas non plus soluble dans l'alcool utilisé pour la déshydratation, on assiste donc à une substitution par le xylène. La déshydratation se fait grâce à un automate qui fait immerger les échantillons dans des bains d'éthanol à concentration croissante (70 %, 95 % et 100 %), puis dans des bains de xylène qui constitue un agent éclaircissant donnant au tissu une certaine transparence. Ensuite, dans l'étuve le xylène s'évapore des pièces anatomiques. Cette étape est réalisée par un appareil appelé le circulateur.

4.3.6.3. Inclusion des échantillons: les pièces sont alors plongées dans des bains de paraffine liquide. Les tissus étant maintenus et imbibés de paraffine, viennent alors l'étape de l'enrobage qui consiste à inclure le tissu imprégné dans un bloc de paraffine qui, en se solidifiant, va permettre sa coupe. Cette opération fait appel à des appareils «dits à inclusion» refermant un réservoir de paraffine maintenue à l'état liquide par un système de chauffage, un petit robinet et une plaque métallique réfrigérée pour obtenir la solidification rapide du bloc de paraffine contenant le tissu. La réalisation des coupes minces de quelques microns (5 µm en moyenne) est possible grâce à des appareils spéciaux appelés «Microtomes». Ces coupes sont étalées sur des lames porte-objet, dépliées et fixées sur la lame par l'utilisation d'une eau gélatineuse chauffée.

4.3.6.4. Confection des coupes histologiques: les blocs de paraffine sont préalablement taillés avant de subir des coupes au microtome de 4 à 5 µm. Les rubans de paraffine obtenus sont étalés sur des lames portes objet, puis dépliés et fixés par une eau gélatineuse chauffée à 40 °C. Les lames sont ensuite séchées dans une étuve à 100 °C pendant 1 heure.

4.3.6.5. Coloration: pour la coloration, on a utilisé la technique à l'Hématoxyline-Eosine ou (Hématéine- Eosine) ; qui nécessite la présence de l'alcool acide (100 ml d'alcool éthylique à 70 % + 50 ml d'acide HCl), eau ammoniacale (100 ml d'eau distillée + 2 ml Ammoniaque) et solution d'Eosine (100 ml Eosine solution aqueuse à 3 %, 125 ml alcool éthylique à 95 %, 375 ml d'eau distillée et 2 gouttes d'acide acétique). La coloration suit les étapes suivantes :

- Déparaffiner et hydrater les lames à l'eau du robinet puis rincer à l'eau distillée.
- Immerger dans un bain d'Hématoxyline de Harris (15 minutes) qui colore en bleu violacée les structures basophiles (noyaux).
- Différencier les coupes dans l'alcool acide (1 à 2 plongées) ; déposer ensuite les lames dans un bain d'eau du robinet et vérifier la différenciation au microscope.
- Bleuir dans un bain d'eau ammoniacale.
- Immerger dans un bain d'Eosine (15 secondes à 2 minutes) qui colore en rose les structures acidophiles (cytoplasme). Tous ces bains sont séparés par des lavages à l'eau du robinet.

Les préparations ont ensuite été séchées puis observées au microscope optique et photographiées à l'aide d'un appareil photo.

4.3.7. Analyse statistique des résultats

Les résultats obtenus sont exprimés en moyenne plus ou moins l'écart type (Moyenne \pm SD). L'analyse des données a été effectuée par application du test *t* de Student, qui est basé sur la comparaison des moyennes deux à deux: entre le lot témoin et chacun des lots traités, en utilisant le logiciel MINITAB (Version 13.31). Les différences sont considérées comme:

- ✓ Significatives: lorsque ($P < 0,05$).
- ✓ Hautement significatives: lorsque ($P < 0,01$).
- ✓ Très hautement significatives: lorsque ($P < 0,001$).

Chapitre 5 :
Résultats

5. RESULTATS

5.1. Étude physiologique

Le traitement des rats par le cadmium n'a produit aucun signe manifeste de toxicité/mortalité. Cependant, le tableau 12 montre une augmentation significative des rapports hépatosomatique, réno-somatique, spléno-somatique et cardio-somatique avec une diminution des rapports gono-somatique et epididymo-somatique chez les rats traités par le cadmium. Le régime alimentaire contenant la nigelle a pu améliorer ces perturbations par le maintien des rapports organo-somatiques à des taux normaux chez les rats intoxiqués (Cd-N) par rapport aux rats témoins.

Tableau 12: Rapports organo-somatiques (%) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours (chaque valeur représente la moyenne \pm SD de 10 rats)

Rapports (%)	Lots expérimentaux			
	(0-0)	(0-N)	(Cd-0)	(Cd-N)
Hépatosomatique	3,58 \pm 0,16	3,78 \pm 0,38	4,84 \pm 0,54*	3,62 \pm 0,44
Néohrosomatique	0,70 \pm 0,04	0,72 \pm 0,07	0,65 \pm 0,02	0,79 \pm 0,07
Spléno-somatique	0,32 \pm 0,04	0,33 \pm 0,06	0,43 \pm 0,10**	0,32 \pm 0,07
Cardio-somatique	0,58 \pm 0,01	0,57 \pm 0,02	0,95 \pm 0,05*	0,61 \pm 0,05
Gonodosomatique	1,02 \pm 0,15	0,99 \pm 0,09	0,84 \pm 0,25**	0,91 \pm 0,20
Epididymosomatique	0,40 \pm 0,06	0,38 \pm 0,05	0,30 \pm 0,08***	0,34 \pm 0,05*
Surrénalosomatique	0,020 \pm 0,005	0,016 \pm 0,002	0,020 \pm 0,004	0,022 \pm 0,004

* (P < 0,05); ** (P < 0,01); *** (P < 0,001): différence significative par rapport aux témoins

Les figures suivantes (20-26) illustrent les effets du traitement des rats par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle sur les rapports organo-somatiques.

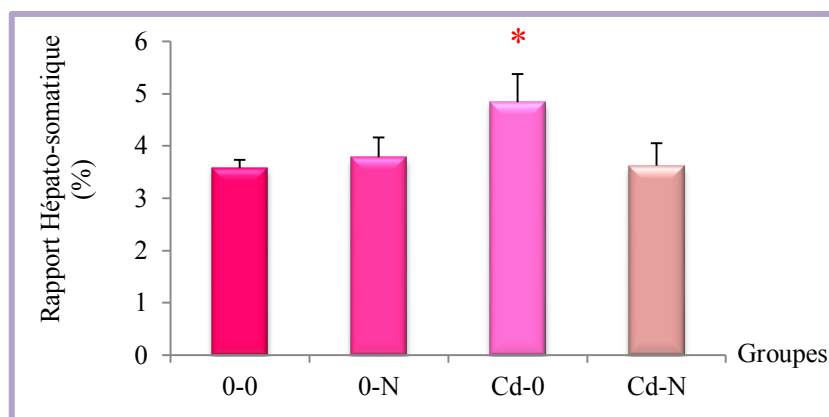


Figure 20: Variations du rapport hépatosomatique (%) chez les rats témoins et traités par le Chlorure de cadmium et/ou la nigelle après 30 jours de traitement

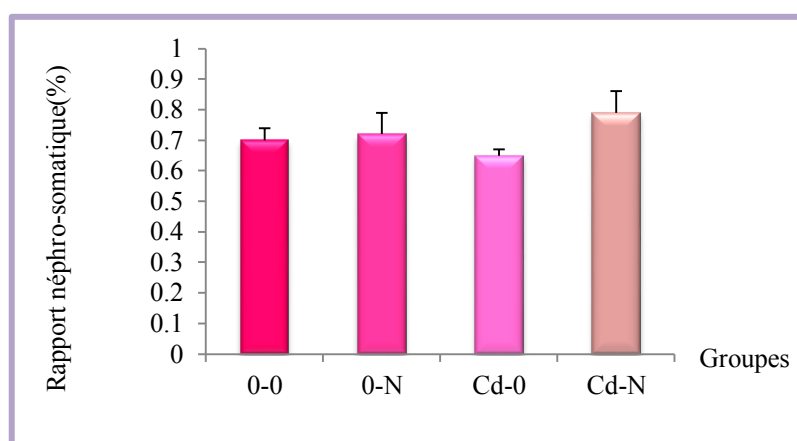


Figure 21: Variations du rapport néphrosomatique (%) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle après 30 jours de traitement

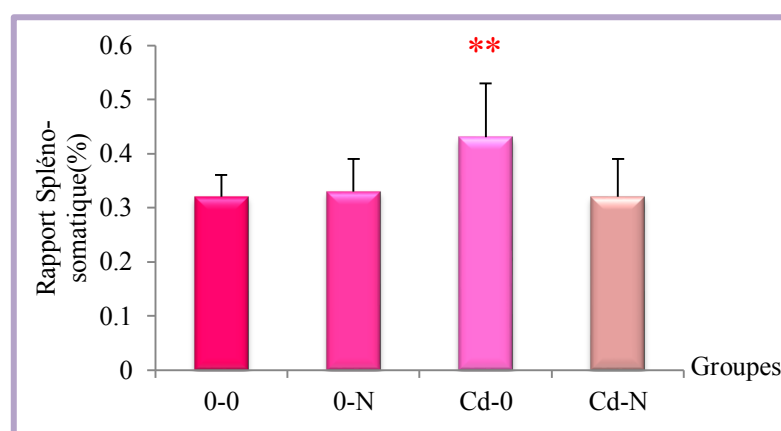


Figure 22: Variations du rapport spléno-somatique (%) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle après 30 jours de traitement.

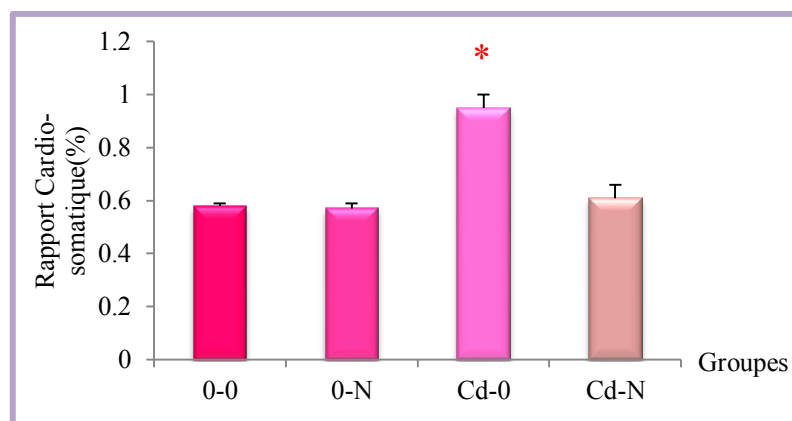


Figure 23: Variations du rapport cardio-somatique (%) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle après 30 jours de traitement

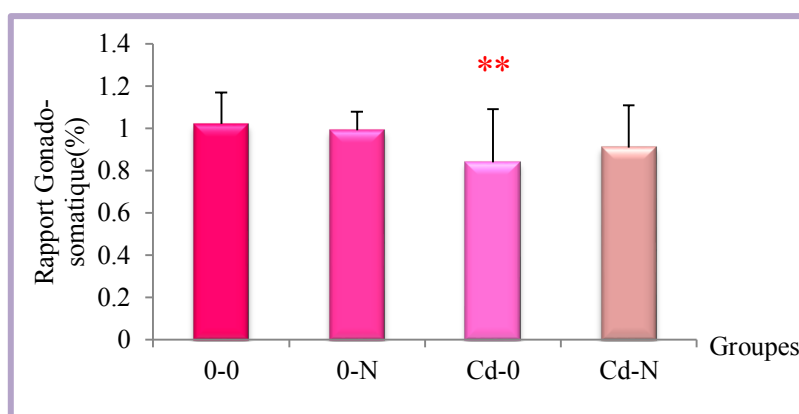


Figure 24: Variations du rapport gonodo-somatique (%) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle après 30 jours de traitement

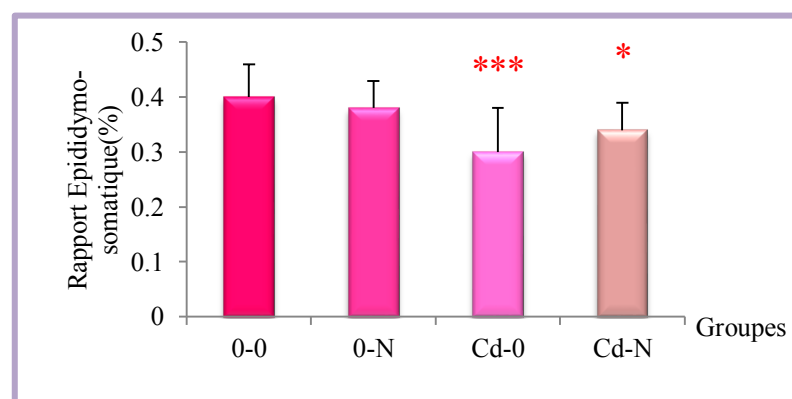


Figure 25: Variations du rapport epididymo-somatique (%) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle après 30 jours de traitement

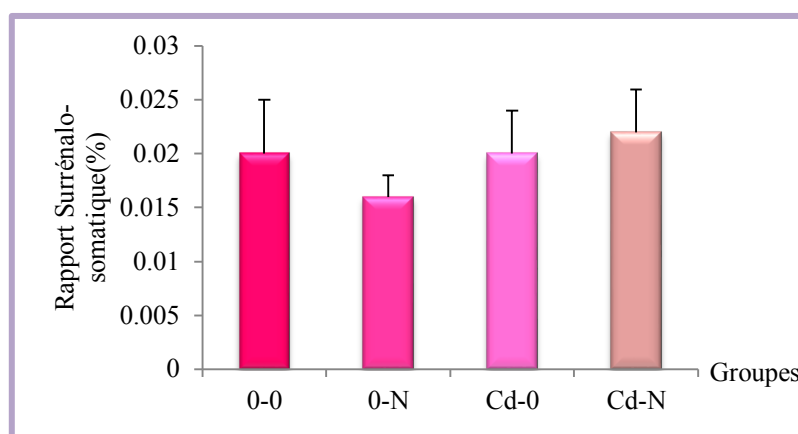


Figure 26: Variations des rapports surrénalo-somatique (%) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle après 30 jours de traitement.

5.2. Étude hématologique

Les résultats du tableau 13 illustrent que la supplémentation de la nigelle dans le régime alimentaire n'a révélé aucun changement significatif de la formule numérique sanguine (FNS). Toutefois, le traitement des rats par le chlorure de cadmium a démontré une diminution significative des valeurs de l'ensemble des paramètres hématologiques en comparant aux rats témoins. L'association de la nigelle avec le cadmium (Cd-N) pourrait protéger les rats de l'effet nocif du cadmium en maintenant les paramètres hématologiques à des valeurs proches de celles des témoins.

Tableau 13: la formule numérique sanguine (FNS) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours (chaque valeur représente la moyenne \pm SD de 10 rats)

Paramètres	Lots expérimentaux			
	(0-0)	(0-N)	(Cd-0)	(Cd-N)
GB ($10^3/\mu\text{L}$)	9,10 \pm 1,30	9,76 \pm 2,25	6,82 \pm 2,55**	10,20 \pm 1,56
GR ($10^6/\mu\text{L}$)	9,35 \pm 0,18	8,65 \pm 1,05	7,04 \pm 0,52*	8,95 \pm 1,41
Hb (g/dL)	156,04 \pm 5,47	151,2 \pm 14,1	149,1 \pm 5,9*	143,7 \pm 18,6
HT (%)	41,74 \pm 3,40	40,55 \pm 4,54	38,43 \pm 2,63*	37,34 \pm 4,87*
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	390,9 \pm 72,2	506 \pm 91,7	293,1 \pm 60,9***	363 \pm 46,5
LY ($10^3/\mu\text{L}$)	7,52 \pm 1,43	8,28 \pm 0,93	5,53 \pm 2,10***	6,54 \pm 0,74

* ($P < 0,05$); ** ($P < 0,01$); *** ($P < 0,001$): différence significative par rapport aux témoins. (GB) globules blancs; (GR) globules rouges; (Hb) hémoglobine; (HT) hématocrite; (PLT) plaquettes; (LY) lymphocytes.

Les figures suivantes illustrent les effets du traitement des rats par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle sur le bilan hématologique.

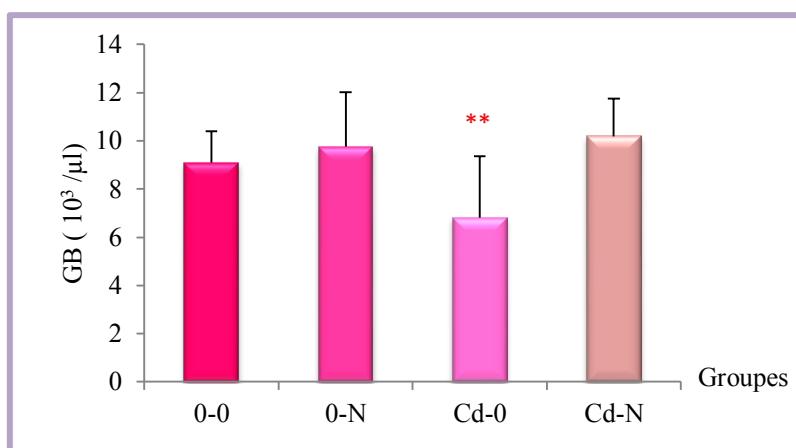


Figure 27: Variation du nombre des globules blancs ($10^3/\mu\text{L}$) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours

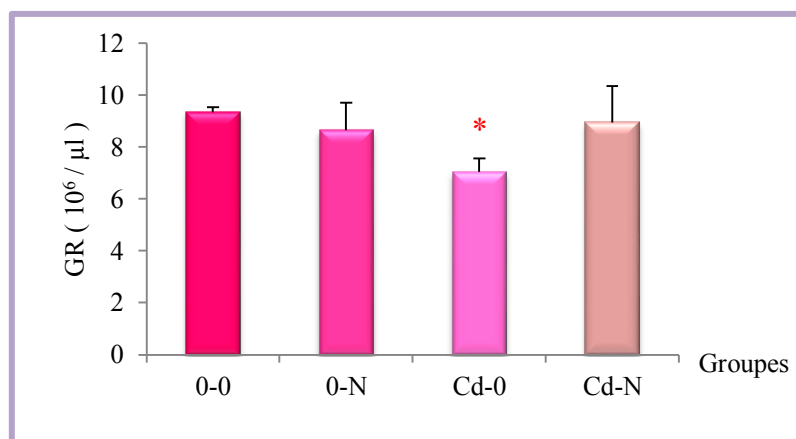


Figure 28: Variation du nombre des globules rouges ($10^6/\mu\text{L}$) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours

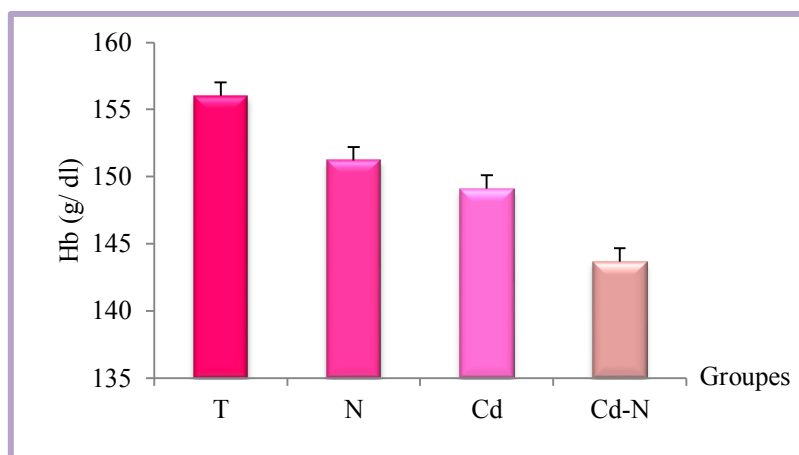


Figure 29: Variation du taux d'hémoglobine (g/dL) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours

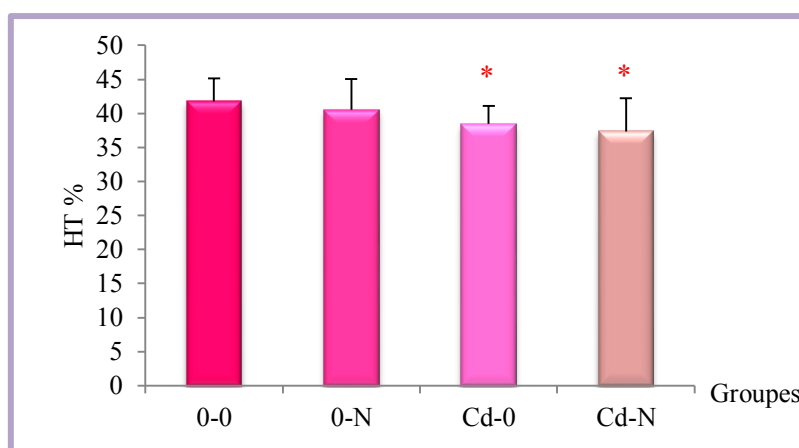


Figure 30: Variation du pourcentage de l'hématocrite (%) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours.

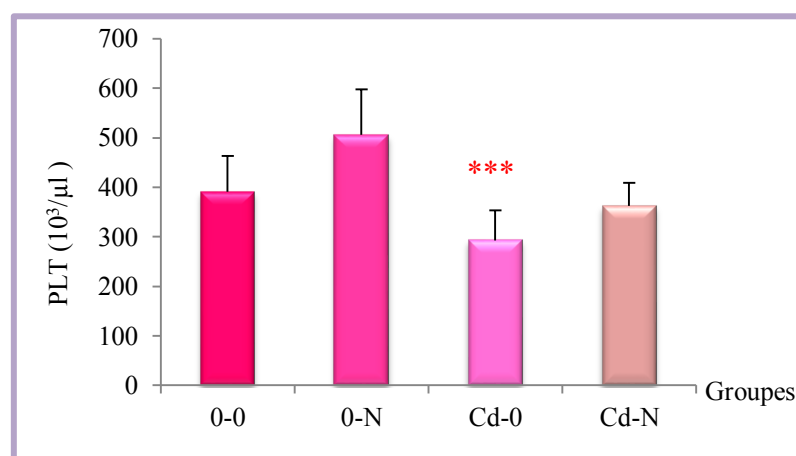


Figure 31: Variation du taux des plaquettes (10³/μL) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours

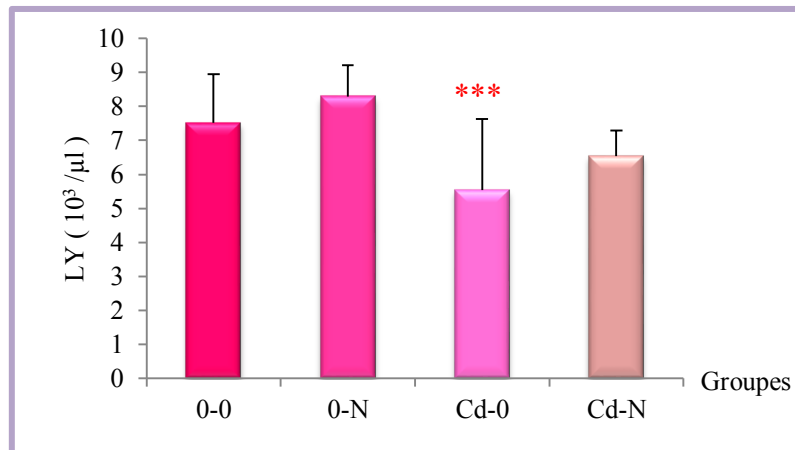


Figure 32: Variation du taux des lymphocytes ($10^3/\mu\text{L}$) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours

5.3. Étude biochimique

5.3.1. Influence du traitement sur la fonction rénale

Une augmentation significative est observée au niveau des paramètres reflétant l'activité rénale (l'urée, la créatinine et l'acide urique) chez les rats traités par le cadmium par rapport au groupe témoin. La nourriture des rats par un régime alimentaire associant la nigelle maintient ces paramètres dans l'intervalle des valeurs normales (tableau 14; figures 33-35).

