

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



جامعة باجي مختار - عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

THÈSE

En vue de l'obtention
du diplôme de DOCTORAT
En Biochimie

Option : Biochimie appliquée

**Impact du stress oxydatif induit par l'aluminium chez
le rat : Exploration des effets protecteurs de l'huile de
Nigella sativa et/ou de l'acide lipoïque**

Présentée par : M^{elle} BOUASLA Ihcène

Directeur de thèse : M. Messarah Mahfoud

Professeur, Université d'Annaba

Membres de Jury:

Président : M. Boulakoud Mohamed Salah

Professeur, Université d'Annaba

M. Bouzerna Noureddine

Professeur, Université d'Annaba

M. Ouldjaoui Abdellah

MCA, Université d'Oum El-Bouaghi

M. Boulkhssaim Mouloud

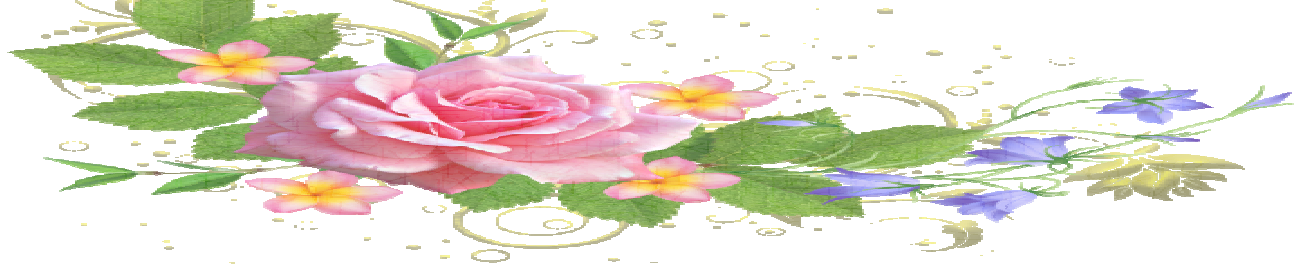
MCA, Université d'Oum El-Bouaghi

Année universitaire : 2014 - 2015

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

REMERCIEMENTS

Avant tous mes plus sincères remerciements à Allah le tout puissant, de m'avoir donnée la force et la patience pour réaliser cet humble travail.



Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'on aidé, orienté par le fruit de leur connaissance pendant toute la durée de mon travail :

*J'exprime ma profonde gratitude à mon encadreur, monsieur **Mahfoud Messarah** professeur à l'université d'Annaba. Je le remercie pour ses conseils pratiques, techniques et scientifiques tout au long de ce travail. Je le remercie également pour sa disponibilité et ses encouragements qui m'ont indiscutablement permis d'évoluer.*



*Je remercie infiniment Monsieur **Boulakoud Mohamed Salah** Professeur à l'université d'Annaba, qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider le jury de ma soutenance et qui m'a permis de travailler au sein de son laboratoire.*

*Je tiens à adresser mes remerciements aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepté de juger ce travail : Monsieur **Bouzerna Noureddine** Professeur à l'université d'Annaba, Monsieur **Ouldjaoui Abdellah** maitre de conférence A à l'université d'Oum el-Bouaghi et Monsieur **Boukhissaim Mouloud** maitre de conférence A à l'université d'Oum el-Bouaghi.*



*J'exprime mes plus vifs remerciements à Monsieur **Aouf N** Professeur à l'université d'Annaba, département de Chimie pour son aide dans la réalisation de la partie pratique.*

*Mes remerciements vont aussi à Monsieur **Khelfaoui M.S** pour son aide et sa disponibilité.*



*Je voudrai également remercier et rendre hommage à Monsieur **Mazegue S** pour la réalisation des coupes histologiques et à Docteur **Chenikj R** médecin spécialiste en anatomie-pathologie à l'Hôpital Abdelah rwawia El-Bounni-Annaba pour l'interprétation des coupes histoogiques.*

Mes plus vifs remerciements vont également à ceux qui ont contribués de près ou du loin à la réalisation de ce travail :

Personnel du service cytogénétique Hôpital IBN ROCHD Annaba.

*Mes collègues : **Klibet F** Maître Assistant A à l'université de Constantine et **Laouar A** Maître Assistant A à l'université de Tebessa, mes amies : **Boughalem W** et **Boumaraf A**.*



Enfin merci à ma famille qui a toujours fait bien plus que me soutenir et me encourager.



Résumé

L'objectif de la présente étude est l'évaluation des effets antioxydants de l'huile de nigelle (*Nigella sativa*) et/ou de l'acide alpha lipoïque dans la prévention du stress oxydatif induit par le chlorure d'aluminium (AlCl_3) chez les rats wistar.

Afin de déterminer le pouvoir antioxydant de l'huile de nigelle (*Nigella sativa*) une étude phytochimique préliminaire a été effectuée, initiée par une analyse quantitative des composés phénoliques suivi par des tests antiradicalaires. Nos résultats ont montré la présence des taux importants en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins, Ce qui suggère que l'huile de nigelle (*Nigella sativa*) contient une teneur élevée en molécules antioxydantes. Ils confirment également que l'huile de nigelle possède un pouvoir contre l'anion superoxyde et le radical DPPH.

Notre étude expérimentale a été réalisée sur 36 rats mâles répartis en deux groupes de 18 rats chacun : groupe (A) témoin, groupe (B) traité par l'huile de nigelle (2ml/kg de poids corporel). Après cinq semaines de prétraitement, chaque groupe est subdivisé en trois sous-groupes de six rats chacun: groupe (A_1 :T) témoin, groupe (A_2 : AlCl_3) traité par le chlorure d'aluminium (34mg/kg de poids corporel), groupe (A_3 : AlCl_3 + AAL) traité par le chlorure d'aluminium et l'acide alpha lipoïque (35mg/kg de poids corporel), groupe (B_1 : AlCl_3 +AAL+NS) traité par le chlorure d'aluminium, l'acide alpha lipoïque et l'huile de nigelle, groupe (B_2 : AlCl_3 +NS) traité par le chlorure d'aluminium et l'huile de nigelle, groupe (B_3 : NS) traité par l'huile de nigelle. Le traitement est poursuivi pendant trois semaines.

Nos résultats ont montré que le chlorure d'aluminium a un effet hématotoxique (anémie), hépatotoxique objectivé par une augmentation de l'activité enzymatique des transaminases, phosphatase alcaline, lactate déshydrogénase et la créatine phosphokinase d'une part, et une augmentation de la concentration plasmatique de la bilirubine accompagnée d'une diminution de la concentration plasmatique en protéines totaux et en albumine d'autre part. Nos résultats ont montré aussi que le chlorure d'aluminium a un effet néphrotoxique (augmentation de la concentration plasmatique en urée, en acide urique et en créatinine).

L'administration de chlorure d'aluminium aux rats a provoqué aussi une perturbation du métabolisme lipidique et glucidique (hypercholestérolémie, hypertriglycéridémie et hyperglycémie).

De même, il a provoqué un stress oxydatif objectivé par une augmentation des taux de MDA au niveau des organes étudiés (foie, reins, cœur...). Ceci est dû à la génération des radicaux libres oxygénés par ce métal causant une altération histologique (ectasie vasculaire, infiltrat inflammatoire lymphoplasmocytaire et œdème). Une diminution du taux de glutathion réduit (GSH) et des activités de quelques enzymes antioxydantes (SOD, CAT, GPx et GSH) plaide en faveur d'un stress oxydatif.

Parallèlement, nos résultats révèlent que la supplémentation en huile de nigelle et/ou en acide alpha lipoïque aux rats traités par le chlorure d'aluminium a améliorée les perturbations des paramètres biochimiques, le statut antioxydant et par conséquent atténuer l'intensité du stress oxydatif induit par l'aluminium.

Ces résultats confirment que l'exposition au chlorure d'aluminium provoque des effets toxiques et qu'il est possible d'utiliser l'huile de nigelle et/ou l'acide alpha lipoïque dans le but de prévenir contre cette intoxication.

Mots clés : stress oxydatif, antioxydant, chlorure d'aluminium, huile de nigelle (*Nigella sativa*), acide alpha lipoïque, rat.

Abstract

The aim of the present study is the evaluation of the antioxydant effect of black seed oil (*Nigella sativa*) and/or alpha lipoïc acide in the prevention of oxidative stress induced by aluminium chloride (AlCl_3) in wistar rats.

In order to determinate the antioxidant potent of black seed oil (*Nigella sativa*), a preminilary phytochemical study was achieved, initiated by quantitative analyse of phenolic compounds and followed by antiradicalars tests. Our results revealed the presence of a significant rate of polyphenols, flavonoids and tannins, which confirmed that black seed oil contain large amounts of antioxidant compound. In addition they prove that the black seed oil has a power to neutralize the DPPH radical and superoxide anion.

Our experimental study was performed on 36 male rats divided into two groups of 18 rats each: control group (A) and black seed oil (2 ml/kg of body weight) treated group (B). After five weeks each group was subdivided into three subgroups of six rats: control (A_1 :T), aluminium chloride (34mg/kg of body weights) treated group (A_2 : AlCl_3), aluminium chloride and alpha lipoïc acide (35mg/kg of body weights) treated group (A_3 : AlCl_3 + AAL), aluminium chloride, alpha lipoïc acide and black seed oil treated group (B_1 : AlCl_3 + AAL+NS), aluminium chloride and black seed oil treated group (B_2 : AlCl_3 +NS), black seed oil treated group (B_3 :NS). The treatment takes duration of three weeks.

According to the results which have been obtained, we noticed that aluminium chloride has a haematotoxic effect (anaemia), hépatotoxic effect, which characterize by an increase of the enzymatic transaminase activities, alkaline phosphatase, lactate deshydrogenase and creatinin phosphokinase in one hand, and by an increase of biliribiine plasmatic concentration with decreased plasmatic concentration of both total protein and albumin in the other hand. Our results showed also that aluminium chloride has a nephrotoxic effect (increas of urea, uric acid and creatinine plasmatic concentration).

Moreover our results showed that aluminium chloride induced disturbance of lipidic and glucidic metabolism (hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia and hyperglycemia).

In addition, AlCl₃ has a prooxidant effect related with an increase of the reactive oxygen species generation, which was indicated by an increase of the malondialdehyde (MDA) content in the studied organs (liver, kidneys, heart...) and by a decrease of reduced glutathione level (GSH), as well as glutathione peroxidase (GPx) catalase and superoxide dismutase (SOD) activities. The histological study revealed also some alteration (vascular ectasia, infiltrated inflammatory lymphoplasmocytic and oedema) in studied organs.

In parallel, our results suggests that black seed oil and/or alpha lipoic acid supplementation in rats treated with Aluminium chloride restore blood parameters perturbation, diminished the rate of intoxication and reduced the intensity of oxidative stress caused by aluminium.

These results confirm that exposure to aluminium chloride enhanced toxic effects and it is possible to use black seed oil and/or alpha lipoic acid supplementation in order to reduce this toxicity.

Key words: oxidative stress, antioxidant, aluminium chloride, black seed oil (*Nigella sativa*), alpha lipoic acid, rats.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم التأثير المضاد للأكسدة لكل من زيت الحبة السوداء (*Nigella sativa*) و/أو حمض الفا ليبويك و دورهما في الوقاية من الإجهاد التأكسدي الناتج عن المعالجة بكلوريد الألمنيوم عند الجرذان من سلالة ويستار.

لأجل تحديد النشاط المضاد للأكسدة لزيت الحبة السوداء (*Nigella sativa*) أجريت دراسة فيتوكيميائية مسبقة، بدأت بالتحليل الكمي للمكونات الفينولية متبوعة باختبارات قدرة تثبيط الجذور الحرة. بينت النتائج المحصل عليها وجود كميات معتبرة من عديدات الفينول الكلية، الفلافونويدات و الدباغ، مما يؤكد احتواء زيت الحبة السوداء على كمية معتبرة من مضادات الأكسدة. أثبتت النتائج المتحصل عليها أيضا، بأن زيت الحبة السوداء يمتلك قدرة تثبيط كل من الجذر الحر DPPH و أيون superoxyde.

دراستنا التجريبية أجريت على 36 جرذ تم توزيعهم إلى مجموعتين تحوي كل منها 18 جرذ: المجموعة (A) جرذان سليمة (شاهد)، و المجموعة (B) عولجت بزيت الحبة السوداء (2ملل/كغ من وزن الجسم). بعد خمسة أسابيع قمنا بإعادة تقسيم كل مجموعة إلى ثلاث مجموعات فرعية تحوي كل منها ستة جرذان: المجموعة (A₁:T) جرذان سليمة (شاهد)، المجموعة (A₂: AlCl₃) عولجت بكلوريد الألمنيوم (34 ملغ/كغ من وزن الجسم)، المجموعة (A₃: AlCl₃+ AAL) عولجت بكلوريد الألمنيوم و حمض الفا ليبويك (35ملغ/كغ من وزن الجسم)، المجموعة (B₁: AlCl₃+ AAL+NS) عولجت بكلوريد الألمنيوم، حمض الفا ليبويك و زيت الحبة السوداء، المجموعة (B₂: AlCl₃+NS) عولجت بكلوريد الألمنيوم و زيت الحبة السوداء، المجموعة (B₃:NS) عولجت بزيت الحبة السوداء. استمرت مدة المعالجة ثلاثة أسابيع.

بينت النتائج المتحصل عليها أن لكلوريد الألمنيوم تأثيرات سلبية تمثلت في ظهور أعراض التسمم الدموي (أنيميا)، تسمم كبدي مرفقا بزيادة النشاط الأنزيمي لنقالات الأمين، الفسفاطاز القلوي، lactate déshydrogénase و créatine phosphokinase من جهة، و زيادة تركيز البيلبيريوبين البلازمي مع انخفاض في تركيز البروتين و الألبومين من جهة أخرى. نتائجا أوضحت أيضا أن كلوريد الألمنيوم تسبب في ظهور أعراض التسمم الكلوي (زيادة تركيز كل من اليوريا، حمض البول (اليوريك)، و الكرياتينين).

معالجة الجرذان المخبرية بكلوريد الألمنيوم أدت كذلك إلى حدوث اختلال في عملية أيض الدهون و السكريات (زيادة تركيز الكوليسترول و الغليسيريدات الثلاثية في البلازما مع ارتفاع نسبة السكر في الدم).

تبين كذلك بأن المعالجة بكلوريد الألمنيوم أدت إلى حدوث إجهاد تأكسدي مما سبب زيادة كمية MDA في الأعضاء المدروسة (الكبد، الكلى، القلب...) نقصان كمية الجلوتاثيون المرجع (GSH) و انخفاض النشاط الإنزيمي لكل من SOD, GPx, ctalase. ارتفاع إنتاج الجذور الأكسجينية الحرة نتيجة المعاملة بهذا المعدن سببت تلفا على مستوى الأنسجة المدروسة (توسع الأوعية الدموية، انتشار الإلتهابات اللفوبلازمية، وذمة).

أوضحت نتائجا بالمقابل أن إضافة زيت الحبة السوداء و/أو حمض الفا ليبويك إلى الجرذان المعالجة بكلوريد الألمنيوم أدت إلى تحسن بعض المؤشرات البيوكيميائية، كما خفضت شدة الإجهاد التأكسدي الناتج عن الألمنيوم.

تؤكد هذه النتائج بأن التعرض لكلوريد الألمنيوم يسبب تأثيرات سلبية (تسمم) و بأنه بالإمكان استعمال زيت الحبة السوداء و/أو حمض الفا ليبويك بهدف التقليل من حدة هذا التسمم.

الكلمات الدالة: الإجهاد التأكسدي، مضادات الأكسدة، كلوريد الألمنيوم، زيت الحبة السوداء (*Nigella sativa*)، حمض الفا ليبويك، جرد.