Tableau 14: Concentration sérique du bilan rénal chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours (chaque valeur représente la moyenne \pm SD de 10 rats)

Paramètres	Lots expérimentaux			
	(0-0)	(0-N)	(Cd-0)	(Cd-N)
Urée (mg/dl)	37,41 \pm 5,91	40,71 \pm 1,45	42,75 \pm 2,62**	39,90 \pm 2,10
Créatinine (mg/dl)	4,13 \pm 0,14	4,57 \pm 0,20	5,78 \pm 0,25*	4,74 \pm 0,16
Acide urique (mg/dl)	2,49 \pm 0,54	3,11 \pm 0,94	3,11 \pm 0,94*	2,72 \pm 0,54

* (P < 0,05); ** (P < 0,01); *** (P < 0,001): différence significative par rapport aux témoins

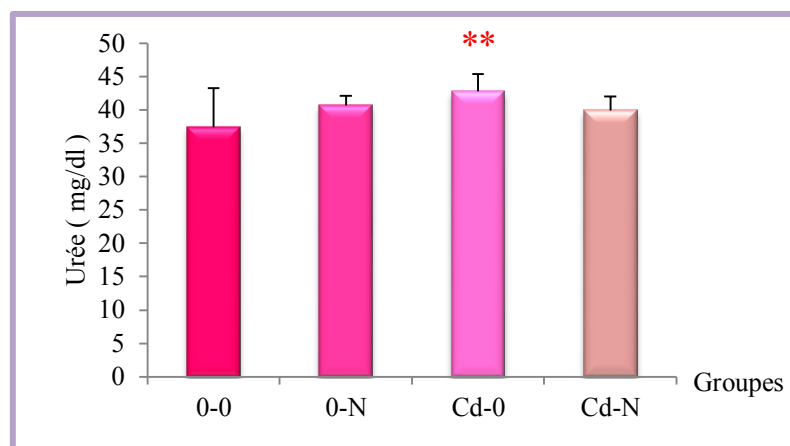


Figure 33 : Variation de la concentration sérique de l'urée (mg/dL) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours.

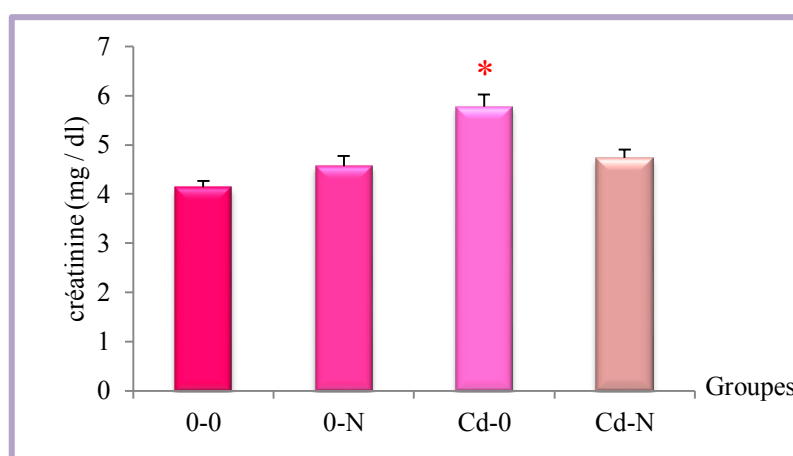


Figure 34 : Variation de la concentration sérique de la créatinine (mg/dL) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours.

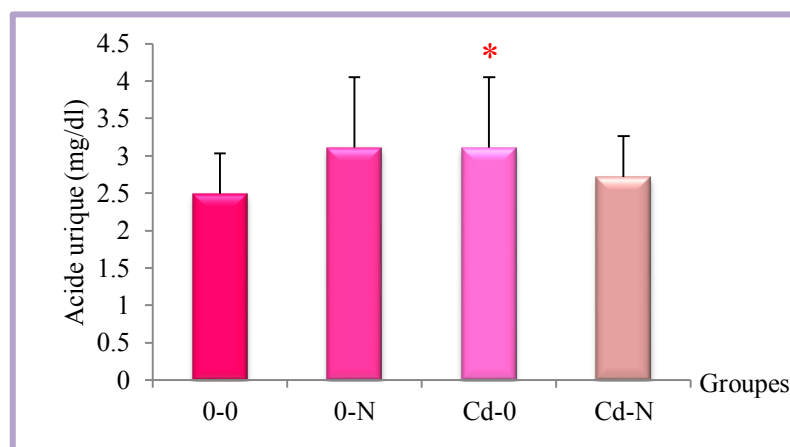


Figure 35 : Variation de la concentration sérique de l'acide urique (mg/dL) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours

5.3.2. Influence du traitement sur le bilan biochimique

Les résultats présentés dans le tableau 15 indiquent d'une part qu'il n'y a aucun changement significatif des concentrations en glucose et en protéines sériques dans les différents groupes de rats traités par rapport au groupe témoin. D'autre part, il existe un grand trouble métabolique après le traitement des rats par le cadmium révélé par l'élévation significative dans les activités des enzymes sériques: les transaminases (ASAT, ALAT), la phosphatase alcaline (PAL) et la lactate déshydrogénase (LDH). L'addition de la nigelle a stoppé ces perturbations hépatiques et a globalement restauré le statut enzymatique à l'état normal.

Tableau 15: Concentrations du bilan biochimique chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours (chaque valeur représente la moyenne \pm SD de 10 rats)

Paramètres	Lots expérimentaux			
	(0-0)	(0-N)	(Cd-0)	(Cd-N)
Glucose (mg/dL)	100,20 \pm 8,23	93,91 \pm 0,31	103,23 \pm 20,2	102,42 \pm 1,02
Protéines sérique (mg/dL)	7,57 \pm 1,50	7,34 \pm 1,92	8,03 \pm 2,74	7,91 \pm 1,03
LDH (UI/L)	163,11 \pm 31,01	172,15 \pm 18,54	184,35 \pm 21,04**	181,55 \pm 17,75*
LAT (UI/L)	55,30 \pm 2,72	49,4 \pm 9,61	62,4 \pm 1,23**	57,4 \pm 6,10
ASAT (UI/L)	42,40 \pm 10,30	41 \pm 8,33	64,5 \pm 11,92**	52,1 \pm 9,61
ALP (UI/L)	174,05 \pm 15,20	178,2 \pm 13,80	193,2 \pm 17,55*	178,1 \pm 12,89

* (P < 0,05); ** (P < 0,01): différence significative par rapport aux témoins

Les résultats du bilan biochimique est bien illustré dans les figures suivantes :

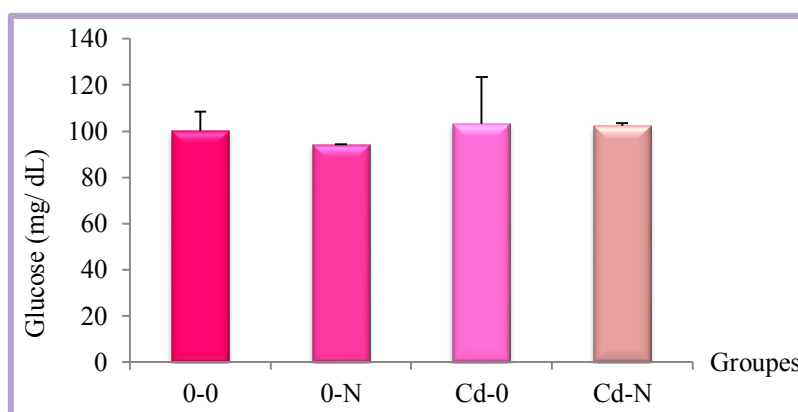


Figure 36: Variation de la concentration du glucose sanguin (mg/dL) chez les rats témoins et traités après 30 jours de traitement.

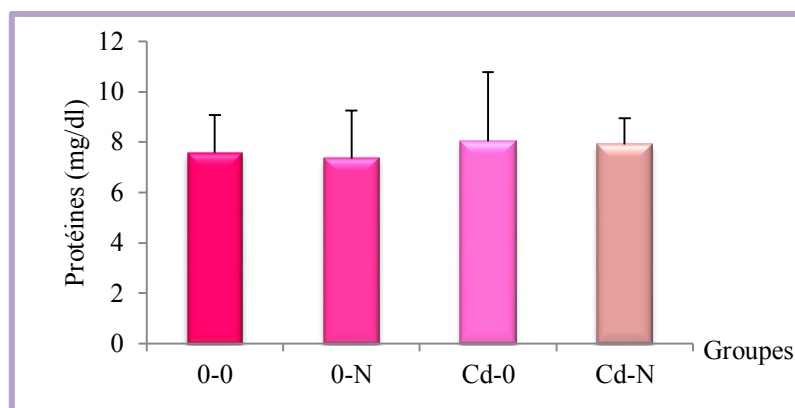


Figure 37: Variation de la concentration des protéines totales (mg/dL) chez les rats témoins et traités après 30 jours de traitement.

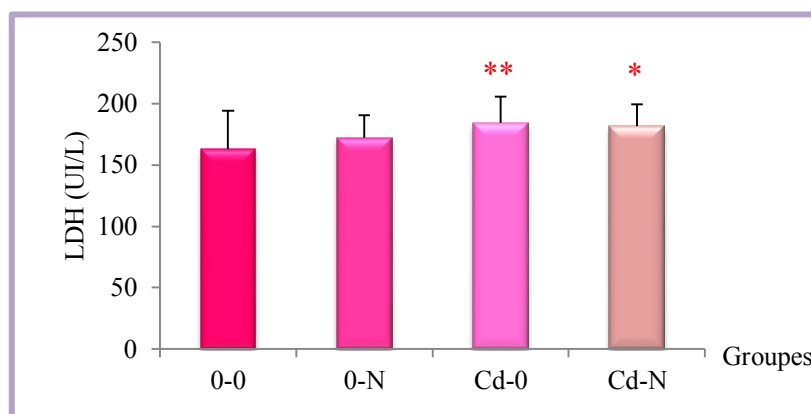


Figure 38: Variation de la concentration de lactate déshydrogénase (U/L) chez les rats témoins et traités après 30 jours de traitement.

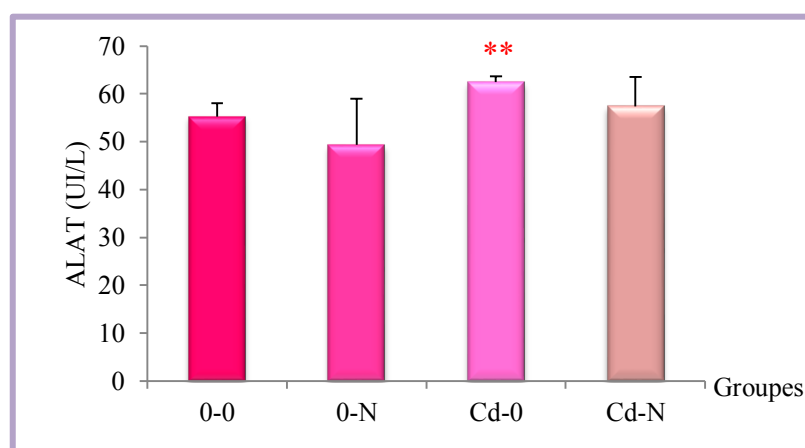


Figure 39: Variation de la concentration de l'alanine amino-transférase (U/L) chez les rats témoins et traités après 30 jours de traitement

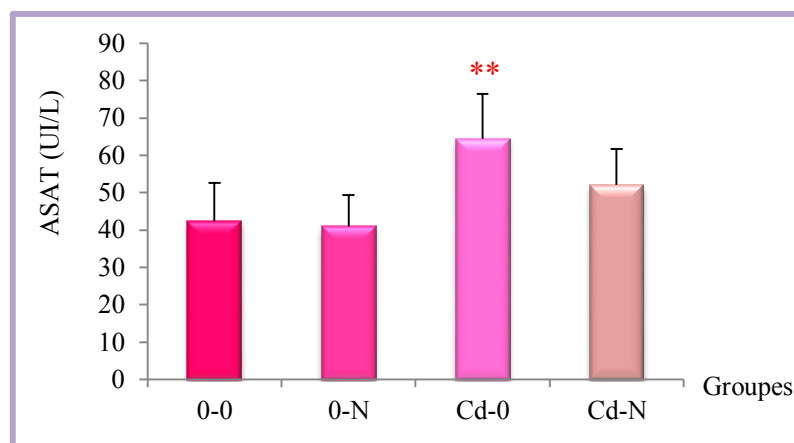


Figure 40: Variation de la concentration de l'aspartate aminotransférase (U/L) chez les rats témoins et traités après 30 jours de traitement.

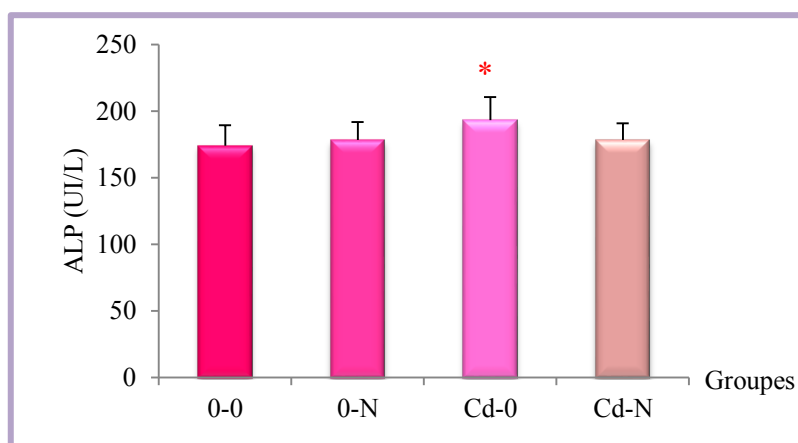


Figure 41: Variation de la concentration de phosphatase alcaline (U/L) chez les rats témoins et traités après 30 jours de traitement.

5.3.3. Influence du traitement sur le profil lipidique

Le traitement des rats par le cadmium a induit une augmentation significative du cholestérol et des triglycérides comparativement avec le lot témoin. Il faut noter que la présence de la nigelle au niveau du groupe (Cd-N) a pu atténuer les effets nocifs du cadmium en stabilisant le profil lipidique (tableau 16; figures 42-43).

Tableau 16: Concentrations du bilan lipidique chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours (chaque valeur représente la moyenne \pm SD de 10 rats).

Paramètres	Lots expérimentaux			
	(0-0)	(0-N)	(Cd-0)	(Cd-N)
Triglycérides (mg/dl)	124,7 \pm 11,0	117,6 \pm 9,5	177,1 \pm 14,0***	136 \pm 15,7
Cholestérol (mg/dl)	73,8 \pm 8,5	75,1 \pm 7,2	89,2 \pm 8,3**	79,8 \pm 6,7

* (P < 0,05); ** (P < 0,01); *** (P < 0,001): différence significative par rapport aux témoins

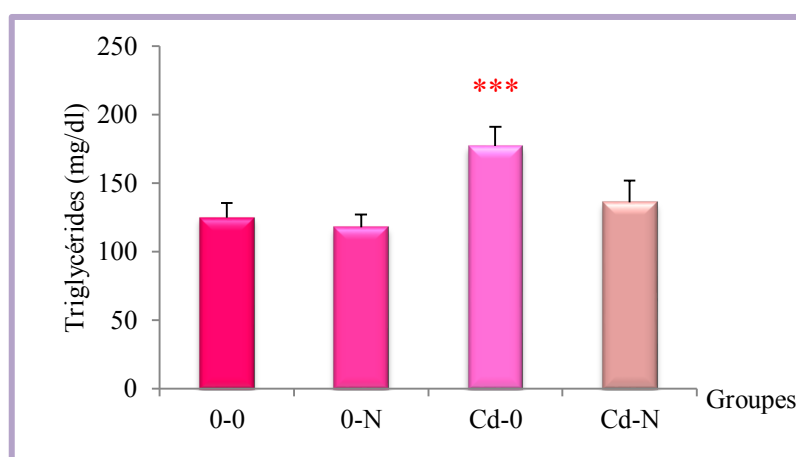


Figure 42: Variation du taux des triglycérides (mg/dL) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours.

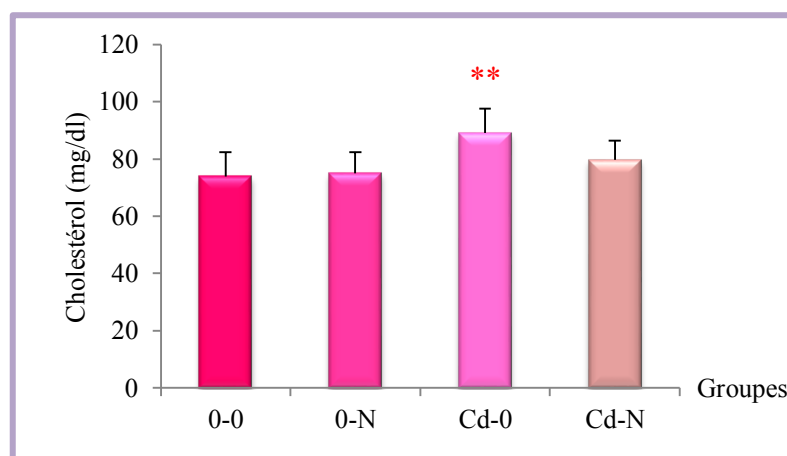


Figure 43: Variation du taux du cholestérol (mg/dL) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours.

5.4. Étude des paramètres du stress oxydant

5.4.1. Influence du traitement sur la teneur tissulaire en glutathion et le malondialdéhyde hépatique :

Le traitement par le cadmium a donné une diminution significative du glutathion tissulaire dans tous les organes étudiés en comparant aux témoins. En revanche, chez ces mêmes rats le taux du MDA hépatique a augmenté significativement. L'addition de la nigelle dans l'alimentation des rats intoxiqués (Cd-N) a diminué l'effet toxique du cadmium en amenant les taux de glutathion et du MDA à la normale par rapport aux rats témoins (tableau 17; figure 44-52).

Tableau 17: Taux de glutathion tissulaire (nM/mg prot) et du malondialdéhyde hépatique (nM/mg tissu) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours (chaque valeur représente la moyenne \pm SD de 10 rats)

Paramètres	Lots expérimentaux			
	(0-0)	(0-N)	(Cd-0)	(Cd-N)
GSH hépatique	90,19 \pm 5,08	100,24 \pm 2,18	50,49 \pm 3,94***	76,68 \pm 3,55*
GSH rénal	68,78 \pm 4,78	63,33 \pm 6,16	45,80 \pm 5,02***	56,40 \pm 4,28*
GSH splénique	28,59 \pm 3,95	24,10 \pm 2,18	18,05 \pm 1,53**	25,64 \pm 3,67
GSH cardiaque	63,41 \pm 3,68	65,30 \pm 4,68	58,45 \pm 3,05*	61,85 \pm 5,10
GSH intestinal	43,78 \pm 2,50	41,87 \pm 2,67	36,60 \pm 2,40***	36,23 \pm 2,78*
GSH testiculaire	25,20 \pm 2,33	26,00 \pm 3,82	21,60 \pm 1,10*	26,70 \pm 2,30
GSH épидидymaire	26,35 \pm 2,42	25,42 \pm 1,65	22,18 \pm 2,25*	24,13 \pm 3,56
GSH surrénale	15,37 \pm 2,29	14,83 \pm 2,06	13,89 \pm 1,54	14,30 \pm 3,10
MDA hépatique	37,00 \pm 1,60	32,43 \pm 2,09	63,09 \pm 5,12***	53,58 \pm 3,21**

* (P < 0,05); ** (P < 0,01); *** (P < 0,001): différence significative par rapport aux témoins

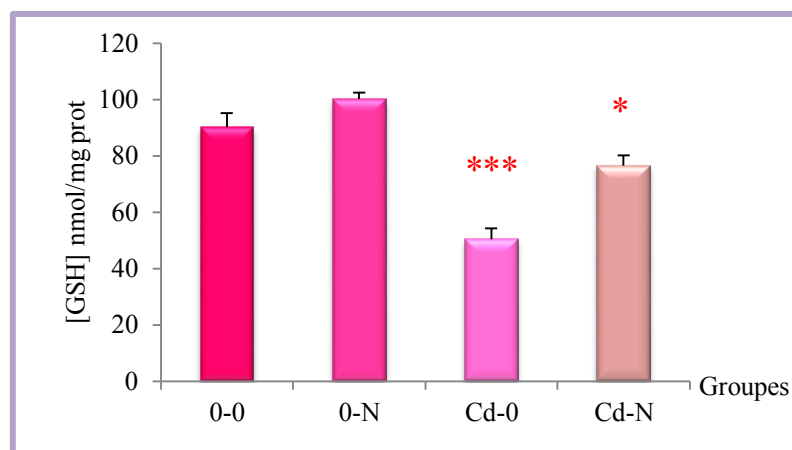


Figure 44: Variation du taux de glutathion hépatique (nM/mg prot) chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours.

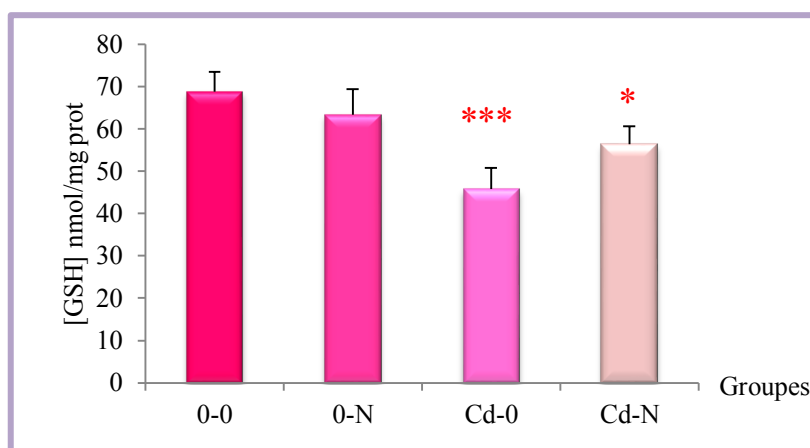


Figure 45: Variation du taux de glutathion rénal chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours.

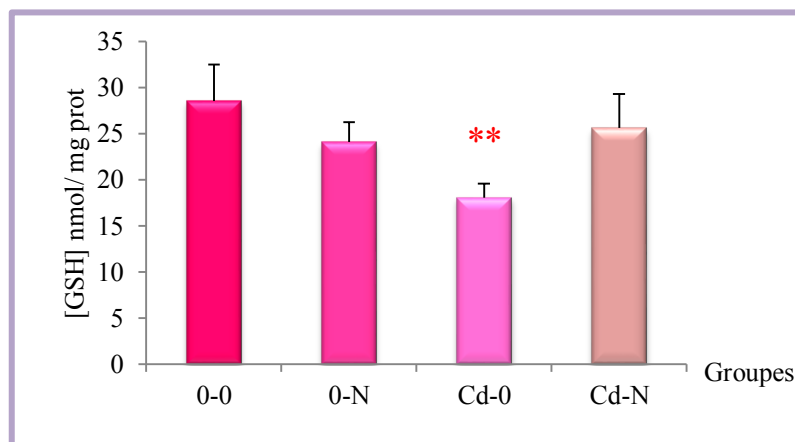


Figure 46: Variation du taux de glutathion splénique chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours.

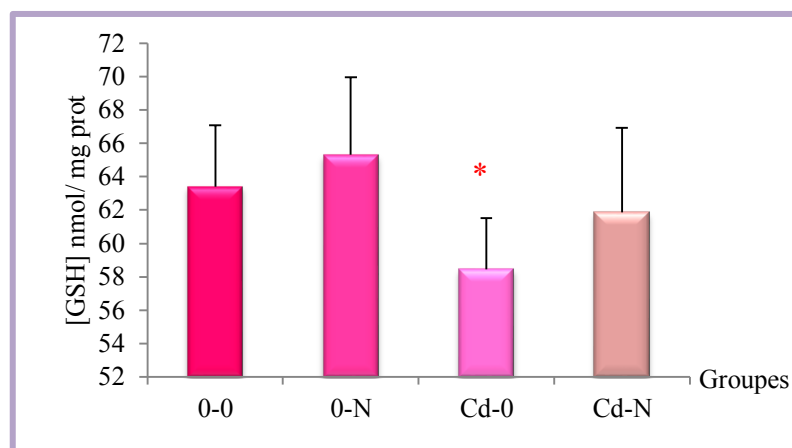


Figure 47: Variation du taux de glutathion cardiaque chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours.

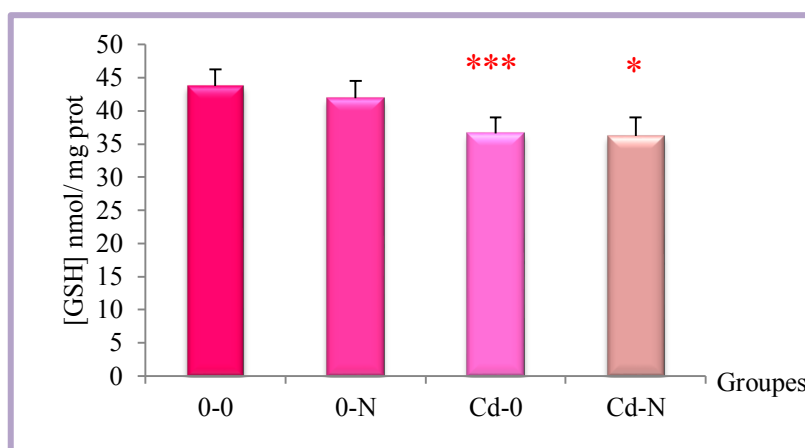


Figure 48: Variation du taux de glutathion intestinal chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours.

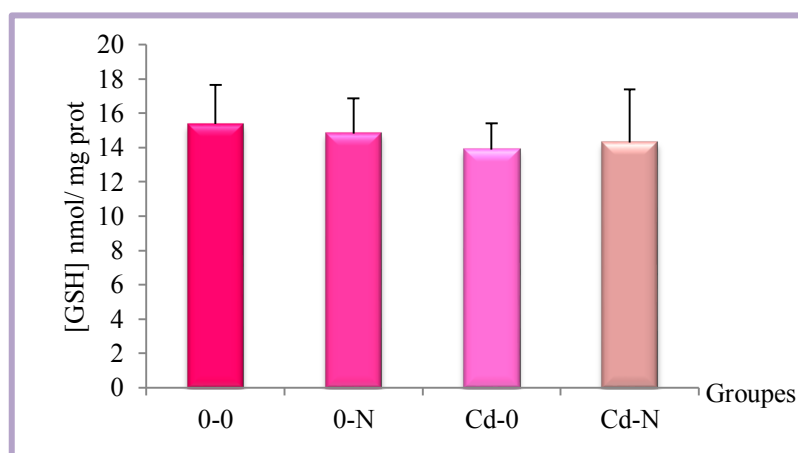


Figure 49: Variation du taux de glutathion surrénale chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours

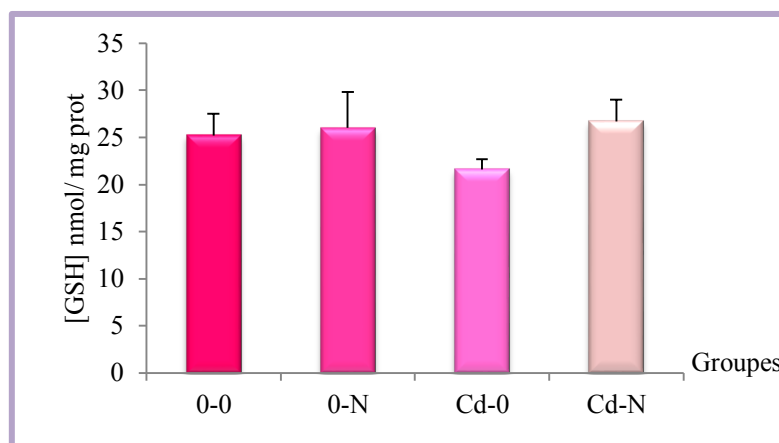


Figure 50: Variation du taux de glutathion testiculaire chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours

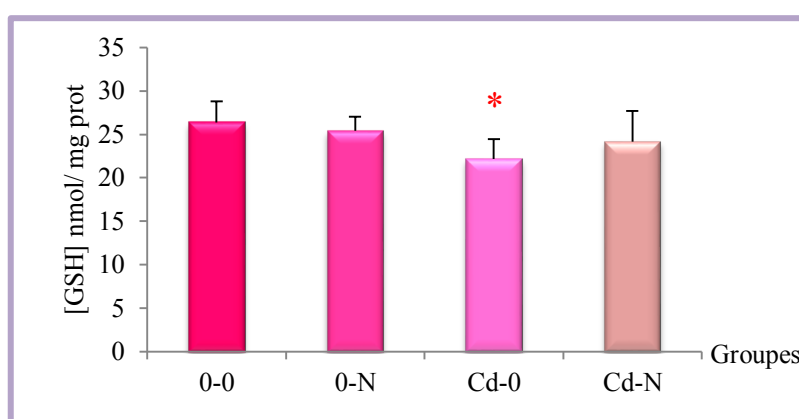


Figure 51: Variation du taux de glutathion épидидymaire chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours.

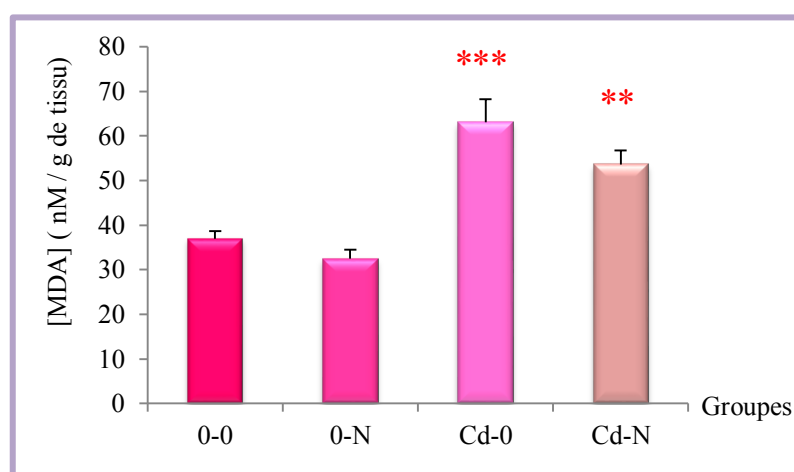


Figure 52: Variation du taux de MDA (nM/ g de tissu) hépatique chez les rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et la nigelle pendant 30 jours.

5.4.2. Influence du traitement sur l'activité des enzymes antioxydantes (GSH-Px, GSH-ST et CAT)

Le dosage des enzymes antioxydantes (GSH-Px, GSH-ST et CAT) a été effectué au niveau du tissu hépatique. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 18 et les figures 53-55. Au regard de ces résultats, nous avons remarqué l'absence de différences significatives entre le lot nourri par la nigelle (N-0) et le lot témoin (0-0). En revanche, le traitement des rats par le cadmium a induit une perturbation de l'activité des enzymes dévoilée par une diminution significative de la GSH-Px et la CAT, associée avec une augmentation significative de la GSH-ST. Ce dérèglement de l'activité enzymatique de toutes les enzymes antioxydantes a été moins noté lors de l'association de la nigelle et le cadmium (Cd-N) comparativement avec le groupe des rats témoins.

Tableau 18: Activité des enzymes antioxydantes dans le foie des rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et la nigelle pendant 30 jours (chaque valeur représente la moyenne \pm SD de 10 rats)

Paramètres	Lots expérimentaux			
	(0-0)	(0-N)	(Cd-0)	(Cd-N)
GSH-Px (μM GSH/mg prot)	0,71 \pm 0,13	0,65 \pm 0,09	0,35 \pm 0,13***	0,59 \pm 0,10*
GSH-ST (nM GSH/min/mg prot)	0,15 \pm 0,02	0,17 \pm 0,01	0,30 \pm 0,04***	0,18 \pm 0,02*
CAT (μM H ₂ O ₂ /min/mg prot)	25,79 \pm 2,05	27,66 \pm 3,46	22,13 \pm 1,04**	23,58 \pm 3,05*

* (P < 0,05); ** (P < 0,01); *** (P < 0,001): différence significative par rapport aux témoins.

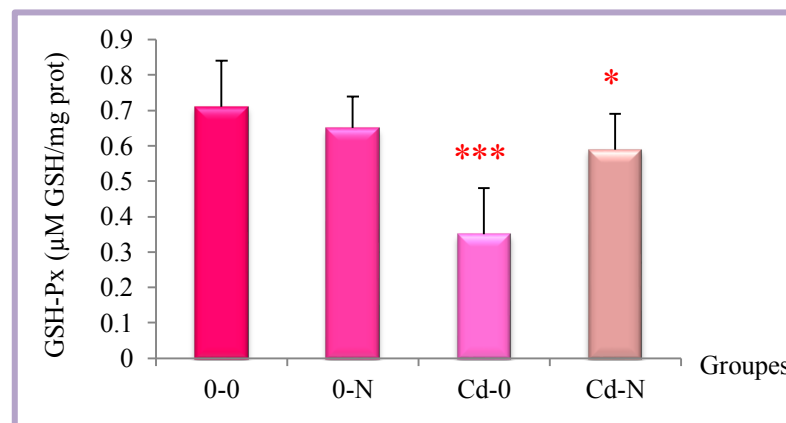


Figure 53: Variation de l'activité enzymatique de la GSH-Px (μM GSH/mg prot) dans le foie des rats témoins et traités.

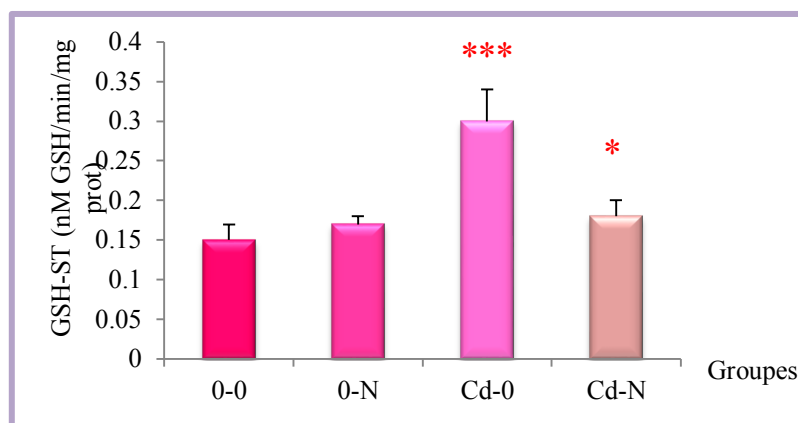


Figure 54: Variation de l'activité enzymatique de la GSH-ST (nM GSH/min/mg prot) dans le foie des rats témoins et traités

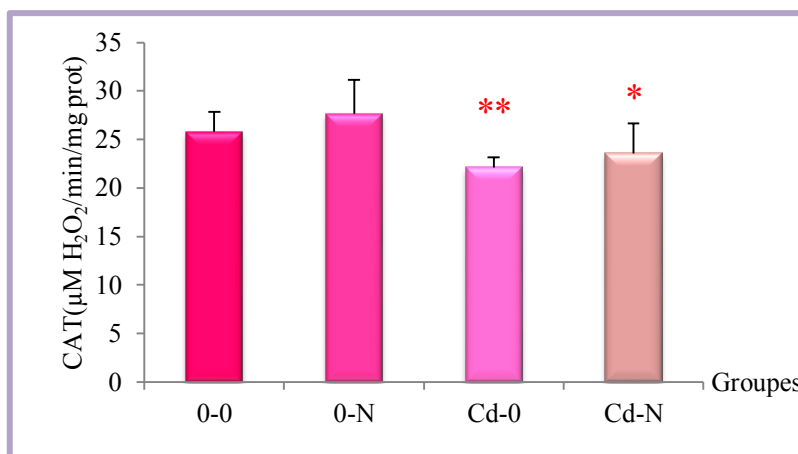


Figure 55: Variation de l'activité enzymatique de la CAT (µM H₂O₂/min/mg prot) dans le foie des rats témoins et traités

5.5. Etude histologique

5.5.1. Etude histologique hépatique

L'observation microscopique des coupes histologiques hépatiques des rats révèle une structure normale du foie des rats nourris par la nigelle similaire à celle des témoins. Cependant, il a été observé au niveau du lot exposé au cadmium (Cd-0) des dégénérescences hépatocellulaires avec altération sévère de l'architecture du foie et une dilatation du Parenchyme. Les dommages sévères du foie ont radicalement diminué lorsque la nigelle a été additionnée dans l'alimentation du lot (Cd-N).

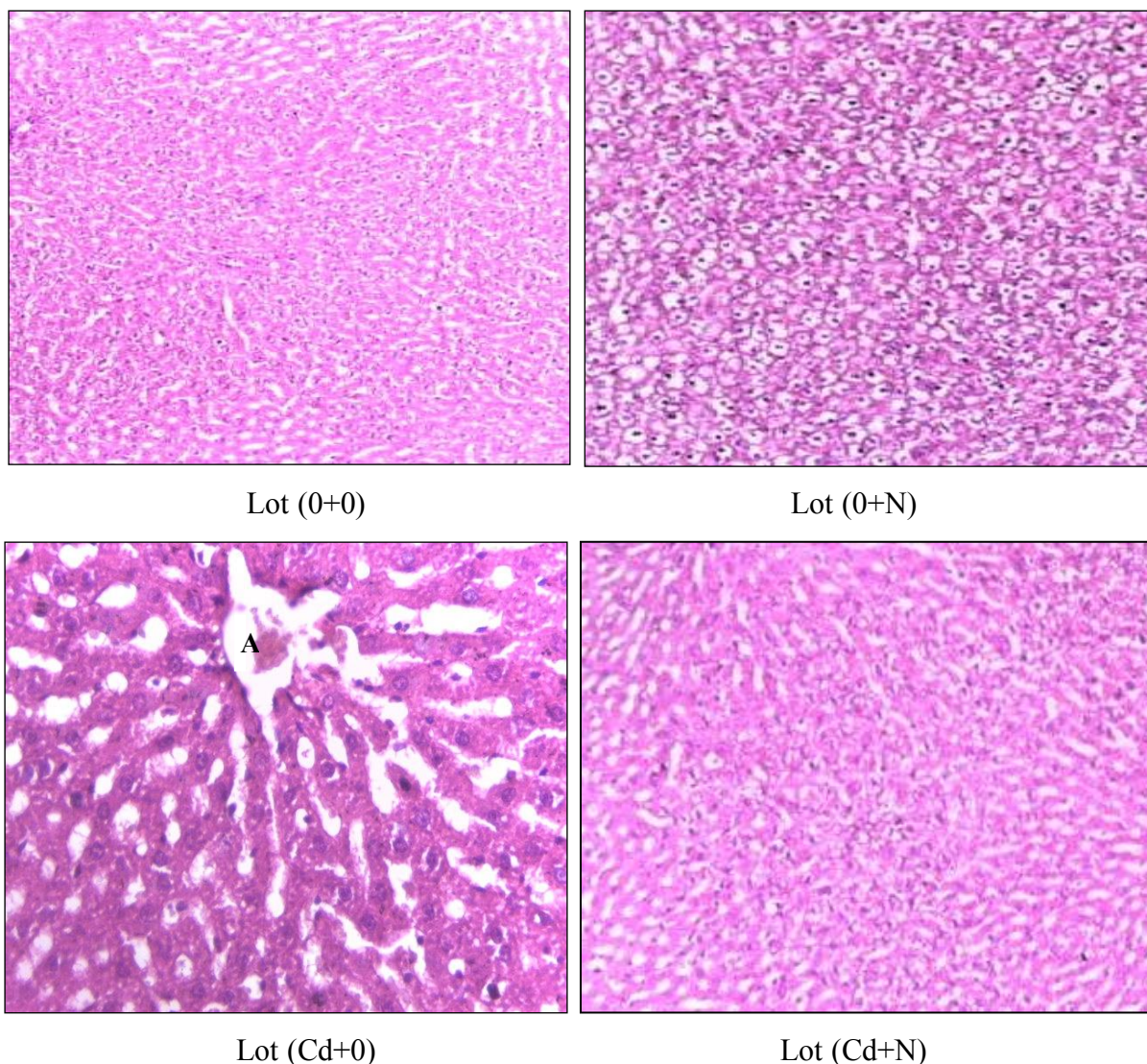


Figure 56: Coupes histologiques du foie des rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours. *A* : Dilatation du parenchyme. [*G x 100* (Cd+0), *G x 100* (0+0); (0+N); (Cd-N)].

5.5.2. Etude histologique rénale

L'observation microscopique des coupes histologiques rénales des rats du groupe nourris par la nigelle (0+N) a montré un tissu rénal avec des zones corticales et médullaire normales identique à celle des rats témoins. En revanche, le tissu rénal des rats exposés au cadmium (Cd+0), montrait une dégénérescence tubulaire considérable avec une atteinte glomérulaire, une vacuolisation dans les cellules épithéliales des tubules proximaux. En outre, une diminution de la congestion des vaisseaux sanguins, montrant un grand espace de Bowman. L'examen microscopique a révélé des lésions pathologiques induites par le cadmium, qui été

remarquablement réduites par l'administration de la nigelle dans le régime alimentaire chez le groupe (Cd-N).

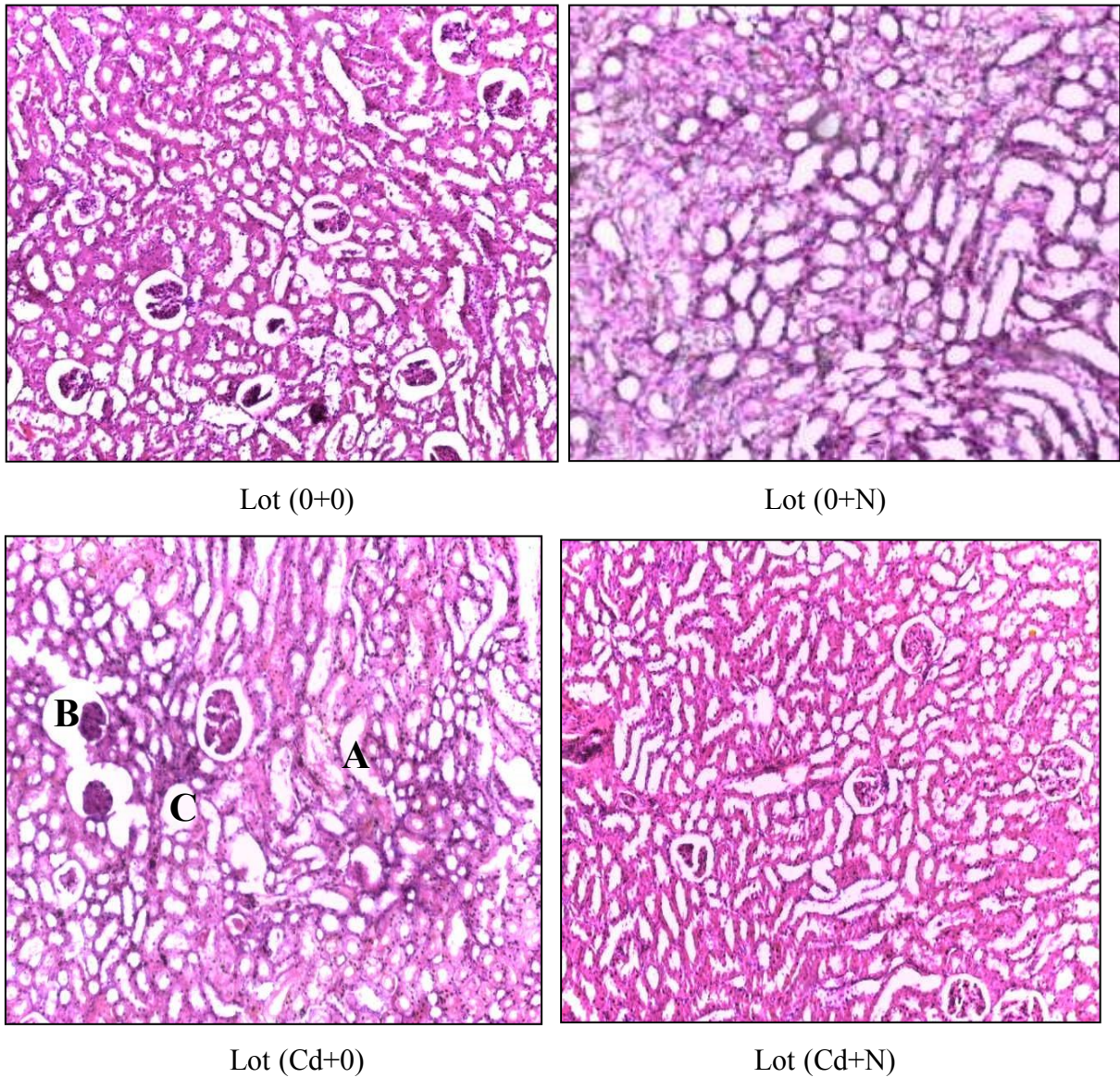


Figure 57: Coupes histologiques du rein des rats témoins et traités par le chlorure de cadmium et/ou la nigelle pendant 30 jours. [G x 200]. A :Dilatation; B :grand espace de Bowman ; C : Vacuolisation.

Chapitre 6 :
Discussion

6. Discussion

La pollution environnementale par les substances toxiques telles que les métaux lourds est un problème qui touche tous les pays du monde. Les effets de la pollution sur la santé humaine peuvent parfois se faire sentir très loin de la source de pollution (Johnson, 2008). Ces éléments, par nature non biodégradables, présentent une forte écotoxicité et pourraient être impliqués dans de nombreuses pathologies (atteintes du système nerveux central, du foie, des reins, mais aussi cancers et malformations embryonnaires) (Abrahams, 2002; Adriano, 2001). La protection contre les métaux lourds est un problème qui n'a pas été résolu d'une manière satisfaisante jusqu'à présent. Les métaux de transition (cadmium, nickel, chrome, vanadium, etc.) peuvent agir comme des catalyseurs de la détérioration oxydative des macromolécules. Cela peut se produire par la formation d'espèces réactives d'oxygène, l'augmentation de la peroxydation lipidique, la diminution des groupements sulfhydriles et la lésion oxydative des tissus (Ménager *et al*, 2009). Nous avons tenté dans le cadre de cette étude, d'évaluer l'impact d'un polluant toxique (cadmium) sur des rats blancs et l'action protectrice possible d'une épice riche en antioxydants naturels (*Nigella sativa*) contre le stress oxydant induit par ce polluant.