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Sources d'exposition à l'Aluminium et leurs principaux effets toxicologiques	08
Figure 2: Peroxydation lipidique	17
Figure 3: Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire	17
Figure 4: Principaux dommages radicalaires au niveau de l'ADN	17
Figure 5: Répartition des antioxydants dans la cellule	18
Figure 6: Aspect morphologique du <i>Nigella sativa</i>	26
Figure 7: Structure chimique des composés actifs du <i>Nigella sativa</i>	28
Figure 8: Structure chimique d'un lipoamide	32
Figure 9: Structure chimique de l'acide lipoïque et de l'acide dihydrolipoïque	32
Figure 10: Voies métaboliques de l'acide lipoïque	35
Figure 11: Mécanismes de régénération des antioxydants endogènes par l'acide lipoïque et l'acide dihydrolipoïque	35
Figure 12: Courbe d'étalonnage de la quercétine (0.1mg/ml)	41
Figure 13: Courbe d'étalonnage de la catéchine (0.3mg/ml)	41
Figure 14: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (0.2mg/ml)	41
Figure 15: Réaction de réduction de DPPH	42
Figure 16: Schéma récapitulatif du protocole expérimental	47
Figure 17: Courbe d'étalonnage de la BSA (1mg/ml)	68
Figure 18: Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique	68
Figure 19: Variation du poids relatif de certains organes (foie, reins, cœur, testicules et cerveau) chez les rats témoins et les rats traités.	80
Figure 20: Variation des paramètres hématologiques et de la concentration en fer sérique chez les rats témoins et les rats traités.	83
Figure 21: Variation de la concentration sérique en triiodothyronine (T ₃), en thyroxine (T ₄) et en testostérone chez les rats témoins et les rats traités.	89

Figure 22: Variation de l'activité enzymatique des transaminases (ASAT, ALAT), de la phosphatase alcaline (PAL), de lactate déshydrogénase (LDH) et de la créatine phosphokinase (CPK) chez les rats témoins et les rats traités.	95
Figure 23: Variation de la concentration plasmatique en biliribine totale, en biliribine direct et en glucose chez les rats témoins et les rats traités.	96
Figure 24: Variation de la concentration plasmatique en protéines totales et en albumine chez les rats témoins et les rats traités.	97
Figure 25: Variation de la concentration plasmatique en urée, en créatinine et en acide urique chez les rats témoins et les rats traités.	103
Figure 26: Variation de la concentration plasmatique en cholestérol, en triglycérides, en HDL, en LDL et en VLDL chez les rats témoins et les rats traités.	108
Figure 27: Variation de la teneur du glutathion réduit (GSH) dans le foie, les reins, le cœur, les testicules, le cerveau et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.	112
Figure 28: Variation de la teneur de la malondialdéhyde (MDA) dans le foie, les reins, le cœur, les testicules, le cerveau et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.	114
Figure 29: Variation de l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx) dans le foie, les reins, le cœur, les testicules, le cerveau et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.	116
Figure 30: Variation de l'activité enzymatique de la catalase dans le foie, les reins, le cœur, les testicules, le cerveau et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.	118
Figure 31: Variation de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD) dans le foie, les reins, le cœur, les testicules, le cerveau et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.	120
Figure 32: Coupes histologiques du foie (H E x400) : (A) rats témoins, (B) traités par AlCl ₃ , (C) traités par AlCl ₃ +AAL, (D) traités par AlCl ₃ +AAL+NS, (E) traités par AlCl ₃ + NS, (F) traités par NS .	127
Figure 33: Coupes histologiques des reins (H E x400) : (A) rats témoins, (B) traités par AlCl ₃ , (C) traités par AlCl ₃ +AAL, (D) traités par AlCl ₃ +AAL+NS, (E) traités par AlCl ₃ + NS, (F) traités par NS.	128

Figure 34: Coupes histologiques du cœur (H E x400) : (A) rats témoins, (B) traités par $AlCl_3$, (C) traités par $AlCl_3+AAL$, (D) traités par $AlCl_3+AAL+NS$, (E) traités par $AlCl_3+ NS$, (F) traités par NS.

129

Figure 35: Coupes histologiques des testicules (H E x400) : (A) rats témoins, (B) traités par $AlCl_3$, (C) traités par $AlCl_3+AAL$, (D) traités par $AlCl_3+AAL+NS$, (E) traités par $AlCl_3+ NS$, (F) traités par NS.

130

Figure 36: Coupes histologiques du cerveau (H E x400) : (A) rats témoins, (B) traités par $AlCl_3$, (C) traités par $AlCl_3+AAL$, (D) traités par $AlCl_3+AAL+NS$, (E) traités par $AlCl_3+ NS$, (F) traités par NS.

131

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Principaux produits d'oxydation de quelques acides amines.	16
Tableau 2: Composition de 1 kilogramme d'aliment.	44
Tableau 3: Teneurs en composés phénoliques et activité antioxydante de l'huile de nigelle.	74
Tableau 4: Variation du poids corporel (g) chez les rats témoins et les rats traités.	78
Tableau 5: Variation de la consommation d'aliment (g/rat/j) et de l'eau de boisson (ml/rat/j) chez les rats témoins et les rats traités.	78
Tableau 6: Variation du poids relatif (g /100g de PC) de certains organes (foie, reins, cœur, testicules et cerveau) chez les rats témoins et les rats traités.	79
Tableau 7: Variation des paramètres hématologiques et de la concentration en fer sérique chez les rats témoins et les rats traités.	82
Tableau 8: Variation de la concentration sérique (ng/ml) en triiodothyronine (T ₃), en thyroxine (T ₄) et en testostérone chez les rats témoins et les rats traités.	88
Tableau 9: Variation de quelques biomarqueurs plasmatiques de la fonction hépatique chez les rats témoins et les rats traités.	94
Tableau 10: Variation de la concentration plasmatique (mg/dl) en urée, en créatinine et en acide urique chez les rats témoins et les rats traités.	102
Tableau 11: Variation de la concentration plasmatique (mg/dl) en cholestérol, en triglycérides, en HDL, en LDL et en VLDL chez les rats témoins et les rats traités.	107
Tableau 12: Variation de la teneur du glutathion réduit (nmol/mg de protéines) dans: le foie, les reins, le cœur, les testicules, le cerveau et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.	111
Tableau 13: Variation de la teneur de la malondialdéhyde (MDA) (nmol/mg de protéines) dans: le foie, les reins, le cœur, les testicules, le cerveau et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.	113
Tableau 14: Variation de l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx) (nmol GSH/min/mg de protéines) dans : le foie, les reins, le cœur, les testicules, le cerveau et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.	115

Tableau 15: Variation de l'activité enzymatique de la catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ dégrader/min/mg de protéines) dans : le foie, les reins, le cœur, les testicules, le cerveau et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.

117

Tableau 16: Variation de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD) (U/mg de protéines) dans: le foie, les reins, le cœur, les testicules, le cerveau et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.

119

Liste des Abréviations

- AA** : Acide Aminé
- AAL** : Acide alpha lipoïque
- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- AG** : Acide gras
- AGE** : Equivalents d'acide gallique
- AGNE** : Acide gras non estérifier
- Al**: Aluminium
- ALAT**: Alanine transaminase
- AST**: Aspartate transaminase
- BHT**: Butyl-hydroxy-toluéne
- BSA** : Sérum albumine bovine
- CAT** : Catalase
- CCMH** : Concentration corpusculaire moyen en hémoglobine
- CDNB** : 1-chloro, 2,4-dinitrobenzène
- CE** : Equivalents de catéchine
- CPK**: Créatine phosphokinase
- CPT**: Carnitine palmityl transférase
- DL₅₀** : Dose létal qui tue 50% d'une population
- DNTB** : Acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) ou réactif d'Ellman
- DO**: Densité optique
- DPPH** : 2,2-diphényle-1- picrylhydrazyle
- EDTA** : Ethylène diamine tétra-acétique
- EOA** : Espèces Oxygénées Activées
- GB** : Globules Blancs
- GPx** : Glutathion peroxydase
- GR** : Globules Rouges
- GSH** : Glutathion réduit
- GSSG** : Glutathion oxydé
- GST** : Glutathion S-transférase
- Hb** : Hémoglobine

HT : Hématocrite
IC₅₀: Concentration inhibitrice a 50%
LDH: Lactate déshydrogénase
LDL: Low density lipoprotein
LOOH : Hydroxyde lipidique
LOO[•]: Radical peroxyde
LPO : Les peroxydes lipidiques
MDA : Malondialdéhyde
Mn-SOD : Superoxyde dismutase associée au manganèse
MS : Matière Sèche
NADP : Nicotinamide adénine di nucléotide phosphate
NADPH: Nicotinamide dinucleotide phosphate
NBT: Nitrobluetetrazolium
NOS : Nitrique oxyde synthase
NS : *Nigella sativa*
Pi : Phosphate inorganique
PLT: Plaquette
PC: Poids corporel
PM: poids moléculaire
QE: Equivalents de quercétine
ROS: Reactive oxygen species
SOD: Superoxyde dismutase
TBA: 2-Thiobarbituric acid: L'acide thiobarbiturique
TCA : Trichloroacétique
TCMH : Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine
TG: Triglycerides
U : Unité enzymatique
VGM : Volume globulaire moyen
XO: Xanthine oxydase



TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES

<i>Remerciements</i>	
<i>Résumé</i>	
<i>Abstract</i>	
المخلص	
<i>Liste des figures</i>	
<i>Liste des tableaux</i>	
<i>Liste des abréviations</i>	
<i>Introduction générale</i>	
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre I : Aluminium	
1. Définition	01
2. Propriétés physicochimiques	02
3. Effets toxiques de l'aluminium	02
3.1. Effets hématologiques	02
3.2. Effets osseux	02
3.3. Effets neurologiques	03
3.4. Autres effets	05
4. Aluminium et stress oxydatif	05
5. Toxicocinétique	06
5.1. Exposition	06
5.2. Absorption	06
5.3. Métabolisme et distribution	07
5.4. Elimination	07

Chapitre II : Stress oxydatif	
1. Définition du stress oxydatif	09
2. Radicaux libres	09
3. Espèces réactives de l'oxygène (ERO)	10
3.1. Rôles physiologiques des ERO	11
3.2. Sites de production et mécanismes cellulaires mis en jeux	11
4. Biomarqueurs du stress oxydatif	13
4.1. Peroxydation lipidique	13
4.2. Oxydation des protéines	14
4.3. Oxydation des acides nucléiques	15
5. Pathologies liées aux stress oxydatif	16
6. Systèmes de défense antioxydant	18
6.1. Systèmes antioxydants enzymatiques	19
6.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)	19
6.1.2. Catalase	19
6.1.3. Glutathion peroxydase (GPx)	19
6.1.4. Glutathion S-transférase (GST)	20
6.1.5. Autres enzymes antioxydantes	20
6.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques	20
6.2.1. Glutathion	20
6.2.2. Oligoéléments	21
6.2.3. Vitamine C « acide ascorbique »	21
6.2.4. Vitamine E « tocophérols »	22
Chapitre III : <i>Nigella sativa</i>	
1. Position systématique	24

2. Dénomination	24
3. Description botanique	24
4. Origine et habitat	25
5. Principaux constituants	27
6. Usage en phytothérapie	29
Chapitre VI : Acide alpha lipoïque	
1. Définition	31
2. Structure et propriétés physicochimiques	31
3. Biosynthèse et apport alimentaire	31
4. Absorption et distribution	33
5. Métabolisme	33
6. Elimination	33
7. Mode d'action et effets thérapeutiques	34
7.1. Effet antioxydant	34
7.2. Effet hypoglycémiant	36
7.3. Effet anti-inflammatoire	36
7.4. Autres effets	37
<i>ÉTUDE EXPÉRIMENTALE</i>	
Matériel et méthodes	
1. Etude phytochimique	38
1.1. Matériel végétal	38
1.2. Teneur en flavonoïdes, en tanins et en polyphénols de l'huile de <i>Nigella sativa</i>	38
1.2.1. Dosage des flavonoides totaux	38
1.2.2. Dosage des tanins condensés	39
1.2.3. Dosage des polyphénols totaux	39

1.3. Evaluation du potentiel anti-radicalair	42
1.3.1. Test de DPPH	42
1.3.2. Test de NBT/Riboflavine	43
2. Etude biologique	44
2.1. Animaux et régime	44
2.2. Traitement des rats	45
3. Sacrifices des rats et prélèvement des échantillons	46
3.1. Prélèvement sanguin	46
3.2. Prélèvement des organes	46
4. Détermination de la formule de numération sanguine (FNS)	48
5. Techniques de dosage	48
5.1. Dosage des hormones thyroïdiennes et de la testostérone	48
5.2. Dosage des paramètres biochimiques	48
5.2.1. Détermination de l'activité d'alanine aminotransférase (ALAT/TGP)	48
5.2. 2. Détermination de l'activité d'aspartate aminotransférase (ASAT/TGO)	49
5.2.3. Détermination de l'activité de la phosphatase alcaline (PAL)	50
5.2.4. Détermination de l'activité du lactate déshydrogénase (LDH)	51
5.2.5. Détermination de l'activité de la créatine phosphokinase (CPK)	52
5.2.6. Dosage de la bilirubine totale et directe	53
5.2.7. Dosage du glucose	54
5.2.8. Dosage des protéines totales	55
5.2.9. Dosage d'albumine	56
5.2.10. Dosage de l'urée	57
5.2.11. Dosage de la créatinine	58
5.2.12. Dosage de l'acide urique	59
5.2.13. Dosage du cholestérol	60

5.2.14. Dosage des triglycérides	61
5.2.15. Dosage du HDL-cholestérol	63
5.2.16. Dosage du fer	64
5.3. Dosage des paramètres de stress oxydatif	65
5.3.1. Préparation de l'homogénat	65
5.3.2. Dosage des protéines	65
5.3.3. Détermination du taux du glutathion réduit (GSH)	66
5.3.4. Détermination du taux de la malondialdéhyde (MDA)	67
5.3.5. Détermination de l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx)	69
5.3.6. Détermination de l'activité enzymatique de la catalase	70
5.3.7. Détermination de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD)	71
6. Etude histologique	72
7. Traitement statistique des résultats	73
Résultats et discussion	
Chapitre I: Etude phytochimique	
1. Teneur en flavonoïdes, en tanins et en polyphénols de l'huile de <i>Nigella sativa</i>	74
2. Evaluation de l'activité antioxydante	74
Chapitre II: Impact du chlorure d'aluminium sur la variation de quelques paramètres physiologiques et hématologiques: Effets protecteurs de la supplémentation en huile de nigelle et/ou en acide alpha lipoïque	
1. Variation du Poids corporel	77
2. Variation de la consommation quotidienne d'aliment	77
3. Variation de la consommation quotidienne d'eau de boisson	77
4. Variation du poids relatif de certains organes	79
5. Variation des paramètres hématologiques	81
6. Effet sur la concentration plasmatique en fer sérique	81

Chapitre III: Impact du chlorure d'aluminium sur la variation des hormones thyroïdiennes et de la testostérone: Effets protecteurs de la supplémentation en huile de nigelle et/ou en acide alpha lipoïque	
1. Effet sur la concentration sérique des hormones thyroïdiennes	88
2. Effet sur la concentration sérique en testostérone	88
Chapitre IV: Hépatotoxicité induite par le chlorure d'aluminium: Effets protecteurs de la supplémentation en huile de nigelle et/ou en acide alpha lipoïque	
1. Effet sur l'activité des aminotransaminases	92
2. Effet sur l'activité de la phosphatase alcaline (PAL)	92
3. Effet sur l'activité de lactate déshydrogénase (LDH)	92
4. Effet sur l'activité de la créatine phosphokinase (CPK)	92
5. Effet sur la concentration plasmatique en bilirubine totale et direct	93
6. Effet sur la concentration plasmatique en glucose	93
7. Effet sur la concentration plasmatique en protéines totales et en albumine	93
Chapitre V: Néphrotoxicité induite par le chlorure d'aluminium: Effets protecteurs de la supplémentation en huile de nigelle et/ou en acide alpha lipoïque	
1. Effet sur la concentration plasmatique en urée	102
2. Effet sur la concentration plasmatique en créatinine	102
3. Effet sur la concentration plasmatique en acide urique	102
Chapitre VI: Impact du chlorure d'aluminium sur le profil lipidique: Effets protecteurs de la supplémentation en huile de nigelle et/ou en acide alpha lipoïque	
1. Effet sur la concentration plasmatique en cholestérol	106
2. Effet sur la concentration plasmatique en triglycérides et en HDL (High density lipoprotein)	106
3. Effet sur la concentration plasmatique en LDL (Low density lipoprotein)	106
4. Effet sur la concentration plasmatique en VLDL (Very low density lipoprotein)	106

Chapitre VII: Stress oxydatif induit par le chlorure d'aluminium: Effets protecteurs de la supplémentation en huile de nigelle et/ou en acide alpha lipoïque	
1. Effet sur le taux du glutathion réduit (GSH)	111
2. Effet sur le taux de la malondialdéhyde (MDA)	113
3. Effet sur l'activité du glutathion peroxydase (GPx)	115
4. Effet sur l'activité de la catalase	117
5. Effet sur l'activité de la superoxyde dismutase (SOD)	119
Chapitre VIII: Impact du chlorure d'aluminium sur l'histoarchitecture de certains organes: Effets protecteurs de la supplémentation en huile de nigelle et/ou en acide alpha lipoïque	
1. Etude histologique du foie	125
2. Etude histologique des reins	125
3. Etude histologique du cœur	125
4. Etude histologique des testicules	125
5. Etude histologique du cerveau	126
<i>Conclusions et perspectives</i>	134
<i>Références bibliographiques</i>	137
<i>Activités de recherches</i>	



INTRODUCTION

Introduction

L' aluminium est le métal le plus répandu sur la terre, il constitue 8% de l'écorce terrestre étant par ordre d'abondance le troisième élément de la nature après l'oxygène et le silicium (**Chappuis, 1991; Kintz, 1998**). Son utilisation augmente de plus en plus au cours de ces dernières décennies, actuellement, il se trouve dans une multitude de produits d'utilisation quotidienne (additifs et colorants alimentaires, certains médicaments d'usage courant « antiacides », produits cosmétiques « déodorants, crèmes solaires » et comme adjuvant dans les processus des traitements d'eau), ce qui augmente ses sources d'exposition et rendu son impact toxicologique impossible à ignorer (**Gourier-fréry et fréry, 2004; Mailloux et al., 2011**).