Concernant les rapports organo-somatiques, nous avons remarqué une augmentation des rapports hépato-somatique, réno-somatique, spléno-somatique et cardio-somatique chez le groupe des rats traités par le cadmium (Cd-0). Ceci peut être expliqué, d'une part, par l'hypertrophie tissulaire de ces organes causés par ce métal et d'autre part, par l'accumulation intense du métal lui-même dans ces organes cible (Horiguchi *et al*, 1996; Messaadia *et al*, 2013). En revanche, la diminution des rapports gono-somatique et epididymo-somatique est due probablement aux effets des radicaux libres générés par le cadmium, où certains radicaux libres comme notamment $O_2^{\cdot-}$ et OH^{\cdot} ; qui sont des espèces très réactives capables de provoquer des dommages cellulaires par le biais de la peroxydation des lipides membranaires. Ceci est confirmé par les travaux de Rekha *et al* (2009) qui ont montré que l'administration du chlorure de cadmium (1 mg/kg pendant 30 jours) a diminué le poids des testicules. Des études plus au moins récente, ont expliqué l'atrophie testiculaire par la diminution du diamètre des tubes séminifères et le diamètre nucléaire de cellules de Leydig; L'épididyme est largement dépendant de la masse des tubes épидидymaires et le nombre des spermatozoïdes. La réduction observée dans le rapport épидидymo-somatique est peut être la cause d'une

atrophie des tubes épидидymaires et la diminution du nombre de spermatozoïdes dans la lumière de ces dernières (Fabjan *et al*, 2006).

L'addition de la nigelle dans l'aliment a entraîné une amélioration des rapports organo-somatiques des organes étudiés. Cette amélioration est due vraisemblablement à l'effet protecteur de la nigelle contre la toxicité de cadmium. Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par (Hawsawi *et al*, 2001; Zaoui *et al*, 2002a; Houcher *et al*, 2007; Meddah *et al*, 2009).

A la lumière de nos résultats, nous pouvons dire que la toxicité induite par le chlorure de cadmium a été exprimée par des modifications importantes des paramètres hématologiques précités. Globalement, il semble que l'effet de cadmium a entraîné une baisse des GB, GR, HB, HT, PLT, LY; cela peut révéler une anémie. Cette anémie est éventuellement liée avec la toxicité du cadmium qui induit l'hémolyse des globules rouges suite à la peroxydation lipidique de leurs membranes cytoplasmiques. Helal (2000) a expliqué que l'anémie pourrait être attribuée à la destruction des globules rouges et/ou probablement au ralentissement de l'hématopoïèse au niveau de la moelle osseuse. Hilmy *et al* (1986) ont également relevé que l'apparition de l'anémie peut être associée à quatre causes:

- ✓ une augmentation du volume plasmatique;
- ✓ une réduction de la concentration de cuivre sanguin qui exerce un rôle important dans l'érythropoïèse;
- ✓ une inhibition de la synthèse de l'hémoglobine;
- ✓ et une carence en fer.

Hounkpatin *et al* (2013) confirment que l'anémie augmente suite à une peroxydation des lipides de la membrane cellulaire des érythrocytes. La fonction essentielle des érythrocytes est d'assurer l'apport d'oxygène aux tissus grâce à l'hémoglobine. À cause de ce rôle primordial attribué à l'hémoglobine, le diagnostic de l'anémie est exact seulement lorsqu'il y a une diminution significative de la concentration en hémoglobine. Une baisse de l'hématocrite, du nombre d'érythrocytes ou du volume globulaire moyen ont une valeur diagnostique restreinte individuellement puisqu'il arrive que la concentration d'hémoglobine demeure constante malgré la variation d'un de ces paramètres (Zittoun *et al*, 1982).

Par ailleurs, l'administration de la nigelle dans le régime alimentaire a pu restaurer le statut hématologique dans ces valeurs normales. Bouasla *et al* (2014) a constaté qu'une faible dose d'extrait de nigelle a causé une amélioration du taux de l'hémoglobine, des plaquettes et des globules rouges. Une étude sur des souris et des rats a prouvé que le traitement avec l'extrait de nigelle améliore de manière significative la perturbation hématologique causée par le cisplatine (une drogue cytotoxique) (Rasouli-Hiq *et al*, 2016). Ces résultats sont en accord avec les études d'Ibraheim (2002). Plusieurs études chez les rats et les souris ont montré que les graines de la *Nigella sativa* pourraient avoir un effet protecteur contre certains produits toxiques (Badary *et al*, 2000; El Dakhkhny *et al*, 2000a). Effectivement, un extrait de la nigelle protège contre la chute du niveau d'hémoglobine et du nombre de leucocytes, quand les souris sont intoxiquées par 2 mg/kg de la cisplatine (*ip*) pendant 5 jours (Ali, 2009). Une étude biochimique *in vitro* a démontré que les huiles fixes des graines de la nigelle pouvaient inhiber la production de leucotriène B-4 et de thromboxane B-2 au niveau des liposomes, une inhibition de la peroxydation des lipides est augmenter la perméabilité membranaire des leucocytes (Ali, 2009).

La créatinine, l'urée et l'acide urique, sont des déchets produits par le métabolisme protéique. Ils sont éliminés par les reins, et utilisés généralement comme indicateur de la fonction rénale correcte. Lorsqu'une insuffisance rénale s'installe, les taux de ces paramètres augmentent, c'est ce que nous avons observé chez les rats traités par le cadmium (Cd+0), cette augmentation peut être due à une lésion dans les cellules épithéliales tubulaires proximales du rein et à une chute soudaine des taux de filtration glomérulaire (TFG) (Appenroth *et al*, 2001). Donc, l'augmentation de l'urée et de la créatinine chez les rats traités par le cadmium est due à son effet néphrotoxique (El-Demerdash *et al*, 2009). L'acide urique, produit final du catabolisme des bases purines (Delattre *et al*, 2009), est l'un des antioxydants hydrosolubles endogènes majeurs de l'organisme (Saka *et al*, 2011). Dans notre étude, l'augmentation de l'acide urique sérique est probablement expliquée par la dégradation intense du matériel génétique (ADN et ARN). Autrement dit, le taux élevé de l'acide urique circulant, peut être un indicateur de défense de la cellule contre les effets délétères des radicaux libres, l'organisme augmente alors la production des antioxydants endogènes parmi lesquels l'acide urique. Ce dernier prévient les modifications oxydatives des enzymes endothéliales et préserve la capacité de l'endothélium à méditer des dilatations vasculaires pour faire face au stress oxydant (Satarug et Moore, 2004). Il s'est avéré que les grains de nigelle puissent réduire de manière significative l'augmentation de la créatinine et de l'urée, après une

intoxication induite par l'aflatoxin B1 (Rasouli-Hiq *et al*, 2016). Saleem *et al* (2012) et Yaman et Balikci (2010) ont rapporté l'effet néphroprotecteur de l'huile de nigelle contre la néphrotoxicité induite par la gentamicine chez les lapins où cette huile a abaissé les valeurs de la créatinine sérique et de l'azote uréique sanguin, a diminué le score de nécrose tubulaire et empêché les changements dégénératifs dans les tissus rénaux.

Nos résultats indiquent qu'il n'y a aucun changement significatif des concentrations en glucose sérique dans les différents groupes de rats traités par rapport au groupe témoin. La perturbation du bilan hépatique exprimée par l'augmentation sérique des transaminases (ASAT et ALAT), de la PAL et de la LDH chez les rats intoxiqués par le cadmium (Cd+0), ceci pourrait résulter de l'hépatotoxicité qui mène à l'altération de la perméabilité de la membrane plasmique, facilitant donc la fuite des enzymes tissulaires vers le plasma (El-Demerdash *et al*, 2012). Ces résultats sont en accord avec les travaux d'Uyanik *et al* (2001), Murugavel et Pari (2005) chez les poulets et de Tandon *et al* (1992) chez les rats qui ont déclaré l'augmentation de ces enzymes. Plusieurs études ont montré que ces enzymes sanguines étaient fortement augmentées chez les poissons traités par le cadmium, le zinc et le cuivre (Atef et Attar, 2005). De Smet et Bulst (2000) ont rapporté que les concentrations d'acides aminés libres et les activités des protéases étaient augmentées dans les branchies, le foie et les reins de la carpe, *Cyprinus carpio* exposé au cadmium. Ils ont également observé une augmentation des activités d'ASAT et ALAT et ils ont suggéré que la protéolyse observée est destinée à augmenter le rôle de la protéine dans la production d'énergie pendant le stress au cadmium.

En outre, Pour l'évaluation des lésions hépatiques, ces enzymes sont principalement utilisées et peuvent être trouvée dans le cytosol et tout dommage libère l'enzyme dans la circulation sanguine et donc il est déterminable. Des quantités accrues de ces enzymes sont des indices de déversement cellulaire et la perte d'intégrité fonctionnelle des membranes cellulaires dans le foie (Shalini *et al*, 2017). L'augmentation sérique des enzymes peut être due à des lésions tissulaires dans le foie, les reins et le cœur suite à des modifications de la perméabilité de la membrane cellulaire, ou également due à une augmentation de la synthèse ou de la diminution de la destruction des transaminases (Krim *et al*, 2013). L'ASAT, l'ALAT, la LDH et la PAL sont les biomarqueurs les plus sensibles qui sont directement impliqués dans l'étendue de la toxicité et des dommages cellulaires puisqu'ils sont cytoplasmiques et libérés immédiatement

dans la circulation sanguine après l'atteinte cellulaire (Farag *et al*, 2010). Nos résultats sont en accord avec ceux de Sogawa *et al* (2001), Hussain *et al* (2013; Predes *et al* (2014).

Plusieurs études antérieures ont montré l'effet hépato protecteur de la thymoquinone (composant bioactif de la nigelle) qui a fait diminuer les taux d'ALAT et de PAL au niveau d'hépatocytes isolés et oxydés par le l'hydroperoxyde de tertbutyle (TBHP) (Soudani *et al*, 2011). Ces résultats concordent d'ailleurs avec ceux de Rooney et Ryan (2005b) et Mahmoud *et al* (2002). Une recherche étudiant l'effet de différents composants d'extraits de la nigelle (thymoquinone, *p*-cymène, α -pinène) sur l'hépatotoxicité induite par le CCl₄ chez les rats, a montré que seule la thymoquinone a un effet hépatoprotecteur (El-Dakhakhny *et al*, 2000b). Des résultats similaires ont été obtenus par Gani et John (2013) car ils ont constaté l'absence d'effets toxiques négatifs de l'extrait de la nigelle dans le foie. Ces résultats ont suggéré la possibilité que l'extrait de *N. sativa* puisse protéger les tissus du foie et diminuer ainsi la fuite des enzymes (AST, ALT et ALP) dans la circulation sanguine. Néanmoins, des études faites par Hadi *et al* (2016) ont effectué un essai clinique pour évaluer les effets antioxydants de l'huile de la nigelle chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (RA). L'huile a été suggérée pour jouer un rôle contre les altérations causée par une infection à *S. mansoni*, un effet qui peut être induit en partie par l'amélioration du système hôte immunologique et dans une certaine mesure par son effet antioxydant (Mahmoud *et al*, 2002). D'après les résultats obtenus, l'administration concomitante de la nigelle et du cadmium (Cd-N) a réduit de manière significative l'activité enzymatique de l'ALAT, L'ASAT, la LDH et la PAL. Cela révèle la capacité de la nigelle administrée simultanément avec le cadmium d'atténuer les lésions hépatiques induites par ce dernier.

Par ailleurs d'après nos résultats, l'exposition au cadmium modifie le profil lipidique. En effet, notre étude a montré que les taux plasmatiques du cholestérol et des triglycérides sériques étaient significativement augmentés chez les rats traités par le cadmium (Cd+0). Cette augmentation est due à la dégradation des tissus adipeux de l'organisme (Cempel et Janicka, 2002), et qui peut être due à un stress oxydatif induit par le cadmium conduisant à un niveau élevé d'hydroperoxydes lipidiques (LOOH), à une faible activité paraoxonase, ainsi, la toxicité du cadmium provoque une perturbation du métabolisme lipidique en plus de la perturbation des taux de cytokines pro-inflammatoires (Olusegun *et al*, 2012). Des taux élevés de triglycérides sont associés à l'athérosclérose et sont souvent prédisposés aux maladies cardiovasculaires. On constate également que l'hypertriglycéridémie en elle même n'est habituellement pas

symptomatique mais peut être associée à des xanthomes (Berglund *et al*, 2012). En outre, les taux élevés de cholestérol-LDL favorisent les problèmes de santé et les maladies, ils sont souvent appelés mauvais cholestérol par opposition aux particules de cholestérol-HDL, qui sont appelés bon cholestérol (Superko *et al*, 2002; Barter *et al*, 2007). Les particules de HDL sont capables d'éliminer le cholestérol de l'intérieur de l'artère et de le transporter vers le foie pour l'excrétion ou la réutilisation. Ceux qui ont des niveaux plus élevés de cholestérol-HDL semblent avoir moins de problèmes avec les maladies cardiovasculaires, tandis que ceux qui ont un faible taux de cholestérol-HDL ont augmenté les taux de maladie cardiaque (Clark et Pierce, 2000).

Ainsi, des niveaux élevés des fractions LDL et VLDL du cholestérol peuvent également être désignés comme athérogènes (Pratik K *et al*, 2013). Cette propriété athérogène de la LDL est en partie le résultat de sa modification oxydante car l'absorption de lipoprotéines oxydées (LDL ox) a été identifiée comme la principale cause de formation de cellules de mousse (Olusegun *et al*, 2012). Il existe un certain nombre de rapports indiquant que les polluants (cadmium, plomb et mercure) influent sur la fonction thyroïdienne. Car la sécrétion thyroïdienne diminuée augmente fortement le taux de triglycérides dans le sang, l'hypertriglycéridémie observée peut être due à une hypothyroïdie induite par le cadmium et / ou une dysfonction hépatique, car le foie est le principal centre du métabolisme lipidique (Atef et Attar, 2005).

L'augmentation de la concentration sérique de cholestérol peut également résulter de la capacité du cadmium à diminuer son absorption par les macrophages qui jouent un rôle important dans le traitement du cholestérol (Ramirez et Gimenez, 2002). De plus, le cadmium peut contribuer au développement de l'hyper-cholestérolémie en augmentant la production de cytokines inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) et l'interleukine 1β (IN- 1β) dans le cœur (Harstad et Klaassen, 2004). Plusieurs études ont également montré que les cytokines sont impliquées dans l'augmentation des taux sériques de triglycérides et de la production de VLDL en stimulant la lipogénèse hépatique et en supprimant l'oxydation des acides gras (Milton *et al*, 2013). Ce résultat concorde d'ailleurs avec ceux de Murugavel et Pari (2007), Larregle *et al* (2008) et de Rogalska *et al* (2009).

Ce désordre est réduit chez le groupe des rats intoxiqués par le cadmium et nourri avec un régime associant la nigelle (Cd-N), autrement dit les concentrations sériques des paramètres

lipidiques sont stabilisées par l'addition de la nigelle. Une diminution significative du taux sérique de cholestérol, LDL et triglycérides, et une augmentation des HDL sériques, ont été observées chez des rats dont l'alimentation a été enrichie par l'huile de nigelle (Ali et Blunden, 2003; Kalus *et al*, 2003). L'effet hypo-triglycéridémique de la nigelle est peut être dû à son activité cholécérante telle que rapportée par El-Dakhakhany *et al* (2000). La fonction cholérétique de la nigelle est soit en réduisant la synthèse du cholestérol par les hépatocytes, soit en diminuant sa réabsorption fractionnée de l'intestin grêle (Qidwai *et al*, 2009). Bamosa *et al* (2002) étudient l'effet de la thymoquinone sur les taux sanguins de cholestérol, de triglycérides, de HDL et de LDL chez les rats albinos, après 4 jours de traitement intra péritonéale, l'hypo-cholesterolémique ainsi qu'un effet réducteur sur les triglycérides, HDL et LDL a été commencé. Al-Beitawi *et al* (2009) ont rapporté que le remplacement de la bacitracine par la nigelle écrasé dans les régimes de poulets de chair réduisait significativement le taux de cholestérol dans le sérum. Zaoui *et al* (2002b) ont rapporté que le cholestérol sérique, les triglycérides étaient significativement diminués chez les rats traités par l'huile de *N. sativa* (1 ml/kg) pendant 12 semaines). En effet, on sait que des niveaux élevés de triglycérides intracellulaires peuvent augmenter certains métabolites lipidiques tels que les céramides, le diacyl-glycérol et l'acyl-coenzyme A à chaîne longue (Ferré, 2007).

La présence des métaux lourds toxiques dans les organismes est source de radicaux libres provoquant le stress oxydatif (Farombi *et al*, 2007; Yildirim *et al*, 2011; Mélila *et al*, 2012). Le stress oxydant est une circonstance anormale dans laquelle sont placés les tissus de notre organisme lorsqu'ils font face à un flux accru de radicaux libres et qu'ils n'arrivent plus à les piéger ou à détruire (Agrawal et Sharma, 2010). La génération d'espèces réactives de l'oxygène (anion superoxyde, radical hydroxyle, peroxyde d'hydrogène, oxyde nitrique) fait partie du métabolisme normal de la cellule. La chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie et les lysosomes génèrent ces espèces de manière constitutive (Nohl *et al*, 2004). Par contre, lors d'une contamination par le cadmium, il se crée un déséquilibre entre la génération de ROS et la production d'antioxydants (Ikediobi *et al*, 2004).

La cellule dispose pour sa protection d'un premier système antioxydant de défense le glutathion (GSH) porteur d'une fonction sulfhydrile (-SH). Grâce à cette fonction -SH libre, il se lie aux métabolites toxiques. Le GSH joue son rôle antioxydant également en synergie avec les enzymes antioxydantes telles la glutathion peroxydase, la catalase et le superoxyde dismutase (Cempel et Janicka, 2002). De plus, le GSH peut réagir avec le H₂O₂ et les

peroxydes lipidiques par l'action de glutathion peroxydase (GSH-Px) pour éliminer les intermédiaires réactifs par la réduction des hydroperoxydes (Davis *et al*, 2001). Le glutathion est le plus abondant thiol de basse masse moléculaire, il agit comme un antioxydant physiologique de protection dans des systèmes biologiques (Fatima et Mahmood, 2007). De même, le GSH est un élément crucial du mécanisme de défense antioxydante, fonctionne comme un piègeur de radicaux libres réactifs direct (Romão *et al*, 2006; Wu *et al*, 2012).

Après le traitement des rats par le cadmium, le taux du glutathion est nettement diminué dans tous les tissus étudiés suite probablement à sa participation aux réactions de neutralisation des radicaux libres générés par le cadmium (Hansen *et al*, 2006). Cette déplétion peut être due à une diminution de la biosynthèse du glutathion ou à une augmentation de son oxydation au cours du stress oxydant causé par le cadmium. Comme les métallothionéines, le glutathion réduit (GSH) peut lier le cadmium et empêcher son interaction néfaste avec les cibles cellulaires. De plus, le cycle rédox du glutathion (GSH), qui fait intervenir la glutathion peroxydase (GSH-Px) et la glutathion réductase (GSH-R), joue un rôle important dans la détoxification des ROS générés par le cadmium. En effet, une augmentation de la synthèse de GSH permet de protéger la cellule de la toxicité du cadmium (Eneman *et al*, 2000). La diminution du GSH peut s'expliquer par le fait que devant ce type de toxicité, le foie ne parvient pas à éliminer une concentration aussi accrue de métabolites toxiques (Kojima *et al*, 2000). Nos résultats sont en accord avec les résultats obtenus par Mah et Jalilehvand (2010), qui ont montré une diminution significative du taux du GSH rénal des rats traités par un complexe de cadmium. Aussi, l'administration du chlorure de cadmium a causé une diminution du taux de GSH hépatique qui provoque une grave altération du statut redox des cellules hépatiques attestées par un déséquilibre entre la génération d'ERO et la production d'antioxydants. Il en résulte que le GSH joue un rôle clé dans la détoxification et que la nécrose hépatique est produite lorsque les réserves en GSH sont épuisées (Ozden *et al*, 2009). Une déplétion en GSH au niveau du tissu cardiaque a été aussi observée. Les mêmes constatations ont été faites par Morales *et al* (2006) qui ont démontré une diminution significative du taux du GSH cardiaque chez les rats, après le traitement avec le cadmium (5 mg/kg) pendant 4 semaines.

Le traitement par le cadmium associé à la nigelle (Cd+N) a montré une amélioration importante où le taux du GSH revient presque à la normale. Plusieurs études sur les rats et les souris ont montré que la nigelle peut avoir un effet cytoprotecteur contre certains produits

toxiques (Badary *et al*, 2000; Rasouli-Hiq *et al*, 2016). Chez le rat, il a été aussi démontré que la thymoquinone protège les hépatocytes isolés de foie de rat contre la toxicité induite par l'hydroperoxyde du tertabutyl (TBHP), un agent toxique connu pour ses dégâts oxydatifs et la perte progressive du glutathion intracellulaire qu'il provoque (Soudani *et al*, 2011). Salem (2005) a montré que l'huile de nigelle augmente le taux du glutathion et le système de défense antioxydant au niveau du cortex rénal, de façon dose-dépendante ce qui implique une protection contre la néphrotoxicité. Néanmoins, des études montrées que *N. sativa* possède une excellente activité antioxydante en réduisant les concentrations élevées de MDA, en augmentant la teneur réduite en GSH et en SOD dans les cellules cardiaques (Labib *et al*, 2009; Meral *et al*, 2001). Ainsi, une amélioration de l'activité du système antioxydant et une protection contre la peroxydation des lipides et l'endommagement hépatique ont été observés chez des lapins avec diabète mellitus induit par l'alloxane, après traitement par l'extrait aqueux des graines de *Nigella sativa* (Meral *et al*, 2001).

La peroxydation lipidique étant l'effet le plus anciennement connu des radicaux libres et le plus simple à mesurer, les dérivés de l'oxydation lipidique sont les composés les plus souvent étudiés lorsque l'on recherche un stress oxydant (Goudable et Favier, 1997). Le stress oxydant est caractérisé par la production des EOA qui induisent la peroxydation lipidique; et le malondialdéhyde (MDA) est un produit secondaire généré au cours de l'oxydation des acides gras polyinsaturés (Misra *et al*, 2009). La peroxydation lipidique contient une série de réactions en chaîne radicalaires libres et est également associée à plusieurs types de dommages biologiques. Le rôle des radicaux libres et des EOA est de plus en plus reconnu dans la pathogénèse de nombreuses maladies humaines, y compris le cancer, le vieillissement et l'athérosclérose (Gulcin *et al*, 2010). La peroxydation lipidique est aujourd'hui reconnue comme une réaction extrêmement importante dans les processus physiologiques et toxicologiques. Les hydroperoxydes lipidiques formés par l'attaque des radicaux libres sur les résidus d'acides gras polyinsaturés des phospholipides peuvent encore réagir avec les métaux redox (comme Fe^{2+} , Fe^{3+}), produisant finalement un malondialdéhyde (MDA) mutagène et cancérigène (Scibior *et al*, 2006). Dans notre étude, nous avons noté une augmentation significative de taux du MDA hépatique après l'administration du cadmium. Cette augmentation indiquant une peroxydation des lipides accrue. Il est bien connu que la peroxydation des acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires entraîne un déficit des fonctions membranaires, au travers notamment d'une diminution de la fluidité et de l'inactivation des récepteurs et enzymes situés au niveau des membranes (Michel, 2008).