En absence de charge excessive, l'aluminium ne se trouve qu'à l'état de traces dans l'organisme humain et il ne semble pas avoir une fonction biologique essentielle. Par contre, à des doses élevées il est capable d'entraîner des effets nocifs en interférant avec le métabolisme basale induisant ainsi la génération des espèces réactives de l'oxygène (ERO). La surproduction de ces derniers au de la des capacités antioxydantes des systèmes biologiques donne lieu au stress oxydatif qui est impliqué dans l'apparition de plusieurs maladies telles que l'athérosclérose, cancer, les maladies inflammatoires et le diabète... (**Bonnefont-Rousselot, 2007; Borg et Reeber, 2008**). Il est nécessaire de rétablir l'équilibre oxydant/antioxydant afin de préserver les performances physiologiques de l'organisme. Cependant, il a été rapporté que la supplémentation avec les antioxydants réduit le stress oxydatif.

Les plantes constituent une source intéressante de nouveaux composés dans la recherche de molécules bioactives. Malgré son ancienneté, l'évaluation des propriétés phytopharmaceutique, antioxydante et antimicrobienne des principes actifs des extraits provenant de diverses sources végétales continuent à avoir un très grand intérêt.

Nigella sativa appartient à la famille des Ranunculaceae est l'une des plantes médicinales les plus utilisées à travers le monde (**Llinares, 2005; Meziti, 2009**) et plus particulièrement chez les musulmans influencés par la parole prophétique. Le prophète Mohamed (prière et salut d'Allah soient sur lui) a dit: « utilisez dans vos soins la graine de nigelle, c'est un remède contre tous les maux à l'exception de la mort ».

L'huile extrait des graines de cette plante est largement utilisée, dans la médecine traditionnelle depuis des siècles pour traiter les troubles broncho-pulmonaires, gastro-intestinaux et les maladies cardio-vasculaires (Salem, 2005; Gali-Muhtasib *et al.*, 2006). Durant ces vingt dernières années, plusieurs équipes de chercheurs sont intéressées à l'étude de *Nigella sativa*. La plupart des indications revendiquées en médecine traditionnelle ont été confirmées par leurs études de plus, les même études soulignent que l'huile de nigelle a de nombreuses propriétés pharmaceutiques extraordinaire grâce à sa richesse en molécules actifs notamment la thymoquinone la nigellone et les composés phénoliques. Aussi, l'huile de nigelle peut être considérée comme agents antioxydant, anti-inflammatoire, immunomodulateur, antitumoral, antidiabétique et hypotenseur (Gali-Muhtasib *et al.*, 2006 ; Ahmad *et al.*, 2013).

Parallèlement, de nombreux travaux sont intéressés aux propriétés antioxydantes des composés aussi différents que les molécules bioactifs extrait des plants. En effet, ces travaux sont intéressés à une classe particulière correspond à des substances qui présentent la caractéristique chimique de posséder un groupement thiol (-SH) (Abdel-Zaher *et al.*, 2008; Ghibu *et al.*, 2008; Yi *et al.*, 2011). L'acide alpha lipoïque encore dénommé acide thioctique ou acide 1,2-dithiolane-3-pentanoïque est l'un de ces composées. C'est un cofacteur enzymatique des acides α -cétonique, synthétisé en faible quantité par notre organisme. Il possède également des effets antioxydants, hypoglycémiant et anti-inflammatoires. De plus, il est capable de chélater les métaux lourds et de prévenir les symptômes de vieillissement. Il agit en milieu hydrophile comme en milieu hydrophobe. Afin d'optimiser toutes ses fonctions une supplémentation s'avère nécessaire. En revanche, son mécanisme d'action au niveau cellulaire n'est pas connu avec précision jusqu'à l'heure actuelle (Caylak *et al.*, 2008; Winiarska *et al.*, 2008 Li *et al.*, 2013).

L'objectif de la présente étude consiste à déterminer l'effet toxique du **chlorure d'aluminium** et l'implication de ce dernier dans la genèse d'un stress oxydatif d'une part et d'évaluer l'effet antioxydant de l'huile de nigelle et/ou de l'acide alpha lipoïque d'autre part. Il s'agit d'une étude expérimentale menée au laboratoire sur des rats mâles adultes de la souche wistar soumis à un traitement par le chlorure d'aluminium en présence et en absence de l'huile de nigelle et/ou de l'acide alpha lipoïque.

Le présent travail est réparti en deux parties. La première partie, bibliographique, rassemble une synthèse des données actuelles concernant l'aluminium, le stress oxydatif, la nigelle (*Nigella sativa*) et l'acide alpha lipoïque.

La deuxième partie, expérimentale, consiste à évaluer le pouvoir antioxydant et la teneur en composés phénoliques (polyphénols, flavonoïdes, tanins) de l'huile de nigelle in vitro. Elle consiste également à étudier les effets modulateurs de la supplémentation en huile de nigelle et/ou en acide alpha lipoïque afin d'atténuer les dégâts oxydatifs au niveau sanguin et tissulaire des rats traités par le chlorure d'aluminium en évaluant :

- ✓ Les paramètres physiologiques (poids corporel, consommation d'aliment et poids relatifs de certains organes).
- ✓ Les paramètres biochimiques et hématologiques.
- ✓ L'exploration du statut antioxydant et de la peroxidation lipidique (MDA).
- ✓ Les changements histologiques au niveau de certains organes (foie, reins, cerveau...).

Enfin, nous discuterons l'ensemble des résultats obtenus dans cette étude, et on suggère quelques perspectives à ce travail de recherche.



SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE



CHAPITRE I

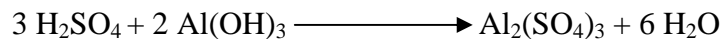
ALUMINIUM

CHAPITRE I : L'ALUMINIUM

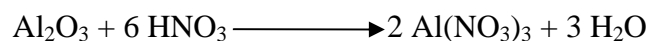
1. Définition

L'aluminium du latin « alumen », qui signifie léger, est le métal le plus répandu sur la terre, il constitue 8% de l'écorce terrestre étant par ordre d'abondance le troisième élément de la nature après l'oxygène et le silicium (**Chappuis, 1991; Kintz, 1998**). On ne l'y trouve cependant pas à l'état libre mais combiné à d'autres éléments sous forme des sels et d'oxydes. Les composés les plus fréquents sont les aluminés et les hydroxydes provenant essentiellement de la bauxite, les silicates provenant de l'argile et des micas, et des formes hydrosolubles complexées aux sulfates « alum », nitrates, chlorures en présence de matières organiques dissoutes. Ces derniers sont produits industriellement par différents réactions chimiques (**Bounias, 1999; Vargel, 1999**).

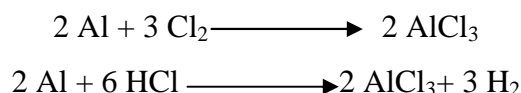
- **Sulfate d'aluminium $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$** : formé par la combinaison de l'acide sulfurique (H_2SO_4) et l'hydroxyde d'aluminium [$\text{Al}(\text{OH})_3$]. Il est disponible sous différentes formes solides.



- **Nitrate d'aluminium $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$** : est un sel de l'acide nitrique et de l'aluminium qui peut être préparé par action de l'acide nitrique sur le métal ou bien par action de l'acide nitrique sur le trioxyde de dialuminium. Il existe sous forme d'un hydrate cristallin.



- **Chlorure d'aluminium AlCl_3** : produit suite à une réaction directe entre les éléments aluminium et le chlore ou bien l'acide chlorhydrique. Il existe sous forme d'un hydrate cristallin.



L'aluminium est un élément non essentiel pour l'homme. Contrairement, il est un composant fondamental des roches, du sol et des eaux souterraines. L'acidité facilite la dissolution, la mobilisation ainsi que l'absorption de l'aluminium (**Bounias, 1999; Dorey, 2008**).

2. Propriétés physicochimiques

L'aluminium est un métal léger gris argenté brillant, n'a pas d'odeur ni de saveur, qui présente des propriétés physicochimiques particulièrement importantes. Son symbole chimique est Al portant le numéro 13 dans la classification périodique des éléments (avec 27 protons et neutrons, 13 électrons répartie sur 3 orbites avec 3 électrons de valence) il n'a pas d'isotopes. C'est un métal de faible densité $2,7 \text{ g/cm}^3$, avec une masse atomique de 27 g/mol , son point de fusion est de 660°C et son point d'ébullition est de 2467°C (Kintz, 1998; Vargel, 1999). Il s'agit d'un métal amphotère qui réagit avec les acides et les bases formant ainsi des sels stables à $\text{pH} \leq 3$ et des aluminates à $\text{pH} \geq 11$. Il est quasiment soluble en milieu acide, cette solubilité diminuée avec l'augmentation du pH, il est totalement insoluble à pH neutre (Chappuis, 1991; Vargel, 1999).

3. Effets toxiques de l'aluminium

La dose létale (DL_{50}) de l'Al varie de 0,14 à 6,20 g d'Al/Kg du poids corporel, ses effets toxiques relèvent essentiellement d'exposition chroniques contrairement à sa toxicité aiguë qu'est très faible (Gourier-fréry et fréry, 2004). Les effets de l'intoxication aluminique sont principalement observés au niveau du système nerveux, du système osseux et du système sanguin (Kintz, 1998; Dorey, 2008).

3.1. Effets hématologiques

L'aluminium agit en compétition avec le fer sur les sites de fixation à la transferrine inhibant ainsi la synthèse de l'hémoglobine. Aussi il perturbe l'érythropoïèse par action direct, en diminuant la durée de vie des érythrocytes et d'hématocrite avec attente de la lignée rouge (microcyte et hémoglobine) ce qui provoque l'apparition d'une anémie microcytaire hypochrome. De plus, l'Al empêche les plaquettes sanguines de s'agglomérer pour former le caillot et augmentant ainsi le temps de saignement. Ces effets sont réversibles à l'arrêt de l'exposition et lors de traitement par les chélateurs de l'aluminium (Gourier-fréry et fréry, 2004; Mailloux *et al.*, 2011).

3.2. Effets osseux

L'aluminium est susceptible d'entraîner une déminéralisation osseuse suite à une déplétion phosphorée accompagnée d'une perturbation métabolique de la vitamine D_3 (Chappuis, 1991; Kintz, 1998). De plus l'intoxication aluminique est caractérisée par:

- La présence des dépôts aluminiques le long du front de minéralisation.
- Une réduction de la vitesse de calcification et une augmentation de l'épaisseur des travées ostéoïdes (Dorey, 2008).

Les mécanismes d'actions évoqués pour illustrer l'impact de l'Al dans toutes ces perturbations semblent faire intervenir à la fois:

➤ **Des effets aluminiques directs**

- Formation des sels basiques insolubles entre l'Al et le phosphate dans le tube digestive ce qui entraînent une augmentation de l'excrétion fécale du phosphate et par conséquent diminution de son excrétion urinaire, ainsi que son absorption intestinale provoquant une hypophosphatémie.
- L'Al agit sur le squelette en réduisant fortement la formation de l'os, activant la déminéralisation osseuse et produisant ainsi une ostéomalacie résistante au traitement par la vitamine D ou ses métabolites. Elle s'exprime le plus souvent par des douleurs et des arthralgies, puis surviennent des fractures osseuses spontanées, des déformations osseuses sévères et une myopathie des muscles proximaux qui peut devenir invalidante.
- L'Al constitué un obstacle à l'incorporation de calcium dans l'hydroxyapatite (**Chappuis, 1991; Bounias, 1999; Larwerys et Lison, 2007**).

➤ **Des effets aluminiques indirects**

- L'aluminium réagir par interférence avec la parathormone (**Gourier-fréry et fréry, 2004**).

3.3. Effets neurologiques

Les cellules nerveuses présentent une sensibilité particulière à l'Al (**Berthon, 2002; Dorey, 2008**). Il est donc reconnu comme un facteur neurotoxique responsable de différentes maladies neurodégénératives entre autres:

- L'encéphalopathie: considérée comme l'une des premières manifestations révélatrices de la toxicité aluminique. L'encéphalopathie associée dans une première phase des troubles de la parole et de l'écriture avec lenteur de l'élocution, dystonie et dyspraxie, puis apparaissent des trémulations, des myoclonies diffuse, une myofasciite a macrophage, une dyspraxie des mouvements de type cérébelleux, l'épilepsie et troubles de la mémoire ainsi que de la concentration et des troubles psychiatriques (trouble de la personnalité, dépression, troubles paranoïdes, hallucination, des épisodes confusionnelles avec perte de la conscience pouvant conduire au décès) (**Chappuis, 1991; Kintz, 1998; Gourier-fréry et fréry, 2004**).
- L'Alzheimer: se caractérise par une dégénérescence neurofibrillaire (présence d'agrégat constitués de paires hélicoïdales de filaments appariés) (**Bounias, 1999; Berthon, 2002**).

- Troubles des fonctions psychomotrices: ont été également mis en évidence, manifestant principalement par des troubles de l'humeur à type d'irritabilité et de fatigue avec troubles de l'attention, des troubles de la motricité (coordination motrice), de la mémoire et de l'organisation visuospatiale (perturbation des tests visuels) (**Gourier-fréry et fréry, 2004; Larwerys et Lison, 2007**).
- Changement histopathologique: dans le cerveau caractériser par une vacuolisation cytoplasmique et/ou nucléaire avec dégénérescence neuronale (**Berthon, 2002; Larwerys et Lison, 2007**).

En effet, différents mécanismes sont évoqués pour expliquer la neurotoxicité de l'Al:

➤ **Mode d'action direct**

- Provoque la dégénérescence neurofibrillaire par modification des protéines du cytosquelette des neurones avec formations, accumulation et agrégation d'âmes insolubles de la protéine β -amyloïde, de la protéine tau et d'autres protéines neurofibrillaires (**Larwerys et Lison, 2007**).
- Provoque la dégénérescence des astrocytes ce qui accélère la mort de tissus nerveux qu'ils nourrissent. De plus, l'Al agit en suscitant l'apoptose (les cellules nobles du cerveau, les neurones réagissent très rapidement à l'apoptose) (**Larwerys et Lison, 2007**).
- Perturbe la communication intercellulaire entre les cellules gliales notamment les astrocytes ce qui entraîne un déséquilibre de l'homéostasie (échange d'ions et de certains métabolites, recaptage des neurotransmetteurs ainsi que le passage des hormones) nécessaire au bon fonctionnement du système nerveux (**Berthon, 2002**).

➤ **Mode d'action indirect:** l'Al agit sur l'activité des différents enzymes neurocellulaires:

- Inhibition de l'acétylcholinestérase de façon non compétitive, entraînerait des perturbations de la neurotransmission cholinergique (**Chappuis, 1991; Larwerys et Lison, 2007**).
- Inhibition de l'activité hexokinase et la glucose-6-phosphate déshydrogénase dans le cerveau suite à une combinaison entre l'Al et ATP (**Chappuis, 1991**).
- Inhibition du transport de la L-glutamine et de l'acide γ -aminobutyrique (GABA) ainsi que d'autres amines neurotransmettrices des synaptosomes suite à une interférence avec la $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ et la $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}\text{ATPase}$ aboutissant donc à l'altération des phénomènes de captation et largage de ces acides aminés neurotransmettrices et autres neurotransmetteurs par la membrane neuronale présynaptique. Ce qui entraîne leurs accumulations dans certaines régions du cerveau (**Larwerys et Lison, 2007**).

- Inhibition de la dihydroptéridine réductase entraînant une chute de la concentration en tétrahydrobioptérine et par voie de conséquence de la tyrosine et des neurotransmetteurs au niveau du cerveau (**Chappuis, 1991; Berthon, 2002**).
- Inhibition des enzymes de réplication nucléaire entraînant une inhibition de la transcription de l'ADN en ARN suite à une fixation facultative de l'Al sur l'ADN (**Larverys et Lison, 2007; Dorey, 2008**).
- Perturbation de l'homéostasie calcique intracellulaire suite à l'interférence au niveau de la Ca^{2+} ATPase enzyme majeur dans l'extrusion du calcium. La perturbation des systèmes de régulation du Ca^{2+} intercellulaire peut causer des lésions neuronales irréversibles (**Berthon, 2002**).
- Changement dans la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE): augmentation de la perméabilité au sucrose, à la thyroxine, au cortisol, à la prolactine, à l'hormone de croissance et à l'hormone lutéinisante (**Chappuis, 1991; Berthon, 2002**).

3.4. Autres effets

L'Al provoque une fibrose (ou aluminose) voire une granulomatose accompagnée d'une alvéolite à lymphocytes T auxiliaires similaire à la béryllose en cas d'exposition massive. Une protéinase alvéolaire, une pneumonie interstitielle chronique une symptomatologie d'asthme et d'hyperréactivité bronchique de type irritatif (connue de longue date sous le non de « potroom asthma »). Ces effets sont observés suite à une irritation direct du système respiratoire par le métal (**Kintz, 1998; Gourier-fréry et fréry, 2004; Dorey, 2008**).

D'autre part, l'Al a une influence sur la motilité par inhibition des contractions intestinales (induit par l'acétylcholine) induisant ainsi des cas de constipation (**Bounias, 1999; Dorey, 2008**). De plus, l'Al interfère avec le métabolisme de certains acides aminés présents dans le sang et provoque des changements structuraux des lipoprotéines. Aussi, il perturbe le métabolisme des graisses et favorise l'obésité (**Berthon, 2002; Fxley, 2003**).

4. Aluminium et stress oxydatif

Dans les organismes vivant l'Al provoque un état du stress oxydatif par la production des radicaux libres. En effet, suite de sa liaison aux groupes phosphates des phospholipides, l'aluminium favorise la désorganisation et la discontinuité de la membrane plasmique favorisant ainsi le passage de certaines espèces chimiques telle que les ions métalliques (Fe^{+2} par exemple) qui peuvent initier le processus radicalaire par le biais de la réaction de Fenton.

Les radicaux formés réagissent avec tous les composés cellulaires (lipides, protéines, ADN) modifiant leurs structures et leurs fonctions biologiques. De plus, l'aluminium inhibe l'activité de plusieurs enzymes antioxydantes, il peut même diminuer le taux du GSH (**Berthon, 2002; Fxley, 2003**).

5. Toxicocinétique

5.1. Exposition

A l'exception des cas d'exposition pulmonaire dans un contexte professionnel, l'exposition à l'Al est essentiellement alimentaire (les additifs alimentaires comme les colorants, les antiagglomérants, les affermissants, les épaississants, les stabilisants ou correcteur d'acidité...) et médicamenteuse (les médicaments antiacides, les pansements gastro-intestinaux, les vaccins, les liquides de dialyse et la nutrition parentérale prolongée, ainsi que des céramiques et ciments à base d'Al pour des implants en dentisterie, chirurgie maxillo-faciale et orthopédique).

De plus, l'utilisation de l'Al dans la fabrication d'un grand nombre de produits cosmétiques, constitue également une source d'exposition (Figure 1) (**Bounias, 1999; Gourier-fréry et fréry, 2004; Mailloux et al., 2011**).

5.2. Absorption

L'Al peut pénétrer dans l'organisme humain par voie respiratoire, par la peau et les muqueuses, par voie digestive et par voie parentéral. Quelle que soit la voie de contact l'Al est très faiblement absorbé. L'absorption s'effectuerait essentiellement au niveau du tractus digestif. Le lieu d'absorption est différent selon les auteurs, selon **Feinroth, (1982)** elle s'effectuerait au niveau du jéjunum et de l'iléon, **Alfrey, (1986)** suggère que l'absorption se situerait essentiellement au niveau de l'estomac et du duodénum proximal.

En revanche, de nombreux facteurs sont susceptibles d'influencer l'absorption et la rétention de l'Al. Elle dépend de la spéciation du composé (c'est à dire la forme chimique sous la quelle l'Al est présent dans le milieu: il est à noter, que la liaison de l'Al avec certains acides organiques « acide citrique... » augmente son absorption. Tandis que, la présence de phosphate, de fluorure et d'acide silicique diminue l'absorption d'Al, suite à la formation des complexes peu solubles), de la solubilité du composé dans le milieu biologique considéré, elle même dépendante du pH du milieu, ainsi que de la granulométrie du composé (le pourcentage d'Al qui passe dans le sang diminue si la dose ingérée augmente) (**Suntherland et Greger, 1998; Berthon, 2002**).

5.3. Métabolisme et distribution

Immédiatement après son absorption, l'Al s'associe aux protéines sériques essentiellement à la transferrine (80%), mais également à l'albumine (10%) et à d'autres protéines de bas poids moléculaire. Le transport sanguin de l'Al vers les organes cibles dans les quelles il est stocker, s'effectue par l'intermédiaire de ces protéines (**Berthon, 2002; Gourier-fréry et fréry, 2004; Viala et Botta, 2005**). L'Al s'accumule privilégiement dans certains tissus, il s'agit principalement :

- Du foie: au niveau des hépatocytes qui semble assez bien tolérer l'accumulation du l'Al.
- Du cerveau: l'Al arrive à traverser la barrière hémato-encéphalique pour venir s'accumuler dans le cerveau. En plus, il est capable d'endommager cette barrière permettant ainsi la perméabilité d'autres substances indésirables.
- De l'os: l'Al se dépose le long du front de minéralisation ainsi qu'au niveau des lignes cimentantes avec concentration aluminique ponctuelle extracellulaire sous forme de microcristaux.
- Des parathyroïdes: l'Al se concentre dans les polyphagosomes et les mitochondries (**Gourier-fréry et fréry, 2004; Viala et Botta, 2005; Mailloux et al., 2011**).

Le métabolisme de l'aluminium est conditionné par la spéciation de l'aluminium, le pH du milieu et l'affinité de l'élément aux protéines de transport.

5.4. Elimination

L'excrétion de l'Al s'effectue soit par voie urinaire soit par la matière fécale. La voie d'élimination majoritaire dépend de la voie d'exposition et de la forme chimique du métal. La partie d'Al qui n'a pu passer la barrière intestinale pour arriver dans le sang est excrétée par les matières fécales suite à son passage par le cycle entérohépatique. Tandis que, la partie qui a passée la barrière intestinale est excrétée par les reins. Cette excrétion est effectuée suite à une filtration glomérulaire de l'Al qu'est ensuite réabsorbé au niveau des cellules du tube contourné proximal. Au sein des lysosomes l'Al est insolubilisé sous forme de phosphate, ensuite il est excrété dans la lumière urinaire. Le temps de demie vie d'élimination de l'aluminium est dépendant de la durée d'exposition (**Suntherland et Greger, 1998 ; Berthon, 2002; Gourier-fréry et fréry, 2004**).

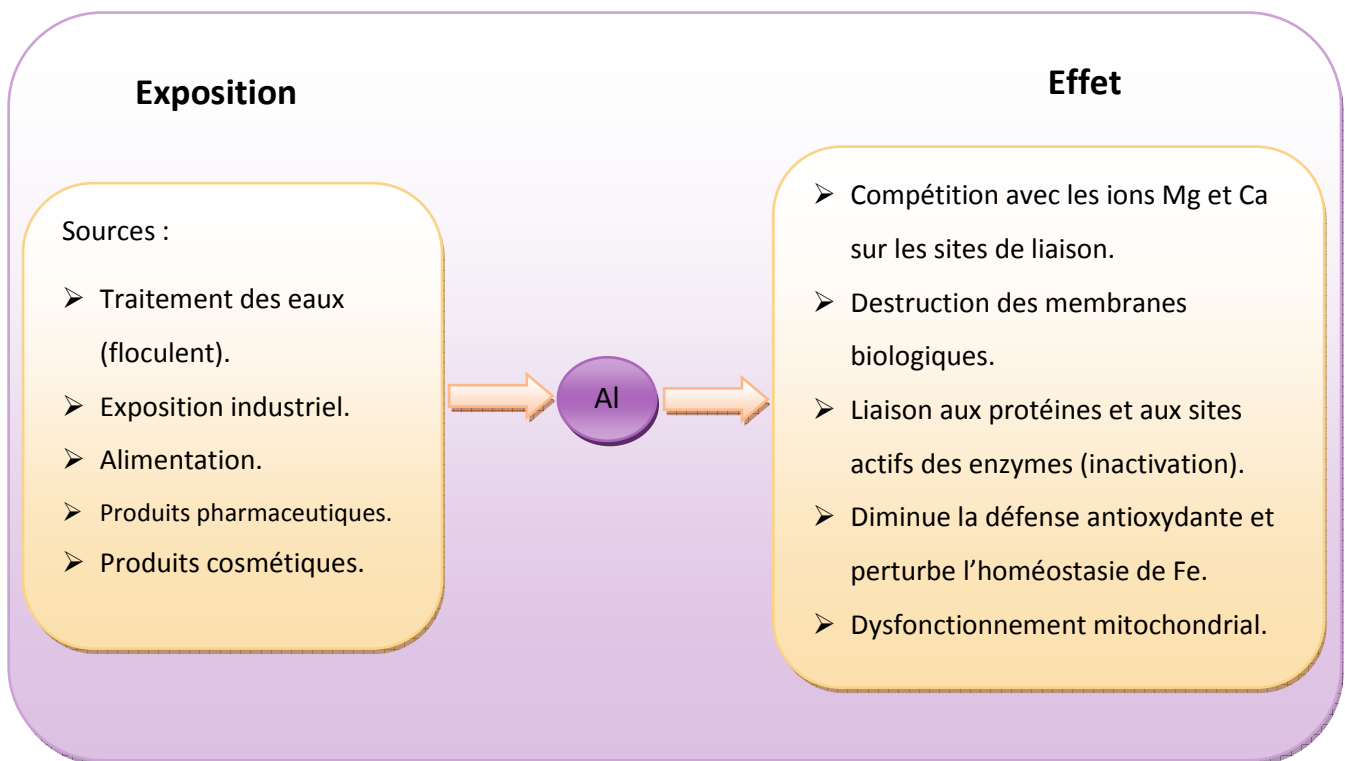


Figure 1: Sources d'exposition à l'aluminium et leurs principaux effets toxicologiques (Mailloux *et al.*, 2011).



CHAPITRE II

STRESS OXYDATIF

CHAPITRE II : STRESS OXYDATIF

1. Définition du stress oxydatif

Le stress oxydatif se définit comme étant le résultat d'un déséquilibre entre la formation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) à caractère prooxydant et les antioxydants qui régulent leurs production, en faveur des premières, avec comme conséquence l'apparition des dégâts souvent irréversibles (**Pincemail *et al.*, 2001; Aourousseau, 2002; Bonnefont-Rousselot, 2007**). Le stress oxydatif peut avoir une:

➤ Origine endogène

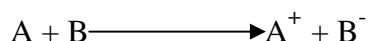
- Déficit nutritionnel.
- Phénomènes inflammatoires chroniques ou aigus.
- Mutation inactivant une des enzymes du système antioxydant (**Aourousseau, 2002; Soares, 2005; Moussard, 2006**).

➤ Origine exogène

- Sources productrice d'ERO: soleil, irradiation, intervention chirurgicales (transplantation d'organes, pontages coronariens).
- Habitude de vie non adéquate (tabagisme, consommation excessive d'alcool), prise de la pilule contraceptive et exercice physique intense ou mal géré (**Bonnefont-Rousselot *et al* in Delattre *et al.*, 2003; Pincemail et defraigne, 2004**).

2. Radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) contenant un ou plusieurs électrons non appariés dit célibataires sur son orbitale externe (couche de valence). L'état radicalaire est désigné par un point en haut à droite symbolisant l'électron célibataire (x^{\cdot}) (**Aourousseau, 2002; Pincemail et defraigne, 2004; Horn *et al.*, 2005**). Un radical libre peut se former soit par scission homolytique d'une liaison covalente, soit par transfert monoélectronique (**Poortmans et Boisseau, 2003; Marieb, 2008**) Selon le schéma suivant:



Un radical libre est très instable, très réactif et possède une durée de vie très limitée, car il cherche à réappareiller son électron célibataire soit par l'acceptation d'un autre électron soit par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule (**Poortmans et Boisseau, 2003; Macardle et al., 2004; Moussard, 2006**). La probabilité d'aller vers l'une ou l'autre de ces deux possibilités dépend essentiellement de l'instabilité du radical libre considéré, si cette instabilité est modérée la probabilité d'accepter un second électron est grande et dans ce cas le radical libre ne représente qu'une étape transitoire dans une réaction d'oxydoréduction classique, si au contraire cette instabilité est importante l'électron libre est rapidement transféré sur une autre molécule (**Gardés-Albert et al., 2003; Horn et al., 2005; Marieb, 2008**).

Parmi les espèces radicalaires formées dans la cellule, on distingue celles dites primaires qui jouent un rôle particulier en physiologie, et celles dites secondaires qui se forment par réaction des radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (**Aurousseau, 2002; Favier, 2003; Horn et al., 2005**).

3. Espèces réactives de l'oxygène (ERO)

L'appellation espèces réactives de l'oxygène (reactive oxygen species ROS) inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit (radical superoxyde (O_2^{\cdot}), radical hydroxyle ($\cdot OH$) monoxyde d'azote (NO^{\cdot}), radical peroxyde (RO_2^{\cdot}), radical alkoxyde (RO^{\cdot})), mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires (peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), nitroperoxyde ($ONOOH$), acide hypochlorique ($HOCl$), oxygène singulet (1O_2)) qui peuvent être des précurseurs d'autres radicaux (**Horn et al., 2005; Masson, 2007**).

L'instabilité des ERO rend difficile leur mise en évidence au niveau des différents milieux biologiques. Leurs constantes de vitesse réactionnelle varient selon leurs natures, elles sont très élevées et peuvent aller de 10^5 à $10^{10} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ avec une durée de vie très courte de la nano à la milli seconde. En effet, plusieurs ERO peuvent être à l'origine d'une grande toxicité du fait qu'elles sont capables de diffuser et gagner des locations sensibles où elles peuvent interagir et causer des dommages à longue distance de leurs sites de production (**Kohen et Nyska, 2002; Kocchilin-Ramonatoxo, 2006**).

3.1. Rôles physiologiques des ERO

- Ils ont impliqué dans le processus de signalisation cellulaire.
- Médiateurs régulant des fonctions biologiques comme la vasodilatation capillaire et les messages entre neurones.
- Ils agissent comme des messagers secondaires capables:
 - ✓ De réguler les phénomènes d'apoptose.
 - ✓ D'activer des facteurs de transcription des gènes impliqués dans la réponse immunitaire.
 - ✓ De moduler l'expression des gènes de structure codant pour les enzymes antioxydantes (**Poortmans et Boisseau, 2003; Krid, 2008**).