Ceci peut alors participer à une modification de la perméabilité membranaire. Il est également possible que l'exclusion partielle du Cd résulte d'un changement de la capacité des parois cellulaires à se lier au métal ou d'une excrétion accrue de substances chélatrices comme rapporté par Ghosh et Singh (2005) et Kirkham (2006). Nos résultats sont devenus en accord avec Arreola-Mendoza *et al* (2009), qui a rapporté que, en raison des propriétés oxydatives de Cr^{6+} , son administration a conduit à une augmentation des lésions oxydatives dommageables visualisées par l'augmentation de la concentration rénale de malonaldéhyde corticale qui était évidente au 2^{ème} jour après traitement avec le dichromate de potassium (15 mg/kg). Ceux-ci indiquent que le métal tel que le chrome subit un cycle redox entraînant la production d'espèces réactives d'oxygène (Das, 2009). En conséquence de l'amélioration de la peroxydation lipidique et de l'altération de l'homéostasie du calcium et du sulfhydryle (Das *et al*, 2006). Aussi, il a été observé que la production excessive du MDA est certainement une fraction importante de l'action pro-oxydante exercée par le plomb et le cadmium. Par ailleurs, le rôle de ces deux métaux dans la surproduction du MDA a été signalé par certains auteurs (Moreira *et al*, 2001; Lopez *et al*, 2006; Valco *et al*, 2006). Ces deux métaux toxiques ont une affinité particulière pour le groupement sulfhydryle du GSH, ce qui peut engendrer un déséquilibre de la balance disulfure cellulaire (Belli *et al*, 2010).

Le glutathion (GSH) exerce son rôle en synergie avec les enzymes antioxydantes, parmi lesquelles figurent la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GSH-Px), la glutathion réductase (GSH-R), la glutathion S-transférase (GSH-ST) et la catalase (CAT). Sont les enzymes antioxydantes importantes qui sont efficaces à éliminer les radicaux libres toxiques générés par le stress oxydant (Ahanger *et al*, 2014; Wu *et al*, 2014; Abd_Allah *et al*, 2015). Dans notre travail, nous avons dosé la GSH-Px, la CAT et la GSH-ST dans le foie comme étant un organe cible spécialisé dans la détoxification. Les résultats de notre expérimentation ont montré une diminution claire de l'activité de la GSH-Px hépatique après le traitement des rats au cadmium. Nos résultats sont similaires à ceux obtenus dans une étude faite par Company *et al* (2004) qui ont également montré que l'exposition au cadmium provoque une diminution de l'activité de la CAT et de la GSH-Px accompagnée par une augmentation de la peroxydation lipidique dans les branchies. Une inhibition de la GSH-Px est observée aussi dans les branchies de la palourde *R. decussatus* exposée au cadmium (Geret *et al*, 2002).

La GSH-ST est une enzyme ayant un rôle important dans la détoxification des xénobiotiques et la protection contre les métabolites nocifs générés après la dégradation des macromolécules (Aouacheri *et al*, 2009). L'activité de la GSH-ST a également été largement utilisée comme un biomarqueur de stress oxydant (Shailaja et D'Silva, 2003; Cunha *et al*, 2007). L'évaluation biochimique de ces systèmes enzymatiques antioxydants a mis en évidence une augmentation significative de l'activité de la GSH-ST dans le foie des rats traités par le cadmium. Également, des études faites sur les poissons *G. affinis*, ont montré que l'augmentation de l'activité de la GSH-ST est hautement corrélée avec la diminution du taux de GSH, ce qui suggère que le xénobiotique conjugué par le GSH est catalysé par la GSH-ST pour réduire son effet toxique (Chouahda et Soltani, 2009; Zaidi et Soltani, 2011). Hoarau *et al* (2001) ont démontrés que l'augmentation de l'activité de la GSH-ST après le traitement par le cadmium est une forme de défense qui traduit la détoxification du xénobiotique dans l'organisme pour permettre son élimination. Des études similaires ont révélé une induction de la GSH-ST chez *P. viridis* exposé à différentes doses du cadmium, cuivre, plomb et au zinc (Rajkumar et John Milton, 2011), ainsi que chez *D. trunculus* pêché au niveau d'un site pollué (Amira *et al*, 2011; Soltani *et al*, 2012). En effets, le Cd provoque l'induction de la GSH-ST chez plusieurs espèces tels que les poissons d'eau douce: *Ch. punctatus* (Dabas *et al*, 2012), *G. affinis* (Chouahda et Soltani, 2009) et *R. quelen* (Pretto *et al*, 2011). De plus, la stimulation de l'activité de la GSH-ST a été observée par Won *et al* (2011) chez l'Annélide polychète *P. nuntia* après exposition au Cd, et aussi chez *L. acuta* subit au même traitement (Sandrini *et al*, 2008). La réponse de l'activité de la GSH-ST dépend de plusieurs facteurs comme le type de xénobiotique, la concentration, le temps d'exposition et de l'espèce (Oruç et Üner, 2000).

La catalase est une enzyme antioxydante impliquée dans la défense de la cellule contre les effets toxiques du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en catalysant sa décomposition en eau (H_2O) et oxygène moléculaire (O_2), c'est un biomarqueur de stress oxydatif (Almeida *et al*, 2007; Jebali *et al*, 2007). Cette fonction est partagée avec la GSH-Px qui a besoin de glutathion et de sélénium pour fonctionner correctement, en plus de son rôle principal dans l'élimination des peroxydes lipidiques (Valko *et al*, 2007). Les résultats de notre expérimentation ont montré une diminution de l'activité de la CAT. L'induction de l'activité spécifique de la CAT en corrélation avec le SOD constitue la première ligne de défense contre le stress oxydant (Asagba *et al*, 2008). Toutefois, une production accrue du peroxyde d'hydrogène peut excéder les capacités antioxydantes de cette enzyme, se traduisant par une inhibition de leur activité (Atli *et al*, 2006). De nombreuses études ont montré des changements de l'activité de la CAT

lors de l'exposition au Cd. Verlecar *et al* (2008) signalent que les métaux lourds (Cd, Cu, Pb, et Zn) peuvent induire une augmentation de l'activité CAT chez les bivalves. Une augmentation de la CAT a été observée dans les tissus de *P. viridis* exposé au cadmium, cuivre, zinc et au plomb (Rajkumar et John Milton, 2011) et dans la glande digestive de *R. decussatus* exposés aux effluents municipaux traités (Kamel *et al*, 2012), ainsi que chez *D. trunculus* pêché au niveau d'un site pollué (Amira *et al*, 2011). Nos résultats se conforment aussi aux études rapportée par plusieurs auteurs qui ont montré la diminution de l'activité de la CAT par exemple, chez le Poisson *E. danricus* traité avec le cuivre (Vutukuru *et al*, 2005), chez *G. affinis* exposé au pesticide chlorpyrifos (Kavitha et Venkateswara, 2008). Des résultats similaires ont été observés chez le poisson téléostéen *R. quelen* traité avec le Cd, l'activité enzymatique de la CAT au niveau du foie diminue après le 7^{ème} jour de restauration (Pretto *et al*, 2011). Plusieurs études confirment les mêmes constatations (Sandalio *et al*, 2001; Fornazier *et al*, 2002; Shim *et al*, 2003). La diminution observée de l'activité de CAT et de GSH-Px dans le foie suivant le traitement par le cadmium, pourrait être à cause de leur action indirecte à réduire les niveaux des espèces réactives d'oxygène, ce qui peut réduire le stress oxydant. L'administration *per os* de la nigelle suite à l'intoxication induite par le chlorure de cadmium (Cd-N), a rétabli la diminution de l'activité des enzymes antioxydantes et du glutathion rénal, et a apaisé l'augmentation de la peroxydation lipidique (Khan *et al*, 2003).

Dans notre étude, l'administration du chlorure de cadmium aux rats a provoqué des dommages oxydatifs accompagnés par des changements histologiques. Chez les rats traités par le cadmium, une altération notable de l'ultra-structure a été observée, ce qui pourrait être dû à la production excessive des radicaux libres. De plus, les résultats de l'étude histologique confirment les observations biochimiques constatées au niveau du foie et des reins. Ces altérations sont induites, au cours d'un stress oxydatif, par l'augmentation de la peroxydation des lipides. Il en résulte l'activation d'inflammations cellulaires et une dégradation des produits lipidiques (Milton Prabu *et al*, 2011). De nombreuses recherches ont démontré que les radicaux oxygénés libres sont à l'origine de ces altérations (Thevenod, 2003). Dans la littérature toxicologique, il est indiqué que le cadmium s'accumule principalement dans le foie et les reins, car ces organes sont très riches en métallothionéine (MT), il s'agit d'une protéine de liaison du métal présentant ainsi une forte affinité pour le cadmium (Wlostowski *et al*, 2000). Il a été signalé que l'exposition subchronique par voie orale du cadmium entraîne de multiples nécroses au niveau du foie associé à des changements de l'ultra-structure et des

altérations hépatiques (Milton Prabu *et al*, 2011), de dégénérescences des tubes rénaux ont été observés également chez rats traités aux différentes doses par voie orale au chlorure du cadmium (Obianime et Aprioku, 2009).

Des lésions rénales ont été également observées chez le rat résultant des effets de pression et de l'accumulation de Cd dans les reins. Une néphropathie induite par le cadmium, chez le rat, est caractérisée par des lésions tubulaires et glomérulaires. Les zones corticales du rein accumulent sélectivement du Cd qui est lié à des protéines de faible poids moléculaire donnant naissance au complexe protéique "Cd-Thionéine". Il est suggéré qu'une atteinte du tube rénal est bien la caractéristique d'une néphropathie induite par le Cd (El Heni *et al*, 2008). Une étude récente a montré que l'injection de cadmium chez le rat peut provoquer une élévation de l'activité de la rénine plasmatique ainsi qu'une hypertension (Il'yasova et Schwartz, 2005). Chez les rongeurs, les lésions rénales ou les transformations néoplasiques peuvent être induites par plusieurs autres métaux cancérigènes. Par exemple, le plomb induit des néoplasmes au niveau des cellules rénales tubulaires chez les souris et les rats (Waisberg *et al*, 2003). L'administration concomitante de la nigelle avec le chlorure de cadmium (Cd-N) a pu protéger la structure du tissu hépatique et rénal. Nos résultats suggèrent que la nigelle pourrait réduire les lésions hépatiques et rénales induites par le cadmium. Néanmoins, des études faites par Zaoui *et al* (2002a) ont examiné les effets biochimiques et histopathologiques possibles de l'huile fixe de *N. sativa* dans des rats Wistar-Kyoto. Dans une autre étude, Ali (2004) a évalué la capacité de l'huile de la nigelle à améliorer la néphrotoxicité associée à la gentamicine, un antibiotique, chez le rat. L'injection intramusculaire de gentamicine a été associée à un dommage tubulaire proximal, des signes histo-pathologiques et biochimiques de néphrotoxicité.

Étant donné que la graine de nigelle étudiée peut être facilement incorporée et consommée par les humains, un apport régulier de la nigelle peut être suggéré pour renforcer le statut antioxydant, qui à son tour permettra de réduire les dommages oxydatifs dans les tissus vivants.

*Conclusion et
perspective*

Conclusion et perspectives

Notre projet d'étude vise à évaluer d'une part le potentiel toxique d'un contaminant à usage agricole, le chlorure de cadmium et d'autre part montrer les effets bénéfiques du *Nigella sativa*. L'administration du chlorure de cadmium à 5 mg/kg per os aux rats pendant 30 jours a provoqué une perturbation métabolique révélée par l'apparition des atteintes de la fonction rénale, hépatique, hématologique, ainsi que le profil lipidique. Cette perturbation est associée à une altération structurale du foie et des reins. De plus, il est responsable de l'apparition d'importants remaniements induisant par un stress oxydatif qui perturbent les systèmes enzymatiques de détoxification et les capacités défensives de l'organisme. Les résultats obtenus peuvent être résumés dans les points suivants :

- ✚ L'étude physiologique montre que la croissance des rats n'a pas été influencée par le traitement. Cependant, une augmentation des indices hépato, réno, spléno et cardio-somatiques chez les rats traités par le cadmium a été enregistrée. L'association de la nigelle a amélioré ces changements.
- ✚ Le traitement par le chlorure de cadmium a induit une hématotoxicité, reflétée par une diminution significative des paramètres hématologiques (GR, GB, Hb, HT, PLT, LY). L'addition de la nigelle a amélioré les changements hématologiques, en témoignant l'effet protecteur de cet ingrédient alimentaire.
- ✚ Une perturbation du métabolisme biochimique après le traitement par le cadmium a été révélée par l'augmentation des taux sériques en : urée, créatinine, acide urique, cholestérol, triglycérides, ainsi que l'augmentation de l'activité enzymatique des : ASAT, ALAT, LDH et PAL. La supplémentation de la nigelle a considérablement réduit cette perturbation, ceci montre son effet protecteur.
- ✚ Les rats soumis au cadmium développent une augmentation du taux tissulaire de MDA et de la GSH-ST, diminution de l'activité enzymatique de la GSH-Px et la CAT et du taux de glutathion. Ces paramètres ont été équilibrés par la supplémentation de la nigelle.

- ✚ Les coupes histologiques réalisées sur des fragments de foie et de rein, permettent de confirmer l'effet cytoprotecteur de la nigelle par la restitution des hépatocytes, la régénération des glomérules et des tubules rénaux.

Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence l'action protectrice de la nigelle et sa capacité à moduler les effets toxiques causés par le cadmium.

Comme, perspective, il serait intéressant de compléter nos résultats par :

- ✓ Développer les dosages des bio marqueurs (Le rapport GSH/GSSG, GST, les radicaux libres, SOD, Vitamines C et E, ...).
- ✓ Déterminer le taux du cadmium dans le sang, les urines et quelques organes cibles.
- ✓ déterminer les composés actifs de la nigelle.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

A

- Abam E, Okediran BS, Odukoya OO, Adamson I, Ademuyiwa O.** Reversal of Ionoregulatory Disruptions in Occupational Lead Exposure by Vitamin C. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2008.
- Abd_Allah EF, Hashem A, Alqarawi AA, Alwathnani HA.** Alleviation of adverse impact of cadmium stress in sunflower (*Helianthus annuus L.*) by arbuscular mycorrhizal fungi. *Pak J Bot.* 2015; 47 (2): 785–795.
- Abdel-Wahhab MA, Aly SE.** Antioxidant property of *Nigella sativa* (black cumin) and *Syzygium aromaticum* (glove) in rats during aflatoxicosis. *Journal of Applied Toxicology.* 2005; 25: 218-223.
- Abilés J, Moreno-Torres R, Moratalla G, Castaño J, Abúd RP, Mudarra A, Machado MJ, Planells E, Pérez de la Cruz A.** Efectos de la suplementación con glutamina sobre el sistema antioxidante y la peroxidación lipídica en pacientes críticos con nutrición parenteral. *Nutr Hosp.* 2008; 23 (4): 332- 339.
- Abrahams PW.** Soils: their implications to human health. *The Science of the Total Environment.* 2002; 291: 1-3.
- Abuja PM, Albertini R.** Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta.* 2001; 306: 1-17.
- Adriano DC.** Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability and risks of metals. 2nd Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg. 2001.
- Aebi H.** Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 121-126.
- Aggarwal BB, Kunnammakkara AB.** Molecular targets and therapeutic uses of spices, modern uses for ancient medicine. Singapore: World Scientific Publishing. 2009.
- Agrawal A, Sharma B.** pesticides induced oxidative stress in mammalian system. *Int J Biol.Med Res.* 2010; 1(3): 90-104.

- Ahanger MA, Tyagi SR, Wani MR, Ahmad P.** Drought tolerance: roles of organic osmolytes, growth regulators and mineral nutrients. In: Ahmad P, Wani MR. (Eds). *Physiological Mechanisms and Adaptation Strategies in Plants under Changing Environment*. 1st Edition. Springer Science and Business Media. 2014: 25– 56.
- Ahmad A, Husain A, Mujeeb M, Khan SA, Najmi AK, Siddique NA, et al.** A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: a miracle herb. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013; 3(5): 337- 352.
- Akbas SH, Yegin A, Ozben T.** Effect of pentylenetetrazol-induced epileptic seizure on the antioxidant enzyme activities, glutathione and lipid peroxidation levels in rat erythrocytes and liver tissues. *Clin Biochem*. 2005; 38(11): 1009-14.
- Aksoy A, Türkay S, Tuter T, Ustun G, Riva S, Secundo F.** Investigation of substrate selectivity of *Nigella sativa* seed lipase(s). Joint research project (1999-2001). CNR (Consiglio Nazionale delle Ricerche). Italy and Tubitak (Turkish Scientific and Technical Research Center), Turkey. 2001.
- Al-Ali A, Alkhawajah AA, Randhawa MA, Shaikh NA.** Oral and intraperitoneal LD₅₀ of thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa*, in mice and rats. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2008; 20 (2): 25-27.
- Al-Beitawi N, El-Ghousein SS, Nofal AH.** Replacing bacitracin methylene disalicylate by crushed *Nigella sativa* seeds in broiler rations and its effects on growth, blood constituents and immunity. *Livest Sci*. 2009; 125: 304-307.
- Algeciras-Schimmich A, Cook WJ, Milz TC, Saenger AK, Karon BS.** Evaluation of hemoglobin interference in capillary heel-Stick samples collected for determination of neonatal bilirubin. *Clinical Biochemistry*. 2007; 40: 1311 – 1316.
- Al-Hader A, Aqel M, Hasan Z.** Hypoglycemic effects of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds. *International Journal of Pharmacognosy*. 1993; 31: 96-100.
- Al-Hashem F, Dallak M, Bashir N, Abbas M, Elessa R, Khalil M, Al-Khateeb M.** *American Journal of Pharmacology and Toxicology*. 2009; 4 (3): 107-117.
- Ali Benhaddou Andaloussi.** Étude des propriétés antidiabétiques de *Nigella sativa* : sites d'action cellulaires et moléculaires. Thèse de Doctorat Université de Montréal Département de pharmacologie, Faculté de médecine. 2009.

- Ali BH, G Blunden.** Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytother Res.* 2003; 17 (4): 299-305.
- Ali BH.** The effect of *Nigella sativa* oil on gentamicin nephrotoxicity in rats. *Am J Chin Med* 2004; 32: 49-55.
- Aljabre SHM, Randhawa MA, Akhtar N, Alakloby OM, Alqurashi AM, Aldossary A.** Antidermatophyte activity of ether extract of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. *J Ethnopharmacol.* 2005; 101: 116-119.
- Almeida EA, DiasBainy AC, MeloLoureiro AP, MartinezRegina R, Miyamoto S, Onuki J, FujitaBarbosa L, MachadoGarcia CC, MansoPrado F, Eliza Ronsein G, Sigolo CA, Barbosa Brochini C, Gracioso Martins AM, Gennari de Medeiros MH, Di Mascio P.** Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comp Biochem Physiol A.* 2007; 146: 588–600.
- Al-Nassimi M.** La médecine moderne et la science du prophète (éd. 3^e édition). Damas: Acharika. 1984.
- Alqarawi AA, Abd_Allah EF, Hashem A.** Alleviation of salt-induced adverse impact via mycorrhizal fungi in *Ephedra aphylla* Forssk. *J Plant Interact.* 2014; 9 (1): 802–810.
- Al-Saleh IA, Billedo G, El-Doush II.** Levels of selenium, DL- α -tocopherol, DL- γ -tocopherol, all-trans-retinol, thymoquinone and thymol in different brands of *Nigella sativa* seeds. *Journal of Food Composition and Analysis.* 2006; 19: 167-175.
- Amira A, Sifi K , Soltani N.** Measure of environmental stress biomarkers in *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) from the gulf of Annaba (Algeria). *European Journal of Experimental Biology.* 2011; 1(2):7-16.
- Andersen O, Nielsen JB, Nordberg GF.** Nutritional interactions in intestinal cadmium uptake-possibilities for risk reduction. *Biometals.* 2004; 17: 543-547.
- Andreas GH, Oeggl K.** The oldest evidence of *Nigella damascena* L. (Ranunculaceae) and its possible introduction to central Europe. *Vegetation history and archaeobotany.* 2005; 14: 562-570.

- Antuono F, Hamaza K.** Composition of *Nigella sativa* and *Nigella damascene* from Egypt. *Planta medica*. 2002; 27: 142 -149.
- Aouacheri W, Saka S, Djafer R, Lefranc G.** Effet protecteur du diclofénac contre le stress oxydatif induit par la toxicité du paracétamol chez les rats. *Ann Biol Clin*. 2009; 67(6): 619-27.
- Appenroth D, Karge E, Kiessling G, Wechter WJ, Winnefeld K, Fleck C.** LLu-alpha, an endogenous metabolite of gamma- tocopherol is more effective against metal nephrotoxicity in rats than gamma tocopherol. *Toxicol. Lett*. 2001; 122: 255-265.
- Aramini JM, Hiraoki T, Ke Y, Nitta K, Vogel J.** Cadmium-113 NMR studies of bovine and human alpha-lactalbumin and equine lysozyme. *Journal of biochemistry*. 1995; 117: 623-628.
- Arreola-Mendoza L, Del-Razo LM, Mendoza-Garrido ME, Martin D, Namorado MC, Calderon-Salinas JV, Reyes JL.** The protective effect of alpha- tocopherol against dichromate induced renal tight junction damage is mediated via ERK1/2. *Toxicology Letters*. 2009; 15,191(2-3): 279-288.
- Arris sihem épouse chebira.** Etude expérimentale de l'élimination des polluants organiques et inorganiques par adsorption sur des sous produits de céréales/ Doctorat en Sciences en genie des procedes. 2008: 10-11.
- Asagba SO, Eriyamremu GE, Igberaese ME.** Bioaccumulation of cadmium and its biochemical effect on selected tissues of the catfish (*Clarias gariepinus*). *Fish Physiol. Biochem*. 2008; 34: 61–69.
- Atta MB.** Some characteristics of *nigella* (*Nigella sativa* L) seed cultivated in Egypt and its lipid profile. *Food Chemistry*. 2003; 83: 63–68.
- Atef M, Al-Attar.** Biochemical effects of short-term cadmium exposure on the freshwater fish, *oreochromis niloticus*. *J Biol Sci*. 2005; 5(3): 260-265.
- Atkinson J, Epand RF, Epand RM.** Tocopherols and tocotrienols in membranes: A critical review. *Free Radic Biol Med*. 2008; 44: 739–764.

Atli G, Alptekin IT, Ukel S, et al. Response of catalase activity to Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ in five tissues of freshwater fish oreochromis niloticus. *Comp Biochem Physiol C*. 2006; 143: 218-24.

ATSDR. Draft toxicological profile for cadmium. in atsd. agency for toxic substances and disease registry. 2008. [En ligne]. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp5.pdf> (consulté le 21/01/2015).

Audry S, Schafer J, Blanc G, Jouanneau JM. Fifty-year sedimentary record of heavy metal pollution (Cd, Zn, Cu, Pb) in the Lot River reservoirs (France). *Environ Pollut*. 2004; 132: 413-426.

Azzi A. Molecular mechanism of α -tocopherol action. *Free Radic Biol Med*. 2007; 43:16–21.

B

Badary OA, Abdel-Naim AB, Abdel-Wahab MH et al. The influence of thymoquinone on doxorubicin induced hyperlipidemic nephropathy in rats. *Toxicol*. 2000; 143: 219-226.

Badary OA, Gamal AM. Inhibitory effects of thymoquinone against 20-methylcholanthrene-induced fibrosarcoma tumorigenesis. *Cancer Detec Prev*. 2001; 25: 362-368.

Badary OA, Taha RA, Gamal El-Din AM, Abdel-Wahab MH. Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug Chem Toxicol*. 2003; 26: 87-98.

Badr-Eddine Abdesselam. Approche ethnopharmacologique de *Nigella sativa*: de ses utilisations traditionnelles ancestrales aux études cliniques actuelles de ses principes actifs. *Sci Pharm*. 2015.