3.2. Sites de production et mécanismes cellulaires mis en jeu

Les radicaux superoxydes O_2^{\cdot} sont des radicaux relativement peu réactive par eux-mêmes mais dont la toxicité provient du fait qu'ils peuvent donner naissance à des composés plus réactifs. En effet, ils sont à l'origine de la plupart des ERO. Ces derniers apparaissent au cours des différents types de réactions biochimiques (essentiellement enzymatiques) découlant de plusieurs sources (**Poortmans et Boisseau, 2003; Macardle *et al.*, 2004; Borg et Reeber, 2008**).

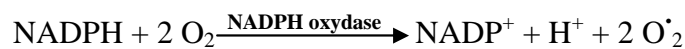
➤ Réactions de réduction monovalente

Suit à des fuites électroniques au niveau du complexe I (NADH/ubiquinone réductase) et du complexe III (ubiquinon/cytochrome c oxydoréductase) lors du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, la réduction incomplète de O_2 par ces électrons est possible et conduit à la formation du radical superoxyde (O_2^{\cdot}), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) puis le radical hydroxyle ($\cdot OH$). Elle constitue le principal site de production des ERO (**Poortmans et Boisseau, 2003; Chiarugi et Fiaschi, 2007**).

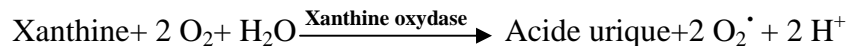
➤ Réactions enzymatiques

D'une façon générale, toutes réactions enzymatiques faisant intervenir de l'oxygène sont susceptibles d'être à l'origine d'une production d' O_2^{\cdot} , de nombreuses enzymes sont mises en jeu:

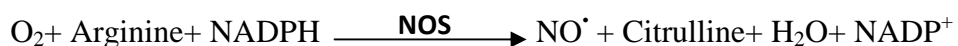
- **NADPH oxydase:** situé sur la membrane des cellules phagocytaires (polynucléaires et macrophages), et il joue un rôle clé dans la phagocytose. En réponse à des facteurs physiologiques (inflammation, infection, insulino-résistance) la NADPH oxydase va être phosphorylée lors de l'endocytose pour former la NADPH oxydase active capable de réduire l'oxygène en radical superoxyde entraînant ainsi la production de ses dérivés de réduction indispensable à la digestion du matériel phagocyté. Au cours de cette réaction le NADPH elle-même est réduit en NADP^+ avec libération d'une molécule d'hydrogène (Gardés-Albert *et al.*, 2003; Leonard *et al.*, 2004; Afonso *et al.*, 2007; Valko *et al.*, 2007). Selon la réaction globale:



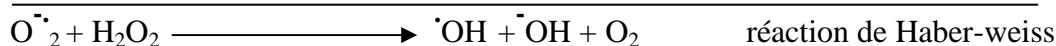
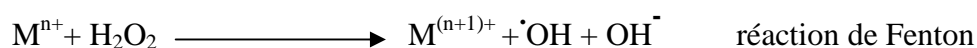
- **Xanthine déshydrogénase:** située dans le foie et la muqueuse de l'intestin grêle, cette enzyme est impliquée dans les processus d'ischémie-reperfusion et dans le catabolisme de l'ATP. En situation d'ischémie cette enzyme est convertie en xanthine oxydase (sous l'action des enzymes protéolytiques) catalyse l'oxydation de la xanthine en acide urique. Dans cette réaction, l'oxygène agit comme un accepteur d'électrons et il est réduit en O_2^{\cdot} (Fontaine *et al.*, 2002; Moussard, 2006).



- **Cytochromes P450 (Cyt P450):** située au niveau des réticulums endoplasmiques et des microsomes, il est capable de générer des ERO au cours de la synthèse des prostaglandines et des leucotréines ainsi que durant le catabolisme de certains xénobiotiques grâce à son activité mono oxygénase (Poortmans et Boisseau, 2003; Moussard, 2006).
- **Nitrique oxyde synthase (NO synthase):** dont l'activité principale est la biosynthèse du monoxyde d'azote (NO^{\cdot}) par l'oxydation de l'un des atomes N terminaux de la L-arginine. Cette réaction se déroule en deux étapes la première transforme le substrat L-arginine en l'intermédiaire N_ω -hydroxy-L-arginine (NOHA), la seconde transforme NOHA en l-citrulline avec libération de NO^{\cdot} . Le NO^{\cdot} peut réagir avec un radical superoxyde (O_2^{\cdot}) pour former le peroxy-nitrite (ONOO^{\cdot}) qui peut secondairement se décomposer en d'autres oxydants (NO_2^{\cdot} , OH^{\cdot} ...) (Favier, 2003; Luis *et al.*, 2004).



- **Cyclooxygénases et lipoxygénases:** d'une manière généralement accessoire ces enzymes peuvent générer des ERO (Kohen et Nyska, 2002).
- **Oxydases (la glycoxylate oxydase et D-aminoacide oxydase):** présentes dans le foie et plus particulièrement dans les peroxysomes peuvent catalyser directement la réduction divalente de l'oxygène moléculaire produisant ainsi le peroxyde d'hydrogène sans formation du radical superoxyde (Kohen et Nyska, 2002; Valko *et al.*, 2007).
- **Réaction avec les métaux:** au cours du quelle les ions métalliques (fer, cuivre...) et les métaux toxiques interagissent avec le peroxyde d'hydrogène H₂O₂, produisant un radical hydroxyle, selon le mécanisme suivant:



M représente un cation métallique au degré d'oxydation n ou n+1.

(Poortmans et Boisseau, 2003; Leonard *et al.*, 2004; Borg et Reeber, 2008).

- **Réactions d'auto-oxydation:** certaines molécules tels que le glucose, l'hémoglobine, les monoamines (dopamine, adrénaline et la noradrénaline), des flavines, la L-DOPA, glycéraldéhyde des thiols (par exemple, la cystéine), le FMNH₂, le FADH₂,... sont susceptibles de s'oxyder facilement, en transférant un électron sur la molécule d'O₂, et libérant ainsi un radical superoxyde (Gardés-Albert *et al.*, 2003; Moussard, 2006).

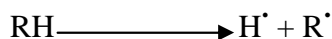
4. Biomarqueurs du stress oxydatif

4.1. Peroxydation lipidique

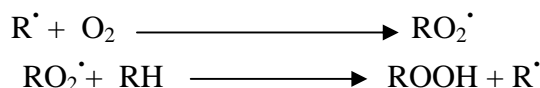
La bicouche lipidique des membranes cellulaires constitue la cible privilégiée de l'attaque radicalaire à cause de sa richesse en acides gras polyinsaturés. La détérioration oxydative de ces acides gras est appelée peroxydation lipidique (Figure 2) (Graille, 2003; Martini et Seiller, 2006; Bonnefont-Rousselot, 2007).

La peroxydation lipidique comporte une cascade de réactions qu'on peut les diviser en trois étapes:

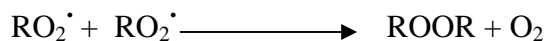
- **L'initiation:** l'attaque initiale d'acide gras s'effectue sur le groupement méthylène (CH₂) séparant deux doubles liaisons, par un radical hydroxyle entraînant ainsi l'arrachement d'un atome d'hydrogène ceci aboutit à la formation d'un diène conjugué (R[•]) (**Gardés-Albert *et al.*, 2003; Borg et Reeber, 2008**).



- **La propagation:** durant cette phase, le diène conjugué donnera naissance au radical peroxy en présence d'oxygène moléculaire. Ce radical peroxy subisse une série de réaction en chaîne avec un autre acide gras polyinsaturé formant ainsi un nouveau radical R[•] (qui peut réagir avec O₂ pour former un autre radical RO₂[•]) et un hydroperoxyde (ROOH) (**Fontaine *et al.*, 2002; Favier, 2003; Masson, 2007**). Ce dernier peut s'oxyder en aldéhydes très réactifs notant à titre d'exemple: l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), et le 4-hydroxynonéanal (4-HNE) qui sont très étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidiques (**Aurousseau, 2002; Durand et Beaudoux, 2008**).



- **La terminaison:** la réaction en chaîne se termine au moment de la recombinaison de deux diènes ou s'il y'a réduction et neutralisation des hydroperoxydes par la glutathion peroxydase ou la vitamine E intercalées dans la bicouche lipidique (**Graille, 2003; Leonard *et al.*, 2004**).



4.2. Oxydation des protéines

L'oxydation radicalaire des protéines est principalement initiée par le radical hydroxyle (OH[•]), et elle est fréquemment influencée par les cations métalliques en présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ou d'hydroperoxydes (ROOH). Les protéines comportant des acides aminés (AA) soufrés et des AA aromatiques sont les plus sensibles aux attaques radicalaires (**Martini et Seiller, 2006; Durand et Beaudoux, 2008**). On classe ces réactions d'oxydations en trois catégories:

- **Oxydation des chaînes latérales des acides aminés:** l'action des RL porte sur les chaînes latérales de certains AA, les cibles majeures sont les AA soufrés, basiques et aromatiques. L'attaque radicalaire produit des AA anormaux en fonction de la nature du radical oxydant (Figure 3 et Tableau 1) (**Bonnefont-Rousselot *et al* in Delattre *et al.*, 2003; Favier, 2003; Poortmans et Boisseau, 2003**).
- **Oxydation de la chaîne polypeptidique:** cette oxydation est essentiellement initiée par le radical $\cdot\text{OH}$ qui réagit avec le carbone α d'une liaison peptidique, en donnant naissance à un radical centré sur ce carbone avec le départ d'un atome d'hydrogène (**Gardés-Albert *et al.*, 2003; Borg et Reeber, 2008**).
- **Lipo-oxydation des protéines:** c'est-à-dire oxydation des protéines par des composés issus de la peroxydation lipidique (4-HNE, MDA). Le 4-HNE forme des produits d'addition par l'intermédiaire de sa double liaison avec les chaînes latérales de la lysine ou de l'histidine ou de la cystéine des protéines, conduisant ainsi à la formation des protéines carbonylées. Le MDA réagit avec le groupement amine de la chaîne latérale des résidus lysine, avec formation d'une base de schiff (**Fontaine *et al.*, 2002; Gardés-Albert *et al.*, 2003**).

4.3. Oxydation des acides nucléiques

Les acides ribonucléiques et désoxyribonucléiques (ARN et ADN) sont aussi des cibles privilégiées de l'oxydation radicalaire. Le radical $\cdot\text{OH}$ réagit directement avec les bases (puriques et pyrimidiques), les sucres (ribose et désoxyribose) et les protéines nucléaires en s'additionnant sur les doubles liaisons créant ainsi un grand nombre de dommages (Figure 4) (**Favier, 2003; Moussard, 2006**). On peut noter quatre classes principales de ces derniers:

- Les coupures simples et double brin.
- Les pontages ADN-ADN et les pontages ADN-protéine.
- Modification de certaines bases.
- Les aldéhydes réactifs issus de la peroxydation lipidique (MDA et le 4-HNE) peuvent s'ajouter au groupe amine des bases de l'ADN et forment des adduits intercaténaires (additionnement du groupement carbonyle) constituant ainsi la dernière classe des dégâts oxydatifs de l'ADN (**Levin, 2002; Moussard, 2006; Borg et Reeber, 2008**).

5. Pathologies liées aux stress oxydatif

Le stress oxydatif est considéré comme un facteur déclenchant de plus d'une centaine de pathologies telles que: Dermatose, parkinson, pancréatite, hépatite C, arthrite, rhumatoïdes, diabète, athérosclérose, cataracte, cancers et maladies cardiovasculaires (**Pincemail et Defraigne, 2004; Borg et Reeber, 2008; Durand et Beaudeau, 2008**).

Tableau 1: Principaux produits d'oxydation de quelques acides aminés (Bonfont-Rousselot et al in Delattre et al., 2003).

Acide aminé	Radical ou composé pro-oxydant	Produit d'oxydation
Cystéine	$\cdot\text{OH}$	Cystine Acide Cystéique
Méthionine	$\cdot\text{OH}$	Sulfoxyde de méthionine Sulfone de méthionine
Arginine	$\cdot\text{OH}$ en présence d' O_2 $\text{RO}_2\cdot$	Acide 5-hydroxy-2-aminovalérique Semi-aldéhyde glutamique ⁽¹⁾
Histidine	$\cdot\text{OH}$	2-oxo-histidine ⁽¹⁾
Lysine	$\cdot\text{OH}$ en présence d' O_2	3-,4- ou 5-hydroxylysine Semi-aldéhyde adipique ⁽¹⁾
Phénylalanine	$\cdot\text{OH}$	Ortho-tyrosine
Tryptophane	$\cdot\text{OH}$	N-formylkynurénine ⁽¹⁾ Kynurénine ⁽¹⁾
Tyrosine	$\cdot\text{OH}$ HOC	Dihydroxyphénylalanine (DOPA) Bityrosine Nitro-tyrosine

(1)Composé possédant un groupement carbonyle.

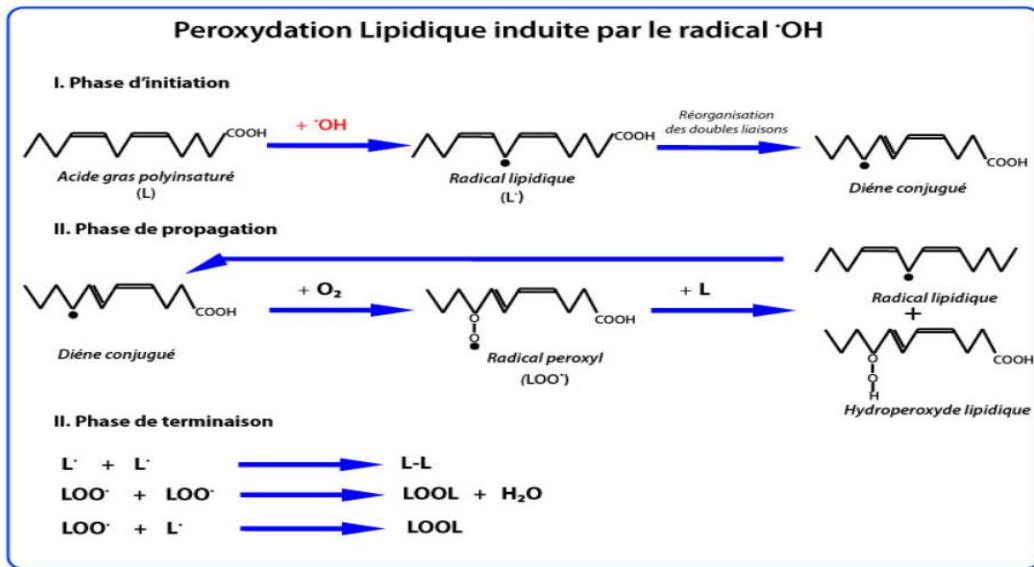


Figure 2: Peroxydation lipidique (Bonnefont-Rousselot *et al* in Delattre *et al.*, 2003).

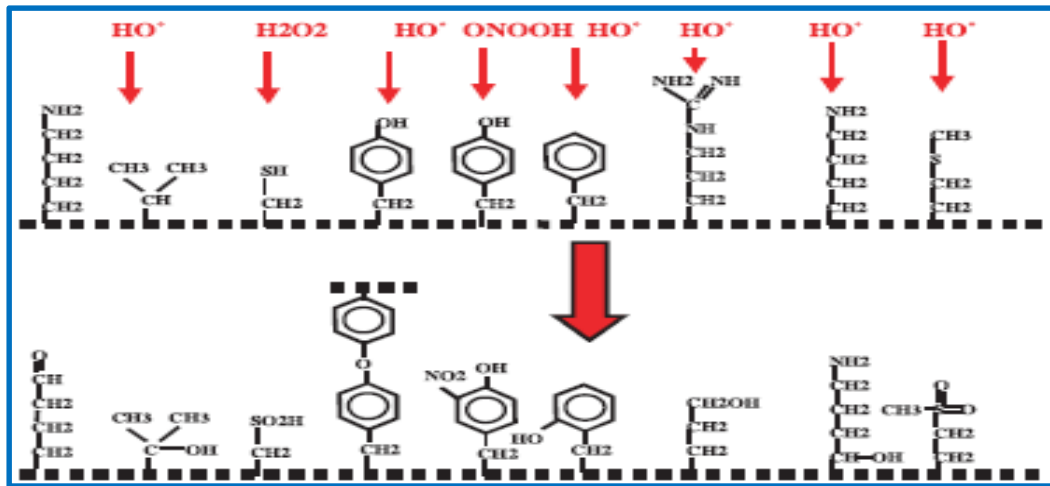


Figure 3: Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (Favier, 2003).

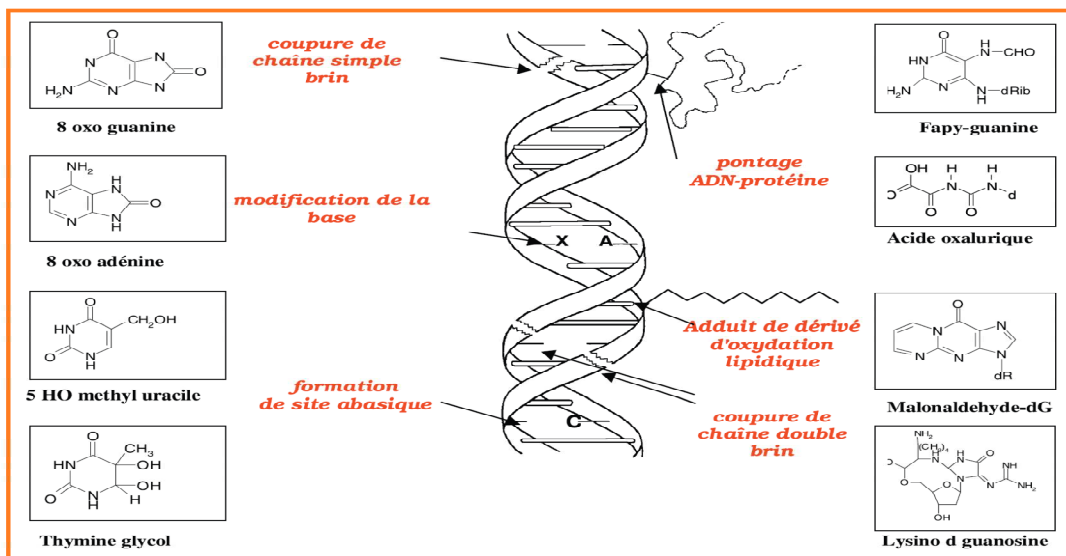


Figure 4: Principaux dommages radicalaires au niveau de l'ADN (Favier, 2003).

6. Systèmes de défense antioxydant

Les antioxydants peuvent être définis comme toute substance qui présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat (Pincemail et defraigne, 2004; Bonnefont-Rousselot, 2007; Masson, 2007). Les systèmes de défense antioxydant comportent des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase, couple thiorédoxine/thiorédoxine réductase, hème oxygénase, peroxyrédoxine), mais aussi des molécules hydro ou liposolubles de petite taille (caroténoïde, vitamine C et E, glutathion, acide urique, bilirubine, acide lipoïque, ubiquinone...), à cela s'ajoutent quelques protéines (transferrine, ferritine, céruloplasmine...) ainsi que certains oligoéléments (sélénium, cuivre, zinc...). Ils sont ainsi présents dans tous les compartiments de l'organisme qu'ils soient intracellulaires, membranaires ou extracellulaires (Figure 5) (Mcardle *et al.*, 2004; Pincemail et defraigne, 2004; Moussard, 2006).

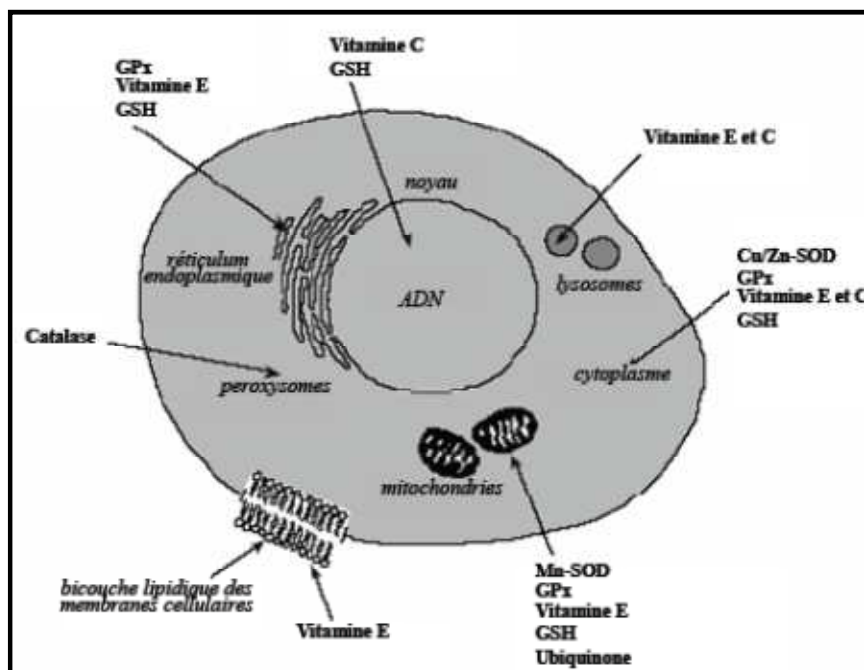


Figure 5: Répartition des antioxydants dans la cellule (Gardés-Albert *et al.*, 2003).

6.1. Systèmes antioxydants enzymatiques

6.1.1. Superoxyde dismutase (SOD) (E.C.1.15.1.1)

La superoxyde dismutase est une métalloenzyme qui catalyse la dismutation mono-électronique de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène (**Pincemail et al., 2002; Soares, 2005**). Cette réaction se déroule principalement dans le cytoplasme.

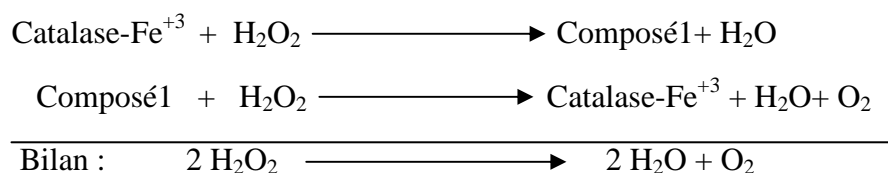


Il existe trois isoformes de la SOD qui diffèrent par leurs structures quaternaires, par le métal de transition présent dans leurs sites actifs ainsi que leurs localisations cellulaires:

- Les SOD à cuivre et à zinc (Cu,Zn-SOD) essentiellement présentent dans le cytoplasme des cellules eucaryotes.
- Les SOD à manganèse (Mn-SOD) chez les procaryotes et dans les mitochondries des eucaryotes.
- Les SOD à fer (Fe-SOD) chez les procaryotes uniquement (**Bonnefont-Rousselot et al in Delattre et al., 2003; Soares, 2005; Borg et Reeber, 2008**).

6.1.2. Catalase (E.C.1.11.1.6)

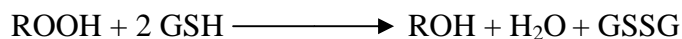
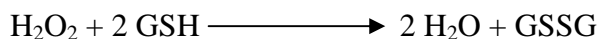
La catalase est une enzyme tétramérique très répandue dans les tissus des mammifères, essentiellement dans les peroxysomes d'hépatocytes et des hématies (**Pincemail et al., 2002; Borg et Reeber, 2008**). Cette enzyme catalyse la réaction de dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en O_2 et H_2O (**Servais, 2004; Horn et al., 2005**), la réaction se fait en deux étapes:



6.1.3. Glutathion peroxydase (GPx) (E.C. 1.11.1.9)

La GSH-Px est constituée de quatre sous unités protéiques comportant un atome de sélénium intégré dans le site actif sous forme de sélénocystéine dans chaque sous unité. Elle est présente dans le cytoplasme et dans la mitochondrie.

Cette enzyme catalyse la réaction qui couple la réduction de H₂O₂ ou plus généralement les hydroperoxydes d'origine lipidique (ROOH) avec l'oxydation du glutathion (**Servais, 2004**), selon le mécanisme catalytique suivant:



Afin de maintenir le rapport GSH/GSSG constant dans la cellule, le glutathion oxydé formé est ultérieurement régénéré sous sa forme réduite, cela est rendu possible par l'oxydation du NADPH, H⁺ (fournis par la voie des pentoses phosphates) grâce à l'enzyme glutathion réductase (**Pincemail et al., 2002; Horn et al., 2005**).

6.1.4. Glutathion S-transférase (GST) (EC 2.5.1.18)

La Glutathion S-transférases (GST), joue un rôle important dans la détoxification des composés électrophiles, en catalysant des réactions de conjugaison entre le glutathion et ces substances nocives (**Townsend et al., 2003; Soares, 2005**).

6.1.5. Autres enzymes antioxydantes

Il existe de nombreuses autres enzymes antioxydantes comme les peroxyredoxines, l'hème oxygénase, les thiorédoxines réductase ou les thiorédoxines peroxydases. Ces enzymes permettent la réduction des fonctions R-SS-R en R-SH (**Townsend et al., 2003; Koji et al., 2008**).

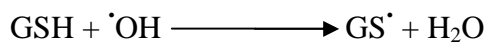
En outre, il existe une coopération étroite entre les enzymes antioxydantes. L'activité SOD conduit-elle simultanément à la détoxification d'O₂[•] et à la production de peroxyde d'hydrogène (composé à pouvoir oxydant), qui doit alors être pris en charge par le système catalase et/ou peroxydase (**Moussard, 2006**).

6.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques

6.2.1. Glutathion

Le glutathion ou γ -glutamyl-cystéinyl-glycine est un tripeptide atypique existe sous deux formes l'une réduite (GSH) et l'autre oxydée (GSSG) (**Servais, 2004; Horn et al., 2005; Borg et Reeber, 2008**). Le groupement thiol confère au glutathion un rôle d'antioxydant. Il agit en tant que réducteur vis-à-vis de nombreuses espèces oxydées comme: O₂[•], [•]OH, RO[•], RO₂[•] ainsi que les radicaux centrés sur le carbone R[•].

Les molécules de glutathion cèdent des électrons sous forme d'atomes d'hydrogène à ces substances oxydées afin de les régénérer en générant des radicaux thiyles GS[•] (Soares, 2005; Koji *et al.*, 2008; Krid, 2008), selon les réactions suivantes:



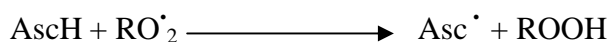
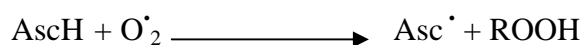
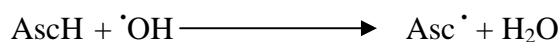
La régénération de la fonction thiol s'effectue grâce à la glutathion réductase qui utilise comme coenzyme réducteur le NADPH, H⁺ (Martini et Seiller, 2006; Borg et Reeber, 2008).

6.2.2. Oligoéléments

Le sélénium (Se) ainsi que d'autres oligoéléments tels que le cuivre (Cu), le manganèse (Mg), le zinc (Zn) et le fer (Fe) possèdent des propriétés antioxydantes. Ils jouent le rôle des cofacteurs afin de maintenir l'activité catalytique des différents enzymes antioxydantes (Pincemail et defraigne, 2004; Servais, 2004; Bonnefont-Rousselot, 2007). Les oligoéléments peuvent aussi participer au maintien de la concentration de la vitamine E (particulièrement le zinc) et de la métallothionine, stabilisent la structure membranaire et prévient la production endogène des radicaux libres (Townsend *et al.*, 2003; Bonnefont-Rousselot, 2007). Des apports insuffisants en oligoéléments seraient ainsi susceptibles de réduire les capacités de défense antioxydante de l'organisme.

6.2.3. Vitamine C « acide ascorbique »

La vitamine C ou acide ascorbique est un antioxydant hydrosoluble présent dans les liquides extracellulaires et dans le cytosol. Elle a un pouvoir réducteur puissant vis-à-vis les radicaux hydroxyles [•]OH, superoxydes O₂[•] et peroxydes RO₂[•] (Horn *et al.*, 2005; Martini et Seiller, 2006). En réagissant avec ces divers oxyradicaux, l'acide ascorbique (AscH) est oxydé en acide déshydroascorbique selon les réactions suivantes :

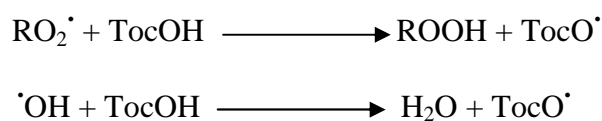


La vitamine C exerce également un rôle protecteur par réduction des ions métalliques (Fe^{+3} en Fe^{+2} et Cu^{+2} en Cu^{+}), qui ne peuvent donc plus déclencher des réactions de Fenton. Aussi elle agit en synergie avec d'autres antioxydants en réduisant leurs formes radicalaires assurant, ainsi leurs régénération et prévenir par conséquent l'oxydation des lipides (**Bourgeois, 2003; Graille, 2003; Martini et Seiller, 2006**).

L'acide ascorbique est maintenue sous forme réduite suite à une dismutation de la déshydroascorbate réductase (qui utilise le glutathion comme cofacteur) et une NADH réductase (**Graille, 2003; Horn et al., 2005**).

6.2.4. Vitamine E « tocophérols »

La vitamine E est un antioxydant liposoluble, regroupe un ensemble de composés phénoliques appelés tocophérol (α , β , γ , δ) c'est l' α -tocophérol qui est biologiquement le plus efficace. Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au sein des membranes cellulaires et des lipoprotéines ou elle joue le rôle d'un donneur d'hydrogène grâce à sa fonction phénol réductrice vis-à-vis les radicaux peroxyde (RO_2^{\cdot}), hydroxyle ($^{\cdot}\text{OH}$), l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) et l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), empêchant ainsi la peroxydation lipidique (**Bonnefont-Rousselot et al in Delattre et al., 2003; Soares, 2005; Martini et Seiller, 2006**). En réagissant avec ces divers espèces radicalaires, le tocophérol (TocOH) est oxydé en radical tocophéryle (TocO $^{\cdot}$), ce dernier sera ensuite régénéré par la vitamine C et le glutathion (**Pincemail et al., 2001; Graille, 2003; Krid, 2008**).



Le système antioxydant non enzymatique renferme d'autres substances endogènes parmi lesquelles on peut citer la bilirubine (capable de piéger les radicaux peroxydes et l'oxygène singulier protégeant ainsi l'albumine et les acide gras liés à l'albumine des attaques radicalaires), les protéines chélatrices des métaux de transition comme l'haptoglobine, la ferritine, l'albumine et la céruloplasmine (agissent en diminuant la disponibilité d'agents prooxydant comme les ions $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ou $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{+}$ permettant par ce biais de prévenir la production des radicaux libres par la réaction de fenton), les métalothionines (mélanine et mélatonine permettant aussi la neutralisation des métaux de transition) et l'acide urique (**Valko et al., 2007; koji et al., 2008**).

En outre, les caroténoïdes et les polyphénols (porté par l'alimentation) sont également considérés comme antioxydant. Les polyphénols sont généralement des piègeurs des RL et des composés issus de la peroxydation des lipides. Ils sont donc susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique (**Gardés-Albert *et al.*, 2003; Martini et Seiller, 2006; Masson, 2007**).

Les caroténoïdes piègent l'oxygène singulet, grâce à leurs structures très riches en doubles liaisons (sous faible pression d'oxygène). Ils sont aussi capables de piéger des radicaux peroxy et protègent ainsi les LDL, ils ont le pouvoir de terminer les réactions en chaîne de lipoperoxydation (**Gardés-Albert *et al.*, 2003; Masson, 2007**).

En plus l'organisme a également la capacité de synthétiser quelques antioxydants aussi retrouvés dans l'alimentation comme l'acide alpha-lipoïque et le coenzyme Q₁₀ (Ubiquinol) assurent le piégeage des radicaux libres et le recyclage des tocophérols et du glutathion (**kohen et Nyska, 2002**).