Baillie JK, Bates MGD, Thompson AAR, Waring WS, Partridge RW, Schnopp MF, Simpson A, Gulliver-Sloan F, Maxwell SRJ and Webb DJ. Lowland subjects exposed to high altitude plasma antioxidant capacity in healthy endogenous urate production augments. *Chest*. 2007; 131: 1473-1478.

Bamosa AO, BA Ali, ZA Al-Hawsawi. The effect of thymoquinone on blood lipids in rats. *Indian J Physiol Pharmacol*. 2002; 46: 195-201.

- Bandyopadhyay M, Chakraborty R, Raychaudhuri U.** A process for preparing a natural antioxidant enriched dairy product (Sandesh). *LWT*. 2007; 40(5): 842-851.
- Barbalace JK inc.** Environmental Chemistry.com: Environmental, Chemistry & Hazardous Materials News, Careers & Resources, [En ligne].2012. <http://environmentalchemistry.com/yogi/periodic>. (Consulter le 15/09/2017).
- Barbier O, Jacquillet G, Tauc M, Cougnon M, Poujeol P.** Effect of heavy metals on, and handling by, the kidney. *Nephron Physiol*. 2005; 99: 105-110.
- Barouki R.** Stress oxydant et vieillissement. *Medecine/sciences*. 2006; 22(3): 266- 272.
- Barter P, Gotto AM, Maroni JC, Szarek J, Grundy MSM, Kastelein JP, Bittner V.** HDL Cholesterol, VLDL cholesterol and cardiovascular events. *New Engl. J. Med*. 2007; 357(13): 1301-1309.
- Belli N, Mesbah L, Chebab S, et al.** Stress oxydant induit par la coexposition au plomb et au cadmium: deux contaminants des eaux souterraines de Oued Nil (Jijel - Algérie). *Revue des Sciences de l'Eau*. 2010 ; 23(3): 289-301.
- Benkaci AF, Baaliouamer A, Meklati BY, Chemat F.** Chemical composition of seed essential oils from Algerian *Nigella sativa* extracted by microwave and hydrodistillation. *Flavour & Fragrance Journal*. 2007; 22: 148-153.
- Berglund L, Brunzell JD, Goldberg AC, et al.** Evaluation & treatment of hypertriglyceridemia: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012; 97 (9): 2969-2989.
- Berglund M, Akesson A, Bjellerup P, Vahter M.** MetalBane interactions. *Toxicol Letters*. 2000: 112-113, 219-225.
- Bernhoft RA .** Cadmium and its adverse effects on human health. *Indian J Med Res*. 2008; 128: 557-64.
- Bleys J, Miller ER, Pastor-Barriuso R, Appel LJ and Guallar E.** Vitamin mineral supplementation and the progression of atherosclerosis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *American J Clin Nutr*. 2006; 84(4): 880-887.

Bonnefont-Rousselot D, Thérond P, Beaudeau JL, Peynet J, Legrand A, Delattre J. Vieillesse et stress oxydant. Quels marqueurs potentiels. *Ann Biol Clin.* 2001; 59(4): 453-459.

Bonnefont-Rousselot D, Therond P, Delattre J. Radicaux libres et antioxydants. In : Delattre J, Durand G, Jardillier JC. Ed. *Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires*. Paris : Médecine-sciences Flammarion . 2003: 59-81.

Bouasla I, Bouasla A, Boumendjel A, et al .Nigella sativa oil reduces aluminium chloride-induced oxidative injury in liver and erythrocytes of rats. *Biol Trace Elem Res.* 2014; 162(1-3): 252-61.

Bourgou S, A Pichette, B Marzouk, J Legault. Bioactivities of black cumin essential oil and its main terpenes from Tunisia. *South African Journal of Botany.* 2009; 76: 210-216.

Boutier B, Boutier J, Chiffolleau F et al. Influence of the Gironde estuary outputs on cadmium concentrations in the coastal waters: consequences on the Marennes–Oléron bay (France). *Ocean Acta.* 2000; 23: 745-757.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-254.

Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL. Harrison's Principles of Internal Medicine. Volume 2. 15th Edition. McGraw-Hill. 2001.

Bruins M R, S Kapil, FW Oehme. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol Environ Safety.* 2000; 45: 198-207.

Burtis C, Ashwood E, Bruns D. Tietz textbook of clinical chemistry. 4th ed. Washington, DC: Saunders. 2005.

Bucolo G, David H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem.* 1973; 19(5): 476–482.

Burits M, Bucar F. Antioxidant activity of Nigella sativa essential oil. *Phytotherapy research.* 2000; 14: 323-328.

Burk RF. Selenium, an antioxidant nutrient. *Nutr Clin Care* . 2002; 5: 47-49.

C

- Carocho M, Ferreira IC.** A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol*, 2013; 51: 15-25.
- Carrière V, Chambaz J et Rousset M.** Intestinal responses to xenobiotics. Session 4: Xenobiotics and Gene Expression. *Toxicology in Vitro*. 2001: 373-378.
- Cempel M, Janicka K.** Distribution of nickel, zinc, and copper in rat Organs after oral administration of nickel (II) chloride. *Biol Trace Elem Res*. 2002; 90 (1): 215–226.
- Chamseddine A.** La curation par la graine noire d'après la sunna prophétique et la médecine antique et moderne (3e éd.). (A. Abboud, Trad.) Beyrouth: Dar-Al-Kotob Al-Ilmiyah. 2006.
- Chandel NS, Budinger GR.** The cellular basis for diverse responses to oxygen. *Free Radical Biology & Medicine*. 2007; 42: 165-174.
- Cheikh-Rouhou S, Besbes S, Hentati B, Blecker C, Deroanne C, Attia H.** *Nigella sativa* L: chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction. *Food Chemistry*. 2007; 101: 673-681.
- Chen Z, Wang K, Ai YW, Li W, Gao H, Fang C.** The effects of railway transportation on the enrichment of heavy metals in the artificial soil on railway cut slopes. *Environ Monit Assess*. 2014; 186 (2): 1039–1049.
- Chouahda S, Soltani N.** Impact du cadmium et du halofenozide sur les indices métriques des femelles adultes d'un poisson culiciphage, *Gambusia affinis*. *Science & Technologie C*. 2009; 29 : 9–14.
- Clarkson PM , Thompson HS.** Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr*. 2000; 72(2): 637-646.
- Clark TA, Pierce GN.** Cardiovascular complications of noninsulin-dependent diabetes. *J. Pharmacol Toxicol Methods*. 2000; 47: 1-10.

Comhair SAA, Erzurum SC .Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002; 283: 246 - 255.

Company R, Serafim A, Bebianno MJ, Cosson R, Shillito B, Fiala-Medioni A. Effect of cadmium, copper and mercury on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Mar Environ Res*. 2004; 58: 377-381.

Croteau MN, SN Luoma, AR Stewart. Trophic transfer of metals along fresh water food webs: Evidence of cadmium bio magnification in nature. *Limnol Oceanogr*. 2005; 50:1511–1519.

Curtin JF, Donovan M, Cotter TG. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J Immunol Methods* .2002; 265: 49-72.

Cunha I, Mangas-Ramirez E, Guilhermino L. Effects of copper and cadmium on cholinesterase and glutathioneS-transferase activities of two marine gastropods (*Monodonta lineata* and *Nucella lapillus*). *Comp Biochem Physiol C*. 2007; 145: 648–657.

D

Dabas A, Nagpure NS, Kumar R, Kushwaha B, Kumar P, Lakra WS. Assessment of tissue-specific effect of cadmium on antioxidant defense system and lipid peroxidation in freshwater murrel, *Channa punctatus*. *Fish Physiol Biochem*. 2012; 38: 469–482.

Das KK, Gupta AD, Dhundasi SA. Effect of L-ascorbic acid on nicked –induced alterations in serum lipid profiles and liver histopathology of rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2006; 17(1): 29-44.

Das KK. A comprehensive Review on nickel (II) and chromiumVI toxicities possible Antioxidant (*Allium Sativum* linn) defenses. *Al- Ameen J Med Sci*. 2009; 2(2):43-50.

Davis WJr, Ronai Z, Tew KD. Cellular thiols and reactive oxygen species in drug induced apoptosis .*J Pharmacol Exp Ther*. 2001; 296(1): 1-6.

Deaton CHM, Marlin DJ. Exercise-associated oxidative stress. *Clin Tech Equine Pract*. 2003; 2(3) : 278-291.

- DeForest DK, KV Brix, WJ Adams.** Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: The inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration. *Aquatic Toxicology*. 2007; 84 : 236–246.
- Delattre J, Beaudoux JL, Bonnefont-Rousselot.** Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales Paris. 2005a; 1 - 405.
- Delattre J, Théron P, Bonnefont-Rousselot D.** Espèces réactives de l’oxygène, antioxydants et vieillissement. In : Delattre J, Beaudoux JL, Bonnefont- Rousselot D. Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales. Paris. 2005b; 281-351.
- Delattre J, Théron P, Bonnefont-Rousselot D.** Espèces réactives de l’oxygène antioxydants et vieillissement. In: Delattre J, Beaudoux JL, Bonnefont-Rousselot D (eds). Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier, Paris. 2009: 281-351.
- Denmark.** Guidance document on cadmium and its compounds. Helsinki commission Baltic Marine Environment Protection Commission. 2002: 51.
- Descamps O.** Stress oxydant et vieillissement: aspects mitochondriaux et stratégies nutritionnelles anti-cancer et anti-vieillessement chez la souris OHI. Thèse de Doctorat, Université René-Descartes Paris 5. 2004. olivier.descamps@worldmail.com .21/05/2007.
- Desideri A, Falconi M.** Prokaryotic Cu, Zn superoxide dismutases. *Biochemical Society transactions* .2003; 31: 1322-1325.
- De Smet H, R Blust.** Stress responses and changes in protein metabolism in carp, *Cyprinus carpio* during cadmium exposure. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2000; 48: 255-26.
- Dollah MA, Parhizkar S, Abdul Latiff L, Bin Hassan MH.** Toxicity effect of nigella sativa on the liver function of rats. *Adv Pharm Bull*. 2013; 3(1): 97-102.
- Douris PC, Elokda AS, Handrakis JP, Principal S, Rondo E, Bovell J, Coughlin WP, Mastroianni CN, Wong MJ, Zimmerman T.** Martial art training enhances the glutathione antioxidant system in middle-aged adults. *J Strength Cond Res*. 2009; 23(5): 1518-1523.

Duarte TL, Jones GDD. Vitamin C modulation of H₂O₂-induced damage and iron homeostasis in human cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 2007; 43: 1165–1175.

Duarte TL, Cooke MS, Jones GDD. Gene expression profiling reveals new protective roles for vitamin C in human skin cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 2009; 46: 78–87

Durackova Z, Djrolo F, Hougbe H, Avode G, Attoulou V, Addra B, Kodjoh N, Avimadj M. Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress. *Mitochondrial medicine*. Gvozdjakova A (ed). 2008: 19-43.

E

Edwards CD, Beatty JC, Loiseau JB, Vlassov KA, Lefebvre DD. Aerobic transformation of cadmium through metal sulfide biosynthesis in photosynthetic microorganisms. *BMC Microbial*. 2013; 13 (1): 161.

EFSA. Scientific opinion : Cadmium in food Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain (Question No EFSA-Q-2007-138). *EFSA J*. 2009; 980: 1-139.

El-Dakhakhny M, NI Mady, MA Halim. Nigella sativa L. oil protects against induced hepatotoxicity and improves serum lipid profile in rats. *Arzneimittel forschung*. 2000a; 50 (9): 832-836.

El-Dakhakhny M, Barakat M, El-Halim M, et al. Effects of nigella sativa oil on gastric secretion and ethanol-induced ulcer in rats. *J Ethnopharmacol*. 2000b; 72: 299-304.

El-Dakhakhny M, Mady NJ, Lember N. The hypoglycemic effect of Nigella sativa oil is mediated by extrapancreatic actions. *Planta medica*. 2002; 65: 465-466.

El-Demerdash FM, Attia AA, Elmazouly RH. Biochemical and histopathological changes induced by different time intervals of methomyl treatment in mice liver. *Journal of Environmental Science and Health. Part A: Toxic/ Hazardous substances and environmental engineering*. 2012; 47(12): 1948-1954.

El-Demerdash FM, Yousef MI, Radwan FME. Ameliorating effect of curcumin on sodium arsenite-induced oxidative damage and lipid peroxidation in different rat organs. *Food Chem Toxicol*. 2009; 47: 249-54.

- El Gazzar MA, El Mezayen R, Nicolls MR, Dreskin SC.** Thymoquinone attenuates proinflammatory responses in lipopolysaccharide-activated mast cells by modulating NFkappaB nuclear transactivation. *Bioch Biophys Acta.* 2007; 1770: 556–564.
- El Gazzar M, El Mezayen R, Marecki JC, Nicolls MR, Canastar A, Dreskin SC.** Anti-inflammatory effect of thymoquinone in a mouse model of allergic lung inflammation. *Intern Immunopharmacol.* 2006; 6:1135–1142.
- El Heni J, Messaoudi I, Hamouda F, Kerkeni A.** Protective effects of selenium (Se) and zinc (Zn) on cadmium (Cd) toxicity in the liver and kidney of the rat: Histology and Cd accumulation. *Food and Chemical Toxicology.* 2008; 46: 3522– 3527.
- El-Khawaga ASA.** Morphological and Metabolic Repons of *Aspergillus nidulans* and *Fusarium oxysporum* to Heavy Metal Stress. *J Appl Sci Res.* 2011; 7(11):1737-1745.
- El-Mahmoudy A, Shimizu Y, Shiina T, Matsuyama H, El-Sayed M, Takewaki T.** Successful abrogation by thymoquinone against induction of diabetes mellitus with streptozotocin via nitric oxide inhibitory mechanism. *Inter Immunopharmacol.* 2005; 5: 195–207.
- El-Obeid A, Al-Harbi S, Al-Jomah N, Hassib A.** Herbal melanin modulates tumor necrosis factor alpha (TNF-a), interleukin 6 (IL-6) and vascular endothelial growth factor (VEGF) production. *Phytomedicine.* 2006; 13: 324–333.
- Eneman JD, Potts RJ, Oisier M et al.** Suppressed oxidant-induced apoptosis in cadmium adapted alveolar epithelial cells and its potential involmnet in cadmium carcinogenesis. *Toxicol.* 2000; 147: 215-228.
- Erkan N, Ayranci G, Ayranci E.** Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chem.* 2008; 110: 76–82.
- Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N.** Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry.* 2001; 1: 529-539.
- Ernie Hood.** Putting a Load on Your Bones: Low-Level Cadmium Exposure and Osteoporosis . *Environ Health Perspect.* 2006; 114(6): 369–370.

Evelyne C. Le cadmium, JDV Besançon. 2006.

Esther O. Abam, Funmilola Y Oladipo, Violette N Atasie, Abimbola A Obayomi. Effect of walnut (*tetracarpidium conophorum*)-oil on cadmium-induced alterations in lipid metabolism in male albino rats. *Food and Public Health*. 2013; 3(4): 169-175.

F

Fabjan E, Hulzebos E, Mennes W, Piersm AH. A category approach for reproductive effects of phthalates. *Toxicol*. 2006; 36: 695 -726.

Fan JL, Ziadi N, Belanger G, Parent LE, Cambouris A, Hu ZY. Cadmium accumulation in potato tubers produced in Quebec. *Can J Soil Sci*. 2009; 89 (4): 435–443.

Farag AGA, Elhalwagy MEA, Farid HEA. Effect of ginger supplementation on developmental toxicity induced by fenitrothion insecticide and/or lead in albino rats. *Pestic Biochem Physiol*. 2010; 97(3): 267–74.

Fararh KM, Shimizu Y, Shiina T, Nikami H, Ghanem MM, Takewaki T. Thymoquinone reduces hepatic glucose production in diabetic hamsters. *Res Veter Sci*. 2005; 79: 219–223.

Farombi EO, Adelowo OA, Ajimoko YR. Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African Cat Fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. *Inter J Environ Res Public Health*. 2007; 4(2): 158-165.

Fatima S, Mahmood R. Vitamin C attenuates potassium dichromate-induced nephrotoxicity and alterations in renal brush border membrane enzymes and phosphate transport in rats. *Clin Chim Acta*. 2007; 386(1-2): 94-99.

Favier A. Le stress oxydant: intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Ann Biol Clin*. 1997; 55(1): 9-16.

Favier A. Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Mécanismes biochimiques. L'actualité Chimique*. 2003: 108-115.

Ferré P. Insulin signaling and insulin resistance. *Thérapie*. 2007; 62: 277-284.

- Filipic M, Fatur T, Vudrag M.** Molecular mechanisms of cadmium induced mutagenicity. Human & experimental toxicology. 2006; 25: 67-77.
- Finaud J, Lac G, Filaire E.** Oxidative Stress. Relationship with Exercise and Training. Sports med. 2006; 36 (4): 327-358.
- Fisher-Wellman K, Bloomer RJ.** Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. Dynamic Medicine. 2009; 8: 1-25.
- Flohe L, Gunzler WA.** Assays of glutathione peroxidase. Methods Enzymol. 1984; 105: 114-121.
- Fornazier RF, Ferreira RR, Victoria AP, Molina SMG, Lea PJ, Azevedo RA.** Effects of cadmium on antioxidant enzyme activities in sugar cane. Biol Plant. 2002; 45: 91-97.
- Fotakis G, Cemeli E, Anderson D, Timbrell JA.** Cadmium chloride-induced DNA and lysosomal damage in a hepatoma cell line. Toxicol In Vitro. 2005; 19: 481-489.
- Fusco D, Colloca G, Lo Monaco MR, Cesari M.** Effects of antioxidant supplementation on the aging process. Clin Interv Aging. 2007; 2(3): 377-387.

G

- Galleano M, Verstraeten SV, Oteiza PI, Fraga CG.** Antioxidant actions of flavonoids: thermodynamic and kinetic analysis. Arch Biochem Biophys. 2010; 501(1): 23-30.
- Gani MS, John A.** Evaluation of hepatoprotective effect of Nigella sativa L. Int J Pharm Pharm Sci. 2013; 5(4): 428-30.
- García-Esquinas E, Pollan M, Tellez-Plaza M, Francesconi KA, Goessle W, Guallar E, Umans JG, Yeh J, Best LG, Navas- Acien A.** Cadmium exposure and cancer mortality in a prospective cohort: the strong heart study. Environ Health Perspect. 2014; 122 (4): 363–370.
- Garin MA, Simon O.** Fiche de radionucléide: cadmium 109 et environnement. Direction de l'environnement et d'intervention-service des études du comportement des radionucléides dans l'écosystème. 2004: 1-14.

- Garrel C, Ceballos-Picot I, Germain G, Al-Gubory KH.** Oxidative stress inducible antioxidant adaptive response during prostaglandin F₂α-induced luteal cell death in vivo. *Free radical research*. 2007; 41: 251-259.
- Gaurav D, Preet S, Dua KK.** Chronic cadmium toxicity in rats; treatment with combined administration of vitamins, amino acids, antioxidants and essential metals. *J Food Drug Analysis*. 2010; 18(16): 464-470.
- Gersch C, Pali SP, Imaram W, Kim KM, Karumanchi SA, Angerhofer A, Johnson RJ, Henderson GN.** Reactions of peroxynitrite with uric acid: Formation of reactive intermediates, alkylated products and triuret, and in vivo production of triuret under conditions of oxidative stress. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2009; 28: 118–149.
- Geret F, Serafim A, Barreira L, Bebianno MJ.** Effect of cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*. *Biomarkers*. 2002; 7: 242-256.
- Ghannadi A, Hajhashemi V, Jafarabadi H.** An investigation of the analgesic and anti-inflammatory effects of nigella sativa seed polyphenols. *J Med Food*. 2005; 8(4):488-493.
- Ghedira K.** La nigelle cultivée: *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae). *Phytothérapie*. 2006; 4: 1-7.
- Ghedira K, Le Jeune R.** Huile de nigelle cultivée, *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae). *Phytothérapie*. 2010; 8: 124-128.
- Ghosh M, Singh SP.** A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts. *Appl Ecol Environ Res*. 2005; 3: 1-18.
- Gichner T, Patkova Z, Szakova J, Demnerova K.** Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. *Mutation research*. 2004; 559: 49-57.
- Gill SS, Hasanuzzaman M, Nahar K, Macovei A, Tuteja N.** Importance of nitric oxide in cadmium stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem*. 2013; 63: 254–261.
- Gilani AH, Jabeen Q, Khan MAU.** A review of medicinal uses and pharmacological activities of *Nigella sativa*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2004; 7: 441-451.

Goudable J1, Favier A. Radicaux libres oxygenes et antioxydants. *Nutr Clin Metabol.* 1997; 11(2): 115-20.

Goyer AG, Clarkson TW. Toxics effects ofmetals. Dans Casarett and Doull's toxicology, the basic sciences of poisons, fifth Edition. Éditeur: C.D. Klaassen. McGraw-Hill, Montréal. 2001.

Goyer RA, Liu J, Waalkes MP .Cadmium and cancer of prostate and testis. *Biometals.* 2004; 17: 555-558.

Goyer R. Toxic effects of metals. In Casarett and Doull's Toxicology (Curtis D.Klaassen,Ed) McGraw-Hill. Montréal. 1996: 691-736.

Gruber CW, Cemazar M, Heras B, Martin JL, Craik DJ. Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding. *Trends in biochemical sciences.* 2006; 31: 455-464.

Guignard JL. Botanique: systématique moléculaire. 12^{ème} Edition Masson (Paris). 2001: 304.

Gulcin İ, Huyutb Z, Elmastaç MY, et al. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian J Chem.* 2010; 3(1):43–53.

Guo GL, Zhou QX. Evaluation of heavy metal contamination in Phaeozem of northeast China *Environ Geochem Health.* 2006; 28 (4): 331–340.

H

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 1974; 249(22): 7130-7139.

Haddad PS, Martineau L, Lyoussi B, Le PM. Middle Eastern and African medicine. In: Soumyanath A. (Ed), *In Traditional Herbal Medicines for Modern Times: Antidiabetic Plants.* CRC Press, Boca Raton, FL. 2006: 221–241.

Hadi V, Kheirouri S, Alizadeh M, Khabbazi A, Hosseini H. Effects of Nigella sativa oil extract on inflammatory cytokine response and oxidative stress status in patients with rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Avicenna J Phytomed.* 2016; 6(1): 34-43.

- Halliwell B.** Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol.* 1989; 70: 737 - 757.
- Halliwell B, Gutteridge JMC.** Free Radicals in biology and medicine. Fourth Edition *New York, Oxford University Press.* 2007: 851.
- Hansen JM, Zhang H, Jones DP.** Differential oxidation of thioredoxin- 1, thioredoxin-2, and glutathione by metal ions. *Free Radical Biology & Medicine.* 2006; 40: 138-45.
- Hansen BH, Romma S, Garmo OA, Pedersen SA, Olsvik PA, Andersen RA.** Induction and activity of oxidative stress-related proteins during waterborne Cd/Zn-exposure in brown trout (*Salmo trutta*). *Chemosphere.* 2007; 67: 2241-2249.
- Hargreaves BJ, Kronfeld DS, Waldron JN, Lopes MA, Gay LS, Saker KE, Cooper WL, Sklan DJ, Harris PA.** Antioxidant status and muscle cell leakage during endurance exercise. *Equine Vet J Suppl.* 2002; 34: 116-121.
- Harstad EB, Klaassen CD.** Acute cadmium exposure enhances AP-1 DNA binding and induces cytokines expression and heat shock protein 70 in HepG2 cells. *Toxicology.* 2004; 197: 213-228.
- Hart BA, Potts RJ, Watkin RD.** Cadmium adaptation in the lung - a double-edged sword? *Toxicol.* 2001; 160: 65-70.
- Hawsawi ZA, Ali BA, Bamosa AO.** Effect of *Nigella sativa* (Black seed) and thymoquinone on blood glucose in Albino rats. *Ann Saudi Med.* 2001; 21(3-4): 242-244.
- Heba M Fahmy, Neveen A Noor, Faten F Mohammed , Anwar A Elsayed , Nasr M Radwan.** *Nigella sativa* as an anti-inflammatory and promising remyelinating agent in the cortex and hippocampus of experimental autoimmune encephalomyelitis-induced rats. *J Basic Appl Zool.* 2014; 67:182–195.
- Hilmy AM, El-Domiaty NA, Daabees AY, et al.** The use of chelating agent EDTA in the treatment of acute cadmium toxicity tissue distribution and some blood parameters in the egyptian toad *Buto regularis*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 1986; 85(1): 67-74.
- Helal EGE .** Effectiveness of an herbal mixture with treatment of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Al-Azhar Bull Sci.* 2000; 1: 201-34.