CHAPITRE III
Nigella sativa

CHAPITRE III : *Nigella sativa*

1. Position systématique

Règne : Plante

Sous règne : Cromophyte

Embranchement : Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous classe : Dialypétales

Ordre : Ranunculales

Famille : Ranunculaceae

Genre : *Nigella*

Espèce : *sativa*

Non binominal : *Nigella sativa* (Llinares, 2005; Meziti, 2009).

2. Dénomination

Le non nigelle vient du latin « nigellus= noirâtre ». Elle est dénommée en français «nigelle » et ses non vernaculaires « nigelle cultivée », « nielle », « herbe aux épices », « cumin noir », « poivrete ». Dans la littérature internationale on la trouve sous les noms « black seed » ou « black caraway » en anglais, « Melanzio » en italien, « schwarzkummel » en allemand et « habba sawda الحبة السوداء » ou « habat el-baraka حبة البركة » en arabe (Fournier et Pett, 1999; Ferdinand, 2006).

3. Description botanique

La nigelle cultivée est une plante herbacée annuelle à tige dressés ramifiée qui peut atteindre 30 à 60 Cm de hauteur, ses rameaux sont courts et dressés (Beloued, 1998; Ferdinand, 2006; Ahmad *et al.*, 2013). Ses feuilles pennées, sessiles, à lobes étroits, lancéolés à linéaires, elles sont dentées et d'une couleur verte (Iserin, 2001; Wichtl et Anton, 2003).

Fleurs sans involucre, étoilées et petites de 2,5 Cm de diamètre, comportent un calice régulier à 4 sépales pétaloïdes et caducs, blancs ou verdâtres. Une corolle généralement avec 8 petits pétales, de colleur blanc bleuté à 2 lèvres (considérés comme des staminodes ou des nectaires) et de nombreuses étamines insérées sur le réceptacle, et entre les deux une couronne constituée de 5 à 10 feuilles à onglets nectarifères. Elles comportent aussi, 6 à 10 carpelles un peut verruqueux, soudé entre eux presque jusqu'au sommet et uninervies (Figure 6) (**Llinares, 2005; Ait youssef, 2006**).

Le fruit de la nigelle cultivée est constituée de follicule sec et déhiscent, s'ouvrant de lui-même a maturité par une fente interne, et formé par un carpelle imparfaitement soudé renferment de nombreuses grains de couleur foncée (noire ou jaune grisâtre) et de très petite taille d'environ 1,5 mm de longueur sur 1 mm de large et qui ont une odeur aromatique (Figure 6). Les graines ont une forme pyramidale et ont des faces triangulaires, sensiblement planes, marquées de rides transversales et finement chagrinées (leur amande est blanche et huileuse) (**Wichtl et Anton, 2003; Llinares, 2005**).

4. Origine et habitat

La nigelle est une herbe originaire de l'Asie occidentale et de l'Europe méridionale (**Fournier et Pett, 1999; Wichtl et Anton, 2003**). Elle se développe surtout dans le Tell et les terres semi-aride (**Ait youssef, 2006; Meziti, 2009**). Elle y est trouvée aussi dans les cultures et sur les pelouses. Maintenant elle est cultivée dans plusieurs régions du monde surtout dans l'aire Ibéro-Mauritanienne, le bassin Méditerranéenne et en Inde (**Fournier et Pett, 1999; Ait youssef, 2006**). La nigelle est cultivée, ou échappé des jardins un peut partout en Algérie (**Beloued, 1998**).



A : Plante entière

E : Fruit



Capsule



Grain



B : Fleur



C : Tige



D : Feuille

Figure 6: Aspect morphologique du *Nigella sativa* (Llinares, 2005).

5. Principaux constituants

Les graines de la nigelle contiennent:

- **Une huile grasse (35 à 40%):** constituée surtout des esters du glycérol et des acides (linoléique, oléique et palmitique), mais aussi d'une teneur relativement élevée en tocophérols. La présence d'autres acides gras a été également détectée mais à des valeurs négligeables (myristoleique, palmitoleique, margarique, arachidonique (0,01% à 0,4%) eïcosenoïque, behénique, lignocérique, acide gamma linoléique (0,1% à 1%)) (**Salem, 2005; Ahmad et al., 2013**).

- **Des huiles essentielles (1,4 % à 1,9%):** constituée surtout de monoterpènes (p-cymène, α -pinène, carvacrol ...) de thymoquinone ainsi que de la nigellone (composé carbonyle) (Figure 7) (**Llinares, 2005; Meziti, 2009**).

- **Autres constituants:** du même les graines de la nigelle contiennent des sucres, des gommés (sucre réducteur et polysaccharide), des substances albuminoïdes, une sapnoïde (la mélanthine), des protéines (avec dominance de l'acide glutamique (22,4%) d'acide aspartique (10,05%) et d'arginine (9,18)), des triglucosides de flavonols (la quercétine 3-glycosyl (1-2) galactosyl (1-2) glucoside, kaempférol 3-glycosyl (1-2) galactosyl (1-2) glucoside et quercétine 3-(6-feruloglucosyl) (1-2) galactosyl (1-2) glucoside), des substances minérales (potassium, calcium, fer, sodium, sélénium) et des vitamines (vitamines B₁, B₂, B₆, PP et l'acide folique, la β -carotène et la vitamine K₁), un suc amère nommé nigilline, un alcaloïde (la connigelline) et des tanins (Figure 7) (**Salem, 2005; Ait youssef, 2006; Ferdinand, 2006; Meziti, 2009**).

En effet, la teneur de ces différents constituants varie selon les conditions géographiques et climatiques ainsi que les méthodes d'études (extraction et détection).

Les grains avant maturité et plus encore les feuilles renferment des saponines qui expliquent une certaine toxicité.

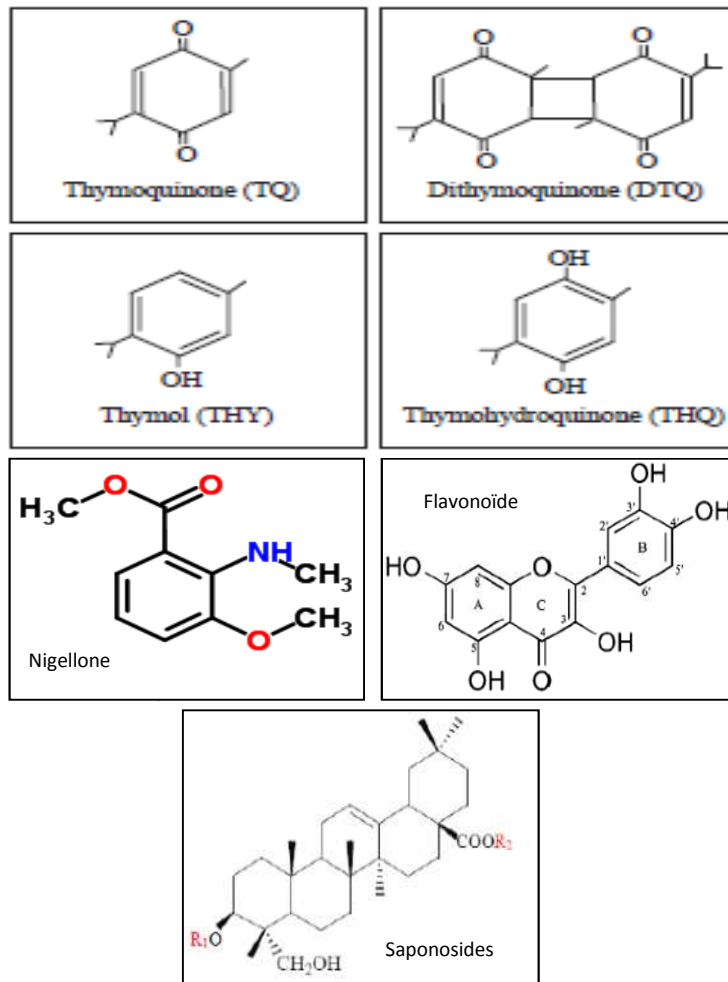


Figure 7: Structure chimique des composés actifs de *Nigella sativa* (Salem, 2005).

6. Usage en phytothérapie

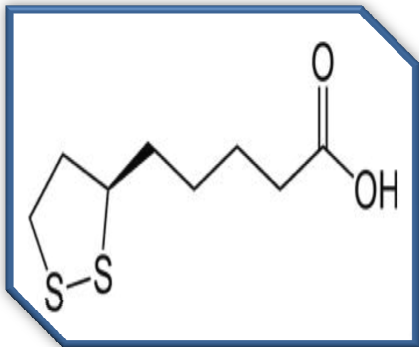
Nigella sativa est l'une des plantes les plus utilisées à travers le monde dans la médecine traditionnelle surtout en Moyen Orient et plus particulièrement chez les musulmans influencés par la parole prophétique. Bukhari rapporte le hadith suivant de la bouche d'Abu Hurayra qui affirme avoir entendu le prophète Mohamed (prière et salut d'Allah soient sur lui) dire : « utilisez dans vos soins la graine de nigelle, c'est un remède contre tous les maux à l'exception de la mort ».

ورد في صحيح البخاري و مسلم عن أبي هريرة رضي الله عنه أن رسول الله صلى الله عليه و سلم قال "عليكم بهذه الحبة السوداء فإن فيها شفاء من كل داء إلا السام" قلت "و ما السام؟" قال "الموت".

Les graines et l'huile qui en est extraite sont les deux parties de la plante les plus utilisées depuis des siècles comme remède naturel contre une multitude de maux. Pris tout seule ou bien en combinaison avec d'autres produits (miel, lait...), elles traitent les troubles broncho-pulmonaires (asthme, toux, états grippaux) et gastriques intestinaux (carminatif, cholagogue et vermifuge). Écrasées et prises dans de l'eau et du lait les graines de *Nigella sativa* étaient réputées efficaces contre la constipation, favorisent la digestion, soulagent les douleurs gastriques et combattent flatulences, ballonnements et coliques. Elles auraient des propriétés antiseptiques (expulse les vers intestinaux), antispasmodiques (sous forme d'un décocté dans l'eau à raison de deux verres par jour). De plus elles traitent les maladies cardiovasculaires et inflammatoires (Salem, 2005; Gali-Muhtasib *et al.*, 2006).

La décoction dans de l'eau et de vinaigre en bain de bouche calment les maux des dents, tandis que la respiration des grains écrasés dans un linge soulage les maux de tête (Ferdinand, 2006; Ahmad *et al.*, 2013). Les grains de la nigelle peuvent être aussi employés en moyen de fumigation ou encore par voie rectale, incorporés à des formules de suppositoires contre les hémorroïdes. Sous forme de poudre et à faible dose elles sont également utilisées dans certaines circonstances comme réchauffant et comme antipyrétique, ainsi que comme antidote des poisons et venins. Tandis qu'à forte dose elles sont diurétiques, galactagogues et elles provoquent aussi l'apparition des règles (Ferdinand, 2006). Les grains peuvent être même employés en usage externe. La poudre de ces grains est incorporée à une pommade pour traiter les eczémas, l'acné, les verrues, les cors, le vitiligo et l'hémiplégie dont la paralysie faciale et les paralysies des membres (Wichtl et Anton, 2003; Ait Youssef, 2006).

Des études récentes ont mis en évidence que *Nigella sativa* possède aussi des effets anti-oxydants, anti-inflammatoires, anti-mutagènes (antiulcéreuse), anti hépatotoxiques, immunostimulants, antimicrobiens et hypotenseurs due à ses constituants bioactives notamment les huiles essentielles (thymoquinone et nigellone) et les composés phénoliques (**Gali-Muhtasib et al., 2006; Ahmad et al., 2013**).



CHAPITRE IV

ACIDE ALPHA LIPOÏQUE

CHAPITRE IV : ACIDE ALPHA LIPOÏQUE

1. Définition

L'acide alpha lipoïque (AAL) est un disulfure cyclique présent dans toutes les cellules du corps. Il joue un rôle clé dans la production de l'énergie en agissant comme un cofacteur de différents complexes multienzymatiques notamment les acides α -cétoniques (alpha cétooglutarate et la pyruvate déshydrogénase) catalysant les réactions oxydatives au cours du métabolisme énergétique des protéines, des glucides et des lipides. Il assure le transfert des groupes acyles au sein de ces complexes enzymatiques (**Horn *et al.*, 2005; Caylak *et al.*, 2008; Winiarska *et al.*, 2008; Yi *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013**).

L'AAL est lié par une liaison covalente de type amide à un résidu lysine de l'enzyme correspondant formant ainsi une lipoamide (Figure 8) (**Horn *et al.*, 2005; Voet et Voet, 2005**).

Au cours de ces dernières années de nombreuses études expérimentales et cliniques ont mis en évidence des propriétés hypoglycémiantes, ant-inflammatoires et antioxydantes de L'AAL (**Abdel-Zaher *et al.*, 2008; Winiarska *et al.*, 2008**).

2. Structure et propriétés physicochimiques

L'acide alpha lipoïque encore dénommé acide thioctique, correspondant chimiquement à l'acide 1,2-dithiolane-3-pentanoïque ou acide 6,8-dithiooctanoïque. Sa formule brute est $C_3H_{14}O_2S_2$ et sa masse moléculaire est égale à 206g/mol (**Ghibu *et al.*, 2008; Winiarska *et al.*, 2008**). Il a une structure hétérocyclique, comprenant deux atomes de soufre lié entre eux par un pont disulfure qui peut s'ouvrir réversiblement (Figure 9), et un carbone asymétrique qui donne lieu à deux isomères R-AAL et S-AAL (**Navari-Izzo *et al.*, 2002; Abdel-Zaher *et al.*, 2008**). En effet, la forme naturelle est la forme R et est également la forme la plus active biologiquement tandis que la forme S est synthétique et n'a que peu d'effets biologiques. L'AAL à l'avantage d'être à la fois hydrosoluble et liposoluble (**Abdel-Zaher *et al.*, 2008; Caylak *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2013**).

3. Biosynthèse et apport alimentaire

L'AAL provient de l'apport alimentaire ou de la biosynthèse hépatique (particulièrement au niveau des mitochondries) à partir de l'acide gras octanoïque et de la cystéine sous l'action de l'acide lipoïque synthétase (**Navari-Izzo *et al.*, 2002; Ghibu *et al.*, 2008**).

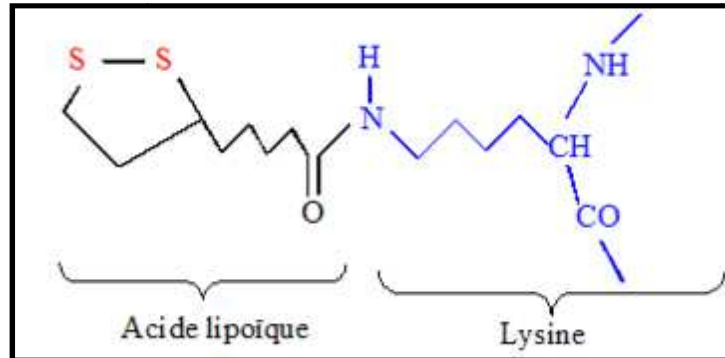


Figure 8: Structure chimique d'un lipoamide (Voet et Voet, 2005).