Hellsten Y, Svensson M, Sjödin B, Smith S, Christensen A, Richter EA, Bangsbo J. Allantoin formation and urate and glutathione exchange in human muscle during submaximal exercise. *Free Radic Biol Med.* 2001; 31(11): 1313- 1322.

Henson MC, Chedrese PJ. Endocrine disruption by cadmium, a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction. *Exp Biol Med (Maywood).* 2004; 229: 383-392.

Heo HJ, Kim YJ, Chung D, Kim DO. Antioxidant Capacities of Individual and Combined Phenolics in a Model System. *Food Chem.* 2007; 104(1): 87-92.

Hoarau P, Gnassia-Barelli M, Roméo M, Girard JP. Differential induction of glutathione - S-Transferases in the clam *ruditapes decussates* exposed to organic compounds. *Environ Toxicol Chem.* 2001; 20: 523-529.

Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Geloën A, Even PC, Cervera P, Le bouc Y. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature.* 2003; 421(6919): 182-187.

Houcher Z, Boudiaf Kh, Benboubetra M, Houcher B. Effects of methanolic extract and commercial oil of *nigella sativa* l. on blood glucose and antioxidant capacity in alloxan-induced diabetic rats. *Pteridines.* 2007; 18: 8-18.

Houlot R. *Techniques d'histologie et de cytologie.* Paris: Edition Maloine. 1984.

Hounkpatin ASY, Edorh PA, Gue'de'non P, Alimba CG, Ogunkanmi A, Dougnon TV, Boni G, Aissi KA, Montcho S, Loko F, Ouazzani N, Mandi L, Boko M, Creppy EE. Haematological evaluation of Wistar rats exposed to chronic doses of cadmium, mercury and combined cadmium and mercury. *Afr. J. Biotechnol.* 2013; 12 (23): 3731–3737.

Horiguchi H, Oguma E, Sasaki S, Miyamoto K, Ikeda Y, Machida M, Kayama F. Comprehensive study of the effects of age, iron deficiency, diabetes mellitus, and cadmium burden on dietary cadmium absorption in cadmium exposed female Japanese farmers. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004; 196: 114-123.

Horiguchi H, Sato M, Konno N, et al . Long term cadmium exposure induces anaemia in rats through hypoinduction of erythropoietin in the kidney. *Arch Toxicol .* 1996; 71:11-9.

Huang YH, Shih CM, Huang CJ, Lin CM, Chou CM, Tsai ML, Liu TP, Chiu JF, Chen CT. Effects of cadmium on structure and enzymatic activity of Cu,Zn-SOD and oxidative status in neural cells. *J Cell Biochem.* 2006; 98: 577-589.

Hussain M, Tangen CM, Berry DL, Higano CS, Crawford ED, Liu G, Wilding G, Prescott S, Kanaga Sundaram S, Small EJ, Dawson NA, Donnelly BJ, Venner PM, Vaishampayan UN, Schellhammer PF, Quinn DI, Raghavan D, Ely B, Moinpour CM, Vogelzang NJ, Thompson IM Jr. University of Michigan, Division of Hematology/Oncology. *Ann Arbor. M.I., N. Engl. J. Med.* 2013; 368(14):1314–1325.

I

IARC . Cadmium and Cadmium Compounds. In IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, [En ligne].2012. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100C/mono100C-8.pdf> (Consultée le 10 février 2012).

Ibn Al-Qaïm A. La médecine du prophète. Beyrouth: Al fikr. 1957.

Ibraheim ZZ. Effect of Nigella sativa seeds and total oil on some blood parameters in female doxorubicinvolunteers. *Saudi Pharmaceutical Journal.* 2002; 10: 54–59.

Ikediodi CO, Badisa VL, Ayuk-Takem LT, Latinwo LM, West J. Response of antioxidant enzymes and redox metabolites to cadmium-induced oxidative stress in CRL- 1439 normal rat liver cells. *International journal of molecular medicine.* 2004; 14: 87-92.

Ilhan A, Gurel A, Armutcu F, Kamisli S, Iraz M. Antiepileptogenic and antioxidant effects of Nigella sativa oil against pentylene-tetrazolinduced kindling in mice. *Neuropharmacol.* 2005; 49: 456-464.

Il'yasova D, Schwartz GG . Cadmium and renal cancer. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005; 207: 179-186.

J

- Jacob C, Knight I, Winyard PG.** Aspects of the biological redox chemistry of cysteine: from simple redox responses to sophisticated signalling pathways. *Biol Chem.* 2006; 387: 1385-1397.
- Jarup L.** Cadmium overload and toxicity. *Nephrol Dial Transplant.* 2002; 17 (2): 35-39.
- Jebali J, Banni M, De Almeida EA, Boussetta H.** Oxidative DNA damage levels and catalase activity in the clam *Ruditapes decussatus* as pollution biomarkers of Tunisian marine environment. *Environ Monit Assess.* 2007; 124: 195–200.
- Jenkins A J, Hill M A, Rowley KG.** Diabetes and Oxidant Stress. *Atherosclerosis and Oxidant Stress. A New Perspective.* Holtzman J.L (ed). 2007: 123-160.
- Johnson D.** Environmental indicators: their utility in meeting the OSPAR Convention's regulatory needs. *ICES journal of marine science.* 2008; 65: 1387-1391.
- Johnson MD, Kenney N, Stoica A, Hi lakivi-Clarke L, Singh B, Chepko G, Clarke R, Sholler PF, Lirio AA, Foss C, Reiter R, Trock B, Paik S , Martin M.** Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland. *Nature Medicine.* 2003; 9(8):1081-1084.
- Johnson RJ, Sautin YY, Oliver WJ, Roncal C, Mu W, Gabriela Sanchez-Lozada L, Rodriguez-Iturbe B, Nakagawa T, Benner SA.** Lessons from comparative physiology: could uric acid represent a physiologic alarm signal gone awry in western society? *J Comp Physiol B.* 2009; 179(1): 67-76.
- Jumarie C, Fortin C, Houde M, Campbell P, Denizeau F.** Cadmium uptake by Caco-2 cells: Effects of Cd complexation by chloride, glutathione and phytochelatins. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2001; 170: 29-38.

K

- Kalus UA, Pruss J, Bystron M, Jurecka A, Smekalova J, Lichius, H Kieseewetter.** Effect of *Nigella sativa* (black seed) on subjective feeling in patients with allergic diseases. *Phytother Res.* 2003; 17 (10): 1209-1214.
- Kamel N, Jebali J, Banni M, Ben Khedher S, Chouba L, Boussetta H.** Biochemical responses and metals levels in *Ruditapes decussates* after exposure to treated municipal effluents. *Ecotoxicol Environ Safety.* 2012; 82: 40–46.
- Kaplan LA.** Urea. In: Kaplan LA and Pesce AJ. (Eds). *Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation.* St Louis. Toronto. Princeton: The C. V. Mosby Company. 1984: 1257-60.
- Kavitha P, Venkateswara Rao J.** Toxic effects of chlorpyrifos on antioxidant enzymes and target enzyme acetylcholinesterase interaction in mosquito fish, *Gambusia affinis*. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 2008; 26: 192–198.
- Khan MA, Chen HC, Tania M, Zhang DZ.** Anticancer activities of *Nigella sativa* (black cummin). *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2011; 8(5): 226-232.
- Khan MAU, Ashfaq MK, Zuberi HS, Mahmood MS, Gilani AH.** The in vivo Antifungal Activity of the Aqueous Extract from *Nigella sativa* Seeds. *Phytother Res.* 2003; 17: 183-186.
- Khan N, Sharma S, sultana S.** *Nigella sativa* (nigella) ameliorates potassium bromate-induced early events of carcinogenesis: diminution of oxidative stress. *Hum Exp Toxicol.* 2003; 22: 193-203.
- Kirkham MB.** Cadmium in plants on polluted soils: Effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments. *Geoderma .* 2006; 137: 19-32.
- Kojima S, H Shimomra, S Matsumoi .**Effect of irradiation with low dose gamma-rays on chemically induced hepatotoxicity and glutathione depletion. *Anticancer Res.* 2000; 20(3): 1583-1588.
- Koller A.** Total serum pritein. *Clin Chem. Toronto : Princeton ;* 1984 : 1316-1324.

Krim M, Messaadia A, Maida I, Aouacheri O, Saka S. Protective effect of ginger against toxicity induced by chromate in rats. *Ann Biol Clin.* 2013; 71(2):165-73.

Kruk I, Michalska T, Lichszeld K, Kladna A, Aboul-Enein H. The effect of thymol and its derivatives on reactions generating reactive oxygen species. *Chemosphere.* 2000; 41: 1059-1064.

L

Labib RM, Badary OA, Hafez HF. *Nigella sativa* L. oil ameliorates methotrexate-induced intestinal toxicity through antioxidant activity. *EJC Suppl.* 2009; 7: 106.

Larregle EV, Varas SM, Oliveros LB, Martinez LD, Antón R, Marchevsky E et al. Lipid in liver of rat exposed to cadmium. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46: 1786–1792.

Levine RL, Stadtman ER. Oxidative modification of proteins during aging. *Experimen gerontol.* 2001; 36: 1495-1502.

Lopez E, CMJ Aace, MJ Oset-Gasque, S Canadas , MP Gonzalez. Cadmium induced reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. *Free Radic Biol Med.* 2006; 40: 940-951.

López-Herranz A, Cutanda F, Esteban M, Pollán M, Calvo E, Pérez-Gómez B, et al. Cadmium levels in a representative sample of the Spanish adult population: The BIOAMBIENT.ES project. *J Exp Sci Envir Epidemiol.* 2016; 26: 471-480.

Lyn Patrick ND. Lead Toxicity Part II: The Role of Free Radical Damage and the Use of Antioxidants in the Pathology and Treatment of Lead Toxicity. *Altern Med Rev.* 2006; 11(2): 114-127.

M

Mac Laren D. Advances in sports and exercise science series. In: Close GL, Mc Ardle F. (Eds). *Nutrition and Sport. Antioxidants and free radicals.* Chapter 8. Elsevier. 153-75, 2007.

Mader SS. *Biologie humaine*, 1ere edition. Bruxelles: De Boek, 2010.

- Mahler BJ, Van Metre PC, Callender E.** Trends in metals in urban and reference lake sediments across the United States, 1970 to 2001. *Environ Toxicol Chem.* 2006; 25: 1698-1709.
- Mahmoud MR, El-Abhar HS, Saleh S.** The effect of *Nigella sativa* oil against the liver damage induced by *Schistosoma mansoni* infection in mice. *J Ethnopharmacol.* 2002; 79: 1-11.
- Mah V, Jalilehvand F.** Cadmium(II) complex formation with glutathione. *J Biol Inorg Chem.* 2010; 15(3): 441-58.
- Majdalawieh AF, Fayyad MW.** Immunomodulatory and anti-inflammatory action of *Nigella sativa* and thymoquinone: a comprehensive review. *Int Immuno-pharmacol.* 2015; 28: 295-304.
- Majdalawieh AF, Fayyad MW.** Recent advances on the anti-cancer properties of *Nigella sativa*, a widely used food additive. *J Ayurveda Integrative Med.* 2016; 7:173-180.
- Mansour M, Tornhamre S.** Inhibition of 5-lipoxygenase and Leukotriene C4 Synthase in Human Blood Cells by Thymoquinone. *J Enz Inh Med Chem.* 2004; 19 (5): 431–436.
- Margaritis I, Palazzetti S, Rousseau AS, Richard MJ, Favier A.** Antioxidant supplementation and tapering exercise improve exercise- induced antioxidant response. *J Am Coll Nutr.* 2003; 22(2): 147-156.
- Mariod AA, Ibrahim RM, Ismail M, Ismail N.** Antioxidant activity and phenolic content of phenolic rich fractions obtained from black cumin (*Nigella sativa*) seedcake. *Food Chem.* 2009; 116: 306–312.
- Martin G, Duez H, Blanquart CVB, Poulain P, Fruchart J et al.** Statin-induced inhibition of the Rho-signaling pathway activates PPARalpha and induces HDL apoA-I. *J Clin Invest.* 2001; 107: 1423-1432.
- Mates JM.** Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicol.* 2000 ; 153(1-3) : 83-104.
- Meddah B, Ducroc R, Faouzi ME, Eto B, Mahraoui L, Benhaddou-Andaloussi A, Martineau LC, Cherrah Y, Haddad PS.** *Nigella sativa* inhibits intestinal glucose

- absorption and improves glucose tolerance in rats. *J Ethnopharmacol.* 2009; 121(3): 419-424.
- Mélila M, Poutouli W, Amouzou KS, Tchangbédji G, Thaou M, Doh A.** Évaluation de l'impact du rejet des déchets phosphates dans la mer sur la biodiversité marine dans trois localités côtières au Togo à partir des biomarqueurs du stress oxydatif chez *Sphyraena barracuda* (HECKEL, 1843). *Int J Biol Chem Sci.* 2012; 6(2): 820-831.
- Ménager MT, Garnier-Laplau J, Gayffon M.** Toxicologie nucléaire environnementale et humaine. Edition Technique & Documentation, Paris. 2009.
- Menon SG, Goswami PC.** A redox cycle within the cell cycle: ring in the old with the new. *Oncogene.* 2007; 26: 1101-1109.
- Meral I, Yener Z, Kahraman T, Mert N.** Effect of *Nigella sativa* on glucose concentration, lipid peroxidation, antioxidant defence system and liver damage in experimentally-induced diabetic rabbits. *The Journal of Veterinary Medical Science.* 2001; 48(10): 593-599.
- Merfort I, Wray V, Barakat HH, Hussein SAM, Nawar MAM, Willuhn G.** Flavonols tryglycosides from seed of *Nigella sativa*. *Phytochem.* 1997; 46: 359-363.
- Meziti A.** Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa*. Mémoire de magister en biochimie appliquée, Université El-Haj Lakhdar Batna. 2009: 21-32.
- Messaadia A, Saka S, Krim M, Maida I, Aouacheri O, Djafer R.** Ginger-supplemented diet ameliorates ammonium nitrate-induced oxidative stress in rats. *Afr j Biotechnol.* 2013; 12(40): 5909-16.
- Metwally MAA, Fouad IM.** Biochemical changes induced by heavy metal pollution in marine fishes at Khomse Coast, Libya, *Global Verterinaria.* 2008; 2 (6): 308- 311.
- Michel Aoun.** Action du cadmium sur les plants de moutarde indienne [*Brassica juncea* (L.) Cz- ern] néoformés à partir de couches cellulaires minces et issus de semis. Analyses physiologiques et rôle des polyamines. *Biochimie [q-bio.BM].* Université de Bretagne occidentale - Brest. Français. 2008: 75.
- Milton Prabu S, M Muthumani, K Shagirtha.** Quercetin potentially attenuates cadmium induced oxidative stress mediated cardiotoxicity and dyslipidemia in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013; 17: 582-595.

- Milton Prabua S, Shagirthab K, Renugadevia J.** Quercetin in combination with vitamins (C and E) improve oxidative stress and hepatic injury in cadmium intoxicated rats. *Biomed Prevent Nutr.* 2011; 1: 1-7.
- Misra DS, Maiti R, Ghosh D.** Protection of swimming-induced oxidative stress in some vital organs by the treatment of composite extract of *Withania Somnifera*, *Ocimum Sanctum* and *Zingiber Officinalis* in male rat. *Afr J Tradit Compl Altern Med.* 2009; 6(4):534-43.
- Mokkedem A.** Guide pratique des cultures en secs de quelques plantes médicinales, condimentaires et aromatiques. INRAA, El-Harrach. 2004: 10.
- Morales AI, Vincente-Sanchez C, Santoval Jm.** Protective effect of quercetin on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats is based on its antioxidant properties. *Food Chem Toxicol.* 2006; 44: 2092-2100.
- Moreira GE, GI Rosa, SB Barros, VC Vassileiff, I Vassileiff.** Antioxidant defence in rat brain regions after developmental lead exposure. *Toxicol.* 2001; 169: 145-51.
- Moretti A, D'Antuno FL, Elementi S.** Essential oil of *Nigella sativa* L. and *Nigella damascene* L, seed. *J Essent Oil Res.* 2004; 16: 182-183.
- Morikawa T, Xu F, Kashima Y, Matsuda H, Ninomiya K, Yoshikawa M.** Novel dollabellane-type diterpene alkaloids with lipid metabolism promoting activities from the seeds of *Nigella sativa*. *Organic Letters.* 2004a; 6: 869-872.
- Morikawa T, Xu F, Ninomiya K, Matsuda H, Yoshikawa M.** Nigellamines A3, A4, A5 and C, new dolabellane-type diterpene alkaloids, with lipid metabolism promoting activities from the Egyptian medicinal food black cumin. *Chem pharmac Bull.* 2004b; 52: 494-497.
- Morin S, Vivas-Nogues M, Thi TD, Boudou A, Coste M, Delmas F.** Dynamics of benthic diatom colonization in a cadmium/zinc-polluted river (Riou-Mort, France). *Fundam Appl Limnol.* 2007; 168: 179-187.
- Morris C D, Carson S.** Routine vitamin supplementation to prevent cardiovascular disease: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 2003; 139: 56–70.

Morsi NM. Antimicrobial effect of crude extracts of *Nigella sativa* on multiple antibiotics-resistant bacteria. *Acta microbiologica Polonica*. 2000; 49: 63-74.

Moulis JM, Bourguignon J, Catty P. Cadmium. The Royal Society of Chemistry. 2014.

Moussavou CF. Etude des mécanismes d'accumulation du cadmium chez *Arabidopsis thaliana* (écotype Wassilewskija) et chez un mélèze hybride (*Larix x eurolepis*) par des approches moléculaire et développementale. Thèse de Doctorat en Biologie. Science et Santé. Université de Limoges. 2010:1.

Murray RL. Creatinine. In: Kaplan LA, Pesce AJ. (Eds). *Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation*. St Louis. Toronto. Princeton: The C. V. Mosby Company. 1984a: 1261-1266.

Murray RL. Aspartate aminotransferase. In: Kaplan LA, Pesce AJ. (Eds). *Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation*. St Louis. Toronto. Princeton: The C. V. Mosby Company. 1984b: 1112-1116.

Murray RL. Alanine aminotransferase. In: Kaplan LA, Pesce AJ. (Eds). *Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation*. St Louis. Toronto. Princeton: The C. V. Mosby Company; 1984c: 1088-1090.

Murugavel P, Pari L. Diallyl tetrasulfide protects cadmium-induced alterations in lipids and plasma lipoproteins in rats. *Nutr Res*. 2007; 27: 356-361.

Murugavel P, Pari L. Role of diallyl tetrasulfide in ameliorating the cadmium induced biochemical changes in rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2005; 20: 493- 500.

Musa D, Dilsiz N, Gumushan H, Ulakoglu G, Bitiren M. Antitumor activity of an ethanol extract of *Nigella sativa* seeds. *Biologia Bratislava*. 2004; 59: 735-740.

N

Nagi M, Mansour M. Protective effect of thymoquinone against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: a possible mechanism of protection. *Pharmacol Res*. 2000; 41: 283-289.

- Naito HK.** Cholesterol. In: Kaplan LA, Pesce AJ. (Eds). *Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation*. St Louis. Toronto. Princeton: The C. V. Mosby Company. 1984: 1194-11206.
- Nair MKM, Vasudevan P, Venkitanarayanan K.** Antibacterial effect of black seed oil on *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 2005; 16: 395-398.
- Najmi A, Haque ShF, Khan RA, Nasiruddin M.** Therapeutic Effect of Nigella Sativa Oil on Different Clinical and Biochemical Parameters in Metabolic Syndrome. *Int J Diabetes Metabol*. 2008; 16: 85- 87.
- Navarro-Alarcon M, Lopez-Martinez MC.** Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. *Sci Total Environ*. 2000; 249(1-3): 347-71.
- Nergiz C, Ötles S.** Some characteristics of nigella (*Nigella sativa* L.) seed cultivated in Egypt and its lipid profile. *Food Chem*. 2003; 83: 63-68.
- Nickavar B, Mojaba F, Javidniab K, Amolia MAR.** Chemical composition of the fixed and volatile oils of *Nigella sativa* L. from Iran. *J biosci*. 2003; 58: 9-10.
- Nohl H, Gille L, Staniek K.** The mystery of reactive oxygen species derived from cell respiration. *Biochem Soc Transact*. 2004; 51: 223 - 229.
- Nordberg GF, Nogawa K, Nordberg M, Friberg LT.** Cadmium. In: Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg L. (Eds). *Handbook of Toxicology of Metals*, 3^{ème} édition. Elsevier Publishers, Amsterdam, chapitre 23. 2007: 445-480.
- Nordberg G, Kjellström T, Nordberg M.** Kinetics and Metabolism, cadmium and health: A Toxicological and Epidemiological Appraisal. In: *Exposure, Dose and Metabolism*. Edited by L Friberg, CG Elinder, T Kjellström, and GF Nordberg, Boca Raton CRC Press. 1985: 103-178.
- Nweke CO, CS Alisi, JC Okolo, CE Nwanyanwu.** Toxicity of Zinc to Heterotrophic Bacteria from a Tropical River Sediment. *Appl Environ Res*. 2007; 5: 23-132.

O

- Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J.** Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* 2005; 113: 823-839.
- Obianime AW, Aprioku JS.** Comparative and interactive studies of aqueous leaf extracts of *Ocimum gratissimum* Linn. (Lamiaceae), Vitamins C and E on the basal serum phosphatase levels of male guinea-pigs. *West Afr J Pharmacol Drug Res.* 2009; 24.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K.** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95(2): 351-8.
- Oh SH, Choi JE, Lim SC.** Protection of betulin against cadmium-induced apoptosis in hepatoma cells. *Toxicol.* 2006; 220: 1-12.
- Ojha S, Azimullah S, Mohanraj R, Sharma C, Yasin J, Arya DS, et al.** Thymoquinone protects against myocardial ischemic injury by mitigating oxidative stress and inflammation. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015; 2015: 143629.
- Olsson IM, Bensryd I, Lundh T, Ottosson H, Skerfving S, Oskarsson A.** Cadmium in blood and urine--impact of sex, age, dietary intake, iron status, and former smoking--association of renal effects. *Environ Health Perspect.* 2002; 110:1185-1190.
- Olusegun Kayode Afolabi, Emmanuel Bukoye Oyewo, Adeniran Sanmi Adekunle, Olaniyi Temitope Adedosu, Adebayo Lawrence Adedeji.** Impaired Lipid Levels and Inflammatory Response In Rats Exposed To Cadmium. *Excli J.* 2012; 11: 677-687
- Oruç EÖ, Üner N.** Combined effects of 2, 4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol C.* 2000; 127: 291-296.
- Ozden S, Catalgol B, Gezginçi-Oktayoglu S, Arda-Pirincci P, Bolkent S, Alpertunga B.** Methiocarb-induced oxidative damage following subacute exposure and the protective effects of vitamin E and taurine in rats. *Food Chem Toxicol.* 2009; 47: 1676-1684.