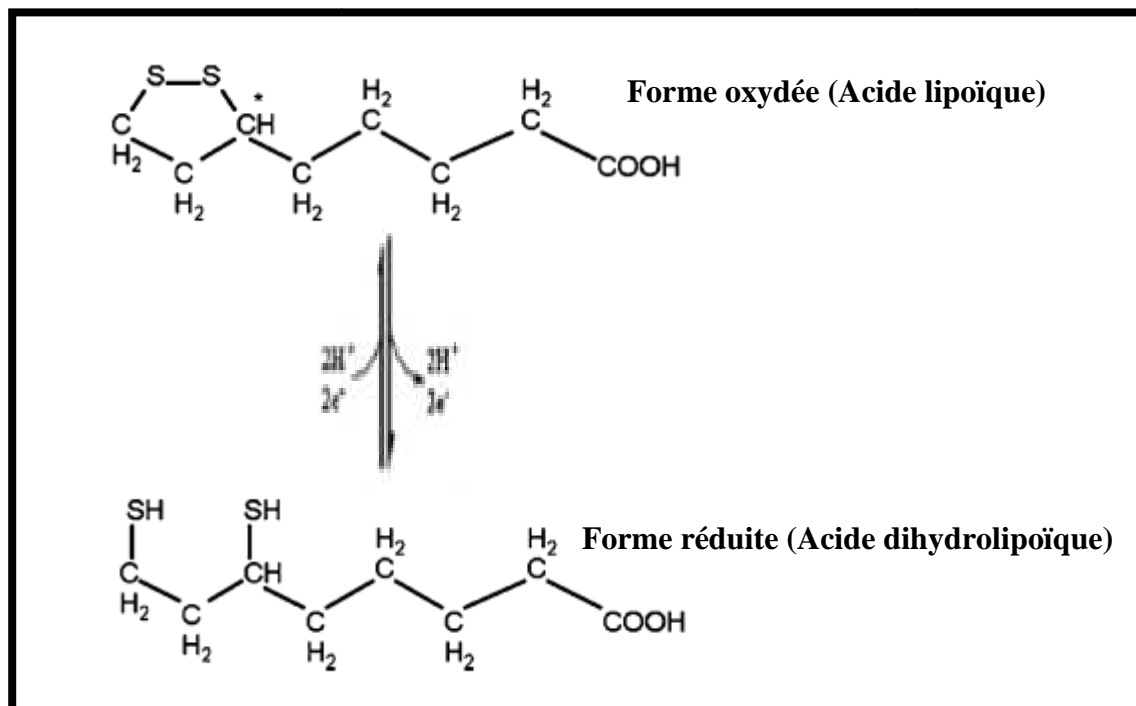


Figure 9: Structure chimique de l'acide lipoïque et de l'acide dihydrolipoïque, *carbone asymétrique (Voet et Voet, 2005).

4. Absorption et distribution

Après digestion l'AAL est rapidement absorbé au niveau intestinale sous forme de lipoillysine, par un transport Na^+ dépendant (Shay *et al.*, 2009).

Immédiatement après son absorption (30 min environ) et grâce à son caractère amphiphile, l'AAL se répartie dans tous les tissus de l'organisme préférentiellement dans le foie et les reins. Du même, il franchit la barrière hémato encéphalique (Bustamante *et al.*, 1997; Ghibu *et al.*, 2008).

5. Métabolisme

Au niveau intracellulaire, l'AAL de provenance exogène ou endogène est principalement métabolisé soit par:

- **Réduction d'acide lipoïque:** en acide dihydrolipoïque (ADHL ou l'acide 6,8-dithio-octanoïque), cette réduction s'effectue sous l'action:
 - Du glutathion réduit intra moléculaire: cette réaction est très lente.
 - De certains enzymes spécifiques: la lipoamide déshydrogénase mitochondriale avec oxydation de NADH et des réductases (glutathion réductase ou thiorédoxine réductase) cytosolique avec oxydation de NADPH (Figure 10) (Bustamante *et al.*, 1997; Navari-Izzo *et al.*, 2002; Ghibu *et al.*, 2008).
- **La β -oxydation:** processus qui se déroule au niveau hépatique et qui induit la libération de plusieurs métabolites au niveau du plasma notamment l'acide bisnorlipoïque, β -hydroxibisnorlipoïque et tétranorlipoïque (Figure 10) (Bustamante *et al.*, 1997; Shay *et al.*, 2009).

En effet, ces métabolites ont les mêmes propriétés thérapeutiques de l'AAL. Le métabolite qui serait le plus actif est l'acide dihydrolipoïque.

6. Elimination

Une fois métabolisé, les métabolites d'AAL sont rapidement éliminés (3 à 6h après leurs métabolisations), l'excrétion s'effectue essentiellement par voie urinaire, seul 4% étant éliminé dans les fèces témoignent l'existence d'un cycle entérohépatique (Abdel-Zaher *et al.*, 2008; Moraes *et al.*, 2010).

7. Mode d'action et effets thérapeutiques

7.1. Effet antioxydant

Le groupement thiol confère à l'AAL ainsi que ses métabolites notamment l'acide dihydrolipoïque un pouvoir antioxydant puissant. De plus, son caractère amphiphile lui permet d'agir tant au niveau des membranes cellulaires lipidiques qu'au niveau des parties intra et extracellulaires aqueuses (Navari-Izzo *et al.*, 2002; Moraes *et al.*, 2010). Plusieurs mécanismes sont évoqués:

- Ils peuvent piéger plusieurs types des radicaux libres en les neutralisant. Ils réagissent essentiellement avec le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$), les radicaux peroxy ($\text{RO}_2\cdot$), l'acide hypochlorique (HOCl) et l'oxygène singulet (O^{\cdot}) (Bustamante *et al.*, 1997; Navari-Izzo *et al.*, 2002; Abdel-Zaher *et al.*, 2008; Winiarska *et al.*, 2008).
- Ils sont capables d'inhiber la formation des radicaux libres puis qu'ils piègent les métaux de transition impliqués dans la synthèse du radical hydroxyle. Du même ils peuvent chélater les métaux lourds. En se liant à ces derniers ils facilitent leur excrétion, réduisent leur absorption et empêchant ainsi l'intoxication de l'organisme (Moini *et al.*, 2002; Moraes *et al.*, 2010).
- Ils sont capables de régénérer les formes réduites de certains antioxydants à partir de leurs formes oxydées (recycler partiellement d'autres antioxydants notamment le glutathion, la vitamine C, la vitamine E et l'ubiquinol) augmentant ainsi leurs durées de vie et leurs efficacités (Figure 11) (Bustamante *et al.*, 1997; Navari-Izzo *et al.*, 2002; Caylak *et al.*, 2008).
- Réparation des dommages oxydatifs par des mécanismes mal illustrés à l'heure actuelle, ce qui le rend particulièrement efficace dans la prévention de la dégradation des constituants cellulaires (Moini *et al.*, 2002; Yi *et al.*, 2011).

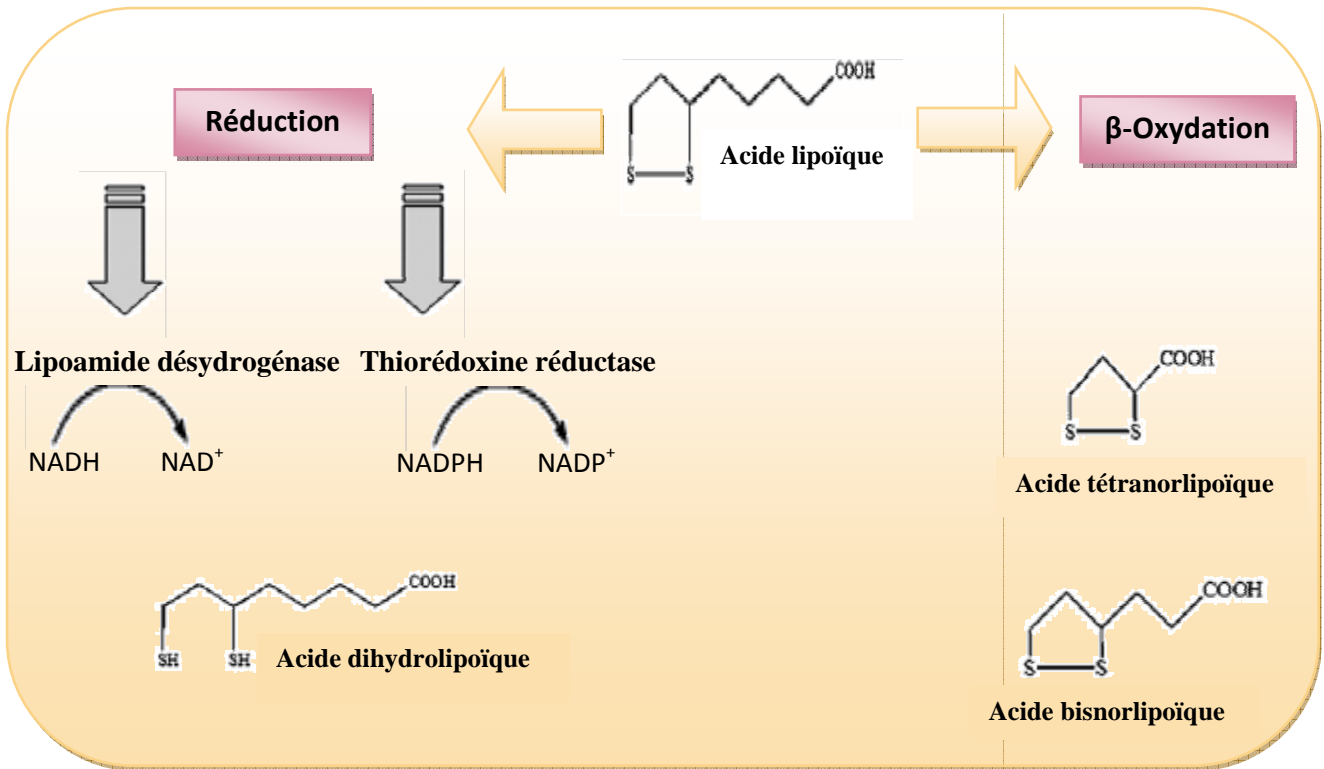


Figure 10: Voies métaboliques de l'acide lipoïque (Shay *et al.* , 2009).

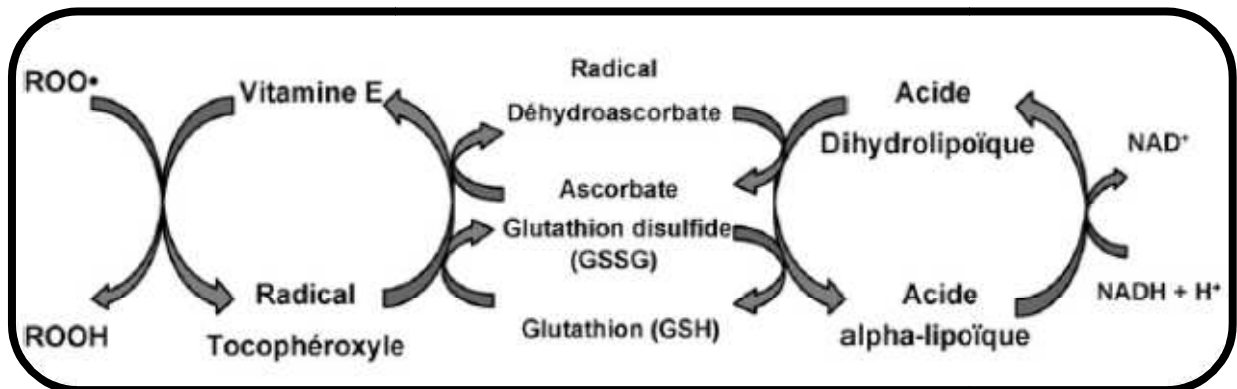


Figure 11: Mécanismes de régénération des antioxydants endogènes par l'acide lipoïque et l'acide dihydrothiolipoïque (Ghibu *et al.*, 2008).

7.2. Effet hypoglycémiant

En cas du diabète l'AAL agit afin de réguler la glycémie par deux mécanismes:

- Stimule la fonction de l'insuline: l'AAL augmente le transport du glucose au sein des cellules spécialisées en stimulant ses transporteurs (Glut1 et Glut4). Du même il réduit la libération du glucose hépatique (**Moini *et al.*, 2002; Cakatay, 2006**).
- Réduit la résistance à l'insuline: En augmentant la sensibilisation des récepteurs membranaires, ce qui provoque l'ouverture de leurs canaux, favorisant ainsi la pénétration de l'insuline dans les cellules (**Cho *et al.*, 2003; Ghibu *et al.*, 2008**).

L'AAL peut aussi prévenir les complications diabétiques (la neuropathie, la cardiomyopathie, la rétinopathie et la cataracte), en réduisant les taux anormalement élevée du céruloplasmine chez le patient diabétique. Cet effet est lié aux propriétés antioxydantes de l'AAL particulièrement à l'augmentation du niveau des enzymes antioxydantes endogènes (**Kuntet *et al.*, 1999; Sung *et al.*., 2005; Ghibu *et al.*, 2008; Shay *et al.*, 2009**).

7.3. Effet anti-inflammatoire

Des études récentes, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* ont démontré l'effet anti-inflammatoire de l'AAL. En effet, L'AAL agit par réduction de l'expression des molécules d'adhésion [telles que la E-sélectine, la vascular cell adhésion molécule-1 (VCAM-1) et l'intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)], en inhibant l'activation d'IKB Kinase enzyme impliquée dans la libération du facteur nucléaire NF-KB (régulateur de l'expression de gènes responsables de la synthèse des molécules d'adhésion et d'autres médiateurs de l'inflammation après chélation passant également par la chélation des métaux de transition notamment le cuivre, la diminution d'expression des molécules d'adhésion entraîne une moindre adhésion des cellules de défense au niveau vasculaire conduisant alors à une protection vis-à-vis le développement des pathologies initiées par un processus inflammatoire (atherosclerosis, asthm, rheumatoïd arthrit) (**Kunt *et al.*, 1999; Sung *et al.*., 2005; Ghibu *et al.*, 2008; Shay *et al.*, 2009**).

De plus l'AAL est capable de diminuer l'expression endothéliale de fractalkine (cx₃e1₁), cette nouvelle chimiokine est capable d'agir de manière directe sur les phénomènes d'adhésion des monocytes et des lymphocytes T aux cellules endothéliales (**Berg *et al.*, 2008; Moraes *et al.*, 2010; Yi *et al.*, 2011**).

7.4. Autres effets

En complément de tous les effets évoqués précédemment l'AAL:

- A une action protectrice du foie contre les cirrhoses et les diverses formes d'hépatite.
- Améliore la conduction nerveuse et pourrait favoriser la régénération des cellules nerveuses (en prise prolongé).
- Protège contre les maladies cardiaques en empêchant l'oxydation du LDL cholestérol.
- Améliore l'oxydation des cellules, notamment suite à des chocs tels que ischémie réperfusion, crises cardiaques, opération chirurgicales et traumatismes divers.
- Inhibe l'activation de la xanthine oxydase qui joue un rôle très important dans les cas d'ischémie-reperfusion.
- Prévient les symptômes de vieillissement grâce aux effets antiglycations et antioxydants.
- Stimule la production d'énergie puisqu'il facilite la transformation de la nourriture ingérer en énergie (élément clé du métabolisme) (**Bustamante *et al.*, 1997; Voet et Voet, 2005; Campbell et smith, 2006; Berg *et al.*, 2008**).



ÉTUDE EXPÉRIMENTALE



MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Etude phytochimique

1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué d'huile des graines de *Nigella sativa* a été procurée du marché local d'Annaba (Huilerie Aboukacem). L'huile est extraite par pression à froid des graines de *Nigella sativa* d'origine Algérienne.

1.2. Teneur en flavonoïdes, en tanins et en polyphénols de l'huile de *Nigella sativa*

1.2.1. Dosage des flavonoïdes totaux

➤ Principe

Le dosage des flavonoïdes totaux est effectué selon la méthode décrite par **Zhishen *et al.*, (1999)**. Elle est basée sur un test colorimétrique utilisant le trichlorure d'aluminium $AlCl_3$. Ce dernier forme des complexes acides stables soit avec le carbonyle (C=O en position C-4) soit avec le groupe hydroxyle (en C-3 ou C-5) des flavones et des flavonols, mais également avec les groupements orthodihydroxyyles (éventuellement présents sur le noyau A et/ou B) des flavonoïdes. Ces composés présentent une absorbance maximale à 430nm.

➤ Mode opératoire

1.5 ml du méthanol est ajouté à 0.5ml de la solution de l'échantillon de concentration 1mg/ml. Ensuite, nous avons ajouté 0.1ml de la solution de $AlCl_3$ à 10%, 0.1ml d'acétate de sodium 1M et 2.8ml d'eau ultra pure (bidistillée). Le mélange est agité vigoureusement puis laissé pendant 30 minutes à l'obscurité avant de lire la densité optique à 430nm.

➤ Calcul de la concentration

La teneur en flavonoïdes totaux est calculée à partir de l'équation d'une courbe d'étalonnage de quercétine (0.1mg/ml) réalisée préalablement dans les mêmes conditions avec six niveaux de concentration (Figure 12).

Les teneurs en flavonoïdes totaux sont exprimées en mg d'équivalent quercétine par gramme de matière végétale sèche (mg EQ/g Ms) ou en mg d'équivalent quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g extrait).

1.2.2. Dosage des tanins condensés

➤ Principe

Le