P

- Pastre J, Priymenko N.** Intérêt des anti-oxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. *Revue Méd Vét.* 2007; 158 (4): 180-189.
- Patterson RA, Horsley ET, Leake DS.** Prooxidant and antioxidant properties of human serum ultrafiltrates toward LDL: Important role of uric acid. *J Lipid Res.* 2003; 44: 512-521.
- Pesce AJ.** Lactate dehydrogenase. In: Kaplan LA, Pesce AJ. (Eds). *Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation.* St Louis. Toronto. Princeton: The C. V. Mosby Company. 1984: 1124-1117.
- Pichard A.** Cadmium et ses dérivés. INERIS: fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. Version N°2 - février 2005.
- Picot A.** L'Antimoine, un vieux toxique toujours méconnu. *J Environmental Monitoring France.* 2006; 2: 1-12.
- Pilon-Smits E.** Phytoremediation. *Annu Rev Plant Biol.* 2005; 56: 15-39.
- Pinot F, Kreps SE, Bachelet M, Hainaut P, Bakonyi M, Polla BS.** Cadmium in the environment: Sources, mechanisms of biotoxicity, and biomarkers. *Rev Environ Health.* 2000; 15: 299-323.
- Pittaluga M, Parisi P, Sabatini S, Ceci R, Caporossi D, Valeria Catani M, Savini I, Avigliano L.** Cellular and biochemical parameters of exercise-induced oxidative stress: relationship with training levels. *Free Radic Res.* 2006; 40(6): 607-614.
- Polyakov NE, Leshina TV, Salakhutdinov NF, Konovalova TA, Kispert LD.** Antioxidant and redox properties of supramolecular complexes of carotenoids with beta-glycyrrhizic acid. *Free Radic Biol Med.* 2006; 40(10): 1804-1809.
- Powell SR.** The antioxidant properties of zinc. *J Nutr.* 2000; 130: 1447S-54S.
- Powers SK, Sen CK.** Physiological antioxidants and exercise training. In: Sen CK, Packer L, Hanninen O. (Eds). *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise.* Elsevier Science: Amsterdam. 2000: 221-242.

Potts RJ, Beshpalov IA, Wallace SS, Melamede RJ, Hart BA. Inhibition of oxidative DNA repair in cadmium-adapted alveolar epithelial cells and the potential involvement of metallothionein. *Toxicol.* 2001; 161: 25-38.

Pratik Kumar Chatterjee, Vinodini NA, Anwar Amemarsoofi, Nayanatara AK, Sheila R. Pai, Suman VB. Hypolipidemic effect of *Moringa oleifera* leaf extract in cadmium exposed rats. *Inter J Innov Res Sci Eng Technol.* 2013; 2(9): 4719.

Predes FS, da Silva MA, Foglio MA, Camargo CA, Aoyama H, Miranda SC, Cruz B, Marcondes MCG, Dolder H. Hepatoprotective effect of *Arctium lappa* root extract on cadmium toxicity in adult Wistar rats. *Biol Trace Elem Res.* 2014; 160 (2): 250–257.

Pretto A, Loro VL, Baldisserotto B, Pavanato MA, Moraes BS, Menezes C, Cattaneo R, Clasen B, Finamor IA, Dressler V. Effects of Water Cadmium Concentrations on Bioaccumulation and Various Oxidative Stress Parameters in *Rhamdia quelen*. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2011; 60: 309–318.

Puppo A. Effect of Flavonoids on Hydroxyl Radical Formation by Fenton-Type Reactions; Influence of the Iron Chelator. *Phytochem.* 1992; 31(1): 85-88.

Q

Qidwai W, Hamza HB, Qureshi R, Gilani A. Effectiveness, Safety, and Tolerability of Powdered *Nigella sativa* (Kalonji) Seed in Capsules on Serum Lipid Levels, Blood Sugar, Blood Pressure, and Body Weight in Adults: Results of a Randomized, Double-Blind Controlled Trial. *J Altern Complement Med.* 2009; 15(6): 639-644.

R

Rahman I, Biswas SK, Kode A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur j pharmacol.* 2006; 533: 222-239.

Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging.* 2007; 2(2): 219–236.

- Rajkumar J S I, John Milton MC.** Biochemical changes induced by cadmium, copper, lead and zinc exposure to *Perna viridis* under long term toxicity test. *InternJ Pharma Bio Sci.* 2011; 2 (3): 50-59.
- Ramadan MF, Mörsel JT.** Analysis of glycolipids from black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.) and niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) oilseeds. *Food Chem.* 2003; 80: 197-204.
- Ramadan MF, Mörsel JT.** Direct isocratic normal-phase HPLC assay for fat soluble vitamins and β -carotene in oil seeds. *Eur food Res Technol.* 2002; 214: 521-527.
- Ramirez Dc, Gimenez Ms.** Lipid modification in mouse peritoneal macrophages after chronic cadmium exposure, *Toxicol.* 2002; 172: 1-12.
- Rao AV, Rao LG.** Carotenoids and human health. *Pharmacol Res.* 2007; 55(3): 207-216.
- Rasouli-Hiq AA, Bagherzadeh-Kasmani F, Mehri M et al.** *Nigella sativa* (black cumin seed) as a biological detoxifier in diet contaminated with aflatoxin B1. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2016; 1-10.
- Rathnayake V N, M Megharaj, N Bolan, R Naidu.** Tolerance of Heavy Metals by Gram Positive Soil Bacteria. *World Acad Sci, Engin Techn.* 2009; 53: 1185-1189.
- Reeves PG, Chaney RL.** Nutritional status affects the absorption and whole-body and organ retention of cadmium in rats fed rice-based diets. *Environ Sci Technol.* 2002; 36: 2684-2692.
- Reeves PG, Chaney RL.** Marginal nutritional status of zinc, iron, and calcium increases cadmium retention in the duodenum and other organs of rats fed rice-based diets. *Environ Res.* 2004; 96: 311-322.
- Reham Zakaria Hamza, Mohammad Salem Al-Harbi.** Amelioration of paracetamol hepatotoxicity and oxidative stress on mice liver with silymarin and *Nigella sativa* extract supplements. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2015; 5(7): 521–531.
- Reilly C.** *Selenium in food and health*, 2eme edition. New York, Springer, 2006.
- Rekha DKin, TripathiY, Vinodhini NA.** Protective role of vitamin E against cadmium chloride induced testicular damage in rats. *J.P.B.S.* 2009; 22: 12-16

Rogalska J, Brzoska Mm, Roszczenko A, Jakoniuk Jm. Enhanced zinc consumption prevents cadmium induced alterations in lipid metabolism in male rats. *Chem Biol Interact.* 2009; 177: 142-152.

Romão L, Tovar J, Fonseca SG, Moraes RH, Cruz AK, Hothersall JS, Noronha-Dutra AA, Ferreira SH, Cunha FQ. Glutathione and the redox control system trypanothione /trypanothione reductase are involved in the protection of *Leishmania* spp. Against nitrosothiol-induced cytotoxicity. *Braz J Med Biol Res.* 2006; 39(3): 355-363.

Rooney S, Ryan MF. Effects of Alpha-hederin and Thymoquinone, constituents of *Nigella sativa*, on Human Cancer Cell Lines. *Anticancer Res.* 2005a; 25: 2199-2204.

Rooney S, Ryan MF. Modes of action of alpha-hederin and thymoquinone, active constituents of *Nigella sativa*, against HEP-2 cancer cells. *Anticancer Res.* 2005b; 25(6): 4255-9.

Rousselet E. Reponse cellulaire vis-a-vis de l'exposition au cadmium chez les animaux. *Universite joseph fourier-grenoble 1.* 2007 : 19-72.

S

Saka S, Bahi A, Aouacheri W .L'effet du stress oxydant induit par l'acétate de plomb sur le système enzymatique du glutathion chez les rats. *Ann Toxicol Anal.* 2011; 23(3):139-45.

Saidi B. La graine de Nigelle: remède sacré ou sacré remède? Paris: Iqra et Les Quatres Sources. 2010.

Salama HMR. Clinical and Therapeutic Trials of *Nigella sativa*. *TAF Prev Med Bull .*2010; 9(5): 513-522.

Saleem M, B Ahmed, K Rehman, S Mahmood, M Alam, A Erum. Nephro-protective effect of vitamin C and *Nigella sativa* L. oil on gentamycin-associated nephrotoxicity in rabbits, *Pak J Pharm Sci.* 2012; 25 (4): 727-730.

Salem ML. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. Seed. *Intern Immunopharmacol.* 2005; 5: 1749-1770.

- Sandalio LM, Dalurzo HC, Gomez M, Romero-Puertas MC, del Rio LA.** Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J Exp Bot.* 2001; 52: 2115-2126.
- Sandrini JZ, Ventura Lima J, Regoli F, Fattorini D, Nottic A, Marinsa LF, Monserrat JM.** Antioxidant responses in the nereidid *Laeonereis acuta* (Annelida, Polychaeta) after cadmium exposure. *Ecotoxicol Environ Safty.* 2008; 70: 115–120.
- Satarug S, Moore MR.** Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. *Environ Health Perspect.* 2004; 112: 1099-1103.
- Sautin YY, Nakagawa T, Zharikov S, Johnson RJ.** Adverse effects of the classic antioxidant uric acid in adipocytes: NADPH oxidase-mediated oxidative/nitrosative stress. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 293(2): C584-596.
- Sayre LM, Moreira PI, Smith MA, Perry G.** Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease. *Ann Is Super Sanità.* 2005; 41(2):143-164.
- Schultz A.** Uric acid. In: Kaplan LA, Pesce AJ. (Eds). *Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation.* St Louis. Toronto. Princeton: The C. V. Mosby Company. 1984: 1261-1266.
- Schwartz DA, Blaski CA.** Toxic inhalations. In: Fishman AP. (Ed). *Pulmonary Diseases and Disorders,* New-York: Mc Graw-Hill. Vol 1. 2000: 925-940.
- Schwarz MA, Lindtner O, Blume K, Heinemeyer G, Schneider K.** Cadmium exposure from food: the German LExUKon project. *Food Addit Contam. A.* 2014; 31 (6): 1038-1051.
- Scibior A, Zaporowska H, Ostrowski J, et al.** Combined effect of vanadium (V) and chromium (III) on lipid peroxidation in liver and kidney of rats. *Chem Biol Interact.* 2006; 159(3): 213-22.
- Seidal K, Jorgensen N, Elinder CG.** Fatal cadmium induced pneumonitis. *Stand J Work Environ Health.* 1993; 19: 429-431.
- Sener U, Uygur R, Aktas C, Uygur E, Erboga M, Balkas G, et al.** Protective effects of thymoquinone against apoptosis and oxidative stress by arsenic in rat kidney. *Ren Fail.* 2016; 38: 117-23.

- Shahzad M, Yang X, Raza Asim MB, Sun Q, Han Y, Zhang F, Cao Y, Lu S.** Black seed oil ameliorates allergic airway inflammation by inhibiting T-cell proliferation in rats. *Pulmon Pharmacol Therap.* 2009; 22: 37-43.
- Shailaja MS, D'Silva C.** Evaluation of impact of PAH on a tropical fish, *Oreochromis mossambicus* using multiple biomarkers. *Chemosphere.* 2003; 53: 835–841.
- Saggu S, Rehman H, Aziz AT, Alzeibr FMA, Oyouni AAA, Zidan N, Panneerselvam C, Trivedi S.** *Cymbopogon schoenanthus* (Ethkher) ameliorates cadmium induced toxicity in swiss albino mice. *Saudi J Biol Sci.* 2017: 5.
- Shidfar F, Keshavarz A, Jallali M, Miri R, Eshraghian M.** Comparison of the effects of simultaneous administration of vitamin C and omega-3 fatty acids on lipoproteins, apo A-I, apo B, and malondialdehyde in hyperlipidemic patients. *Int J Vitam Nutr Res.* 2003; 73(3): 163-170.
- Shi H, Hudson LG, Liu KJ.** Oxidative stress and apoptosis in metal ion-induced carcinogenesis. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37(5): 582-93.
- Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins RJ.** *Modern Nutrition in Health and Disease.* Tenth Edition. Lippincott Williams & Wilkins. 2006.
- Shim IS, Momose Y, Yamamoto A, Kim DW, Usui K.** Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relation ship to salicylic acid accumulation in plants. *Plant Growth Regul.* 2003; 39: 285-292.
- Siedlecka A, Krupa Z.** Functions of enzymes in heavy metal treated plants. In: Prasad MNV, Strzalka K. (Eds). *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants.*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 2002: 303-324.
- Singh P, Chaudhary S, Patni A, Sankhla V.** Effect of cadmium chloride induced genotoxicity in bone marrow chromosomes of swiss albino mice and subsequent protective effects of *Emblica officinalis* and vitamin C. *J Herb Med Toxicol.* 2007; 1 (2): 67-71.
- Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC.** Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Rad Biol Med.* 2002; 33(5): 575-586.

- Sogawa N, Onodera K, Sogawa CA, Mukubo Y, Fukoka H, Oda N, Furuta H.** Bisphenol A enhances cadmium toxicity through estrogen receptor. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2001; 23 (7): 395.
- Soltani N, Amira A, Sifi K, Beldi H.** Environmental monitoring of the Annaba gulf (Algeria): measurement of biomarkers in *Donax trunculus* and metallic pollution. *Bull Soc Zool.* 2012; 137 (1-4): 47-56.
- Soudani N, Troudi A, Bouaziz H, et al.** Cardioprotective effects of selenium on chromium (VI)-induced toxicity in female rats. *Ecotoxicol Environ Safty.* 2011; 74(3): 513-20.
- Squier TC.** Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Experimen gerontol.* 2001; 36: 1539-1550.
- Stahl W, Sies H.** Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1740(2): 101-107.
- Stevnsner T, Thorslund T, de Souza-Pinto NC, Bohr VA.** Mitochondrial repair of 8-oxoguanine and changes with aging. *Experimen gerontol.* 2002; 37: 1189-1196.
- Stohs SJ, Bagchi D, Hassoun E, Bagchi M.** Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2000; 19: 201-13.
- Suboh S, Bilto Y, Aburjai T.** Protective effects of selected medicinal plants against protein degradation, lipid peroxidation and deformability loss of oxidatively stressed human erythrocytes. *Phytother Res.* 2004; 18: 280-284.
- Sultan MT, Butt MS, Anjumi FM, Jamil A, Akhtar S, Nasir M.** Nutritional profile of indigenous cultivar of black cumin seeds and antioxidant potential of its fixed and essential Oil. *Pak J Bot.* 2009; 41(3): 1321-1330.
- Superko HR, Nejedly M, Garrett B.** Small LDL and its clinical importance as a new CAD risk factor: a female case study. *Progress in Cardiovascular Nursing.* 2002; 4:167-173.
- Swamy SM, Huat BT.** Intracellular glutathione depletion and reactive oxygen species generation are important in alpha-hederin-induced apoptosis of P388 cells. *Mol Cell Biochem.* 2003; 245: 127-139.
- Szuster-Ciesielska A, Stachura A, Slotwinska M, Kaminska T, Sniezko R, Paduch R, Abramczyk D, Filar J, Kandefler-Szerszen M.** The inhibitory effect of zinc on

cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production in cell cultures. *Toxicol.* 2000; 145: 159-71.

T

Talbi H, Boumaza A, El-mostafa K, Talbi J, Hilali A. Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. *Mater Environ Sci.* 2015; 6(4): 1111-1117.

Tandon SK, Singh S, Dhawan M. Preventive effect of vitamin E in cadmium intoxication. *Biomed Environ Sci.* 1992; 5: 39-45.

Teuscher E, Anton R, Lobstein A. Plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Edition Lavoisier, Paris. 2005.

Thabrew MI, Mitry RR, Morsy MA, Hughes RD. Cytotoxic effects of a decoction of *Nigella sativa*, *Hemidesmus indicus* and *Smilax glabra* on human hepatoma HepG2 cells. *Life Sci.* 2005; 77: 1319-1330.

Thevenod F. Nephrotoxicity and the proximal tubule. Insights from cadmium. *Nephron Physiol.* 2003; 93: 87-93.

Traber M G, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Rad Biol Med.* 2007; 43: 4-15.

Tuter M, Aksoy HA, Ustun G, Riva S, Secundo F, Ipekler S. Partial purification of *Nigella sativa* L. seed lipase and its application in hydrolytic reactions. enrichment of γ -linolenic acid from borage oil. *J Am Oil Chem Soc.* 2003; 80: 237-241.

U

Upreti KK, Das M, Kuman A, Singh GB, Khanna SK. Biochemical toxicology of argemone oil. IV: Short-term oral feeding response in rats. *Toxicol.* 1989; 58: 285-9.

Uyanik F, Eren M, Atasever A, Tuncoku G, Kolsuz AH. Changes in some biochemical parameters and organs of broilers exposed to cadmium and effect of Zinc on cadmium induced alteration. *Israel Vet Med.* 2001; 56:128-134

Uz E, Bayrak O, Uz E, Kaya A, Bayrak R, Uz B, et al. Nigella sativa oil for prevention of chronic cyclosporine nephrotoxicity: an experimental model. *Am J Nephrol.* 2008; 28(3): 517-522.

V

Vahdati-Mashhadian N, Rakhshandeh H, Omidi A. An investigation on LD₅₀ and subacute hepatic toxicity of Nigella sativa seed extracts in mice. *Pharmazie.* 2005a; 60(7): 544-547.

Vahdati-Mashhadian N, Rakhshandeh H. Antibacterial and antifungal effects of nigella sativa extracts against *S. Aureus*, *P. Aeruginosa* and *C. Albicans*. *Pak J Med Sci.* 2005b; 21: 147-152.

Valco M, Rhodes CJ, Moncol J, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006; 160: 1-40.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39: 44-84.

Van Helden YGJ, Keijer J, Knaapen AM, Heil SG, Briedé JJ, van Schooten FJ, Godschalk RWL. β -Carotene metabolites enhance inflammation-induced oxidative DNA damage in lung epithelial cells. *Free Rad Biol Med.* 2009; 46: 299–304.

Vangronsveld J, Herzig R, Weyens N, Boulet J, Adriaensen K, Ruttens A, Thewys T, Vassilev A, Meers E, Nehnevajova E, Van der Lelie D, Mench M. Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environ Sci Poll Res.* 2009; 16: 765-794.

Van Stijn MF, Ligthart-Melis GC, Boelens PG, Scheffer PG, Teerlink T, Twisk JW, Houdijk AP, Van Leeuwen PA. Antioxidant enriched enteral nutrition and oxidative stress after major gastrointestinal tract surgery. *World J Gastroenterol.* 2008; 14(45): 6960-6969.

Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio et de nitrogênio, antioxydants e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analiticoa para sua determinação. *Quim Nova.* 2007; 30(5): 1323-1338.

Verlecar XN, Jena KB, Chainy GBN. Modulation of antioxidant defences in digestive gland of *Perna viridis* (L.), on mercury exposures. *Chemos.* 2008; 71: 1977-1985.

Vutukuru SS, Suma C, Radha Madhavi K, Juveria Smitha Pauleena J, Venkateswara Rao J, Anajaneyulu Y. Studies on the development of potential biomarkers for rapid assessment of copper toxicity to freshwater fish using *Esomus danricus* as model. *Int J Environ Res Public Health.* 2005; 2: 63-73.

W

Waalkes MP. Cadmium carcinogenesis. *Mutat Res.* 2003; 533: 107-120.

Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicol.* 2003; 192: 95–117.

Wang Y, Fang J, Leonard SS, Rao KM. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free rad biol Med.* 2004; 36: 1434-1443.

Waring WS, Convery A, Mishra V, Shenkin A, Webb DJ, Maxwell SR. Uric acid reduces exercise-induced oxidative stress in healthy adults. *Clin Sci (Lond).* 2003; 105(4): 425-430.

Weckbecker G, Cory JG. Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione depended mouse leukaemia L 1210 cells n vitro. *Cancer Lett.* 1988; 40: 257-64.

Wenger C. Alkaline phosphatase. In: Kaplan LA, Pesce AJ. (Eds). *Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation.* St Louis. Toronto. Princeton: The C. V. Mosby Company. 1984: 1094-1098.

Wlostowski T, Krasowska A, Laszkiewicz- Tiszczenko B. Dietary cadmium induces histopathological changes despite a sufficient metallothionein level in the liver and kidneys of the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Comp Biochem Physiol, part C. Toxicol Pharmacol.* 2000; 126(1): 21–28.

Wolinsky I. *Nutrition in exercise and sport.* 3th Edition. CRC Press, New York. 1998.

Won EJ, Kim RO, Rhee JS, Park GS, Lee J, Shin KH, Lee YM, Lee JS. Response of glutathione S-transferase (GST) genes to cadmium exposure in the marine pollution indicator worm, *Perinereis nuntia*. *Comp Biochem Physiol, Part C.* 2011; 154: 82–92.

Wu Q, Zou YN, Abd_Allah EF. Mycorrhizal association and ROS in plants. In: Ahmad P. (Ed). *Oxidative damage to plants.* Elsevier Inc. 2014.

Wu YH, Jia J, Li YB, Shi ZX, Zhou XQ, Sun ZW. Crry receptor and oxidative stress involved in erythrocyte immune toxicity of mice caused by endosulfan and protective effects of vitamin E. *J Toxicol Sci.* 2012; 37: 1225-1237.

Y

Yaman UI, E Balikci. Protective effects of *Nigella sativa* L. against gentamycin-induced nephrotoxicity in rats. *Exp Toxicol Pathol.* 2010; 62(2): 183–190.

Yanai J, Zhao FJ, McGrath SP, Kosaki T. Effect of soil characteristics on Cd uptake by the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Environ Poll.* 2006; 139: 167-175.

Yildirim NC, Benzer F, Danabas D. Evaluation of environmental pollution at Munzur river of Tunceli applying oxidative stress biomarkers in *Cappota trutta* (Heckel, 1843). *J Anm Plant Sci.* 2011; 21(1): 66-71.

Yusuf Y. Novel uses of catechins in foods. *Trends Food Sci. Tech.* 2006; 17: 64-71.

Z

Zaghlol D, Kamel E, Mohammed D, Abbas N. The possible toxic effect of different doses of *Nigella sativa* oil on the histological structure of the liver and renal cortex of adult male albino rats. *Egypt J Histol.* 2012; 35 (1): 127-136.

Zaidi N, Soltani N. Environmental risks of two chitin synthesis inhibitors on *Gambusia affinis*: Chronic effects on growth and recovery of biological responses. *Biol Control.* 2011; 59: 106–113.

Zaoui A, Cherrah Y, Mahassini N, Alaoui K, Amarouch H, Hassar M. Acute and chronic toxicity of *Nigella sativa* fixed oil. *Phytomed.* 2002a; 9(1): 69-74.

Zaoui A, Cherrah Y, Alaoui K, Mahassine N, Amarouch H, Hassar M. Effects of *Nigella sativa* fixed oil on blood homeostasis in rat. *J Ethnopharmacol.* 2002b; 79: 23-26.

Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33(3): 337-49.

Zhang X, Yang L, Li Y, Li H, Wang W, Ye B. Impacts of lead/zinc mining and smelting on the environment and human health in China. *Environ Monit Assess.* 2012; 184 (4): 2261-2273.

Zittoun R, Bernadou A, Samama M. Manuel d'hématologie. Doin Editeurs, Paris. 1982: 337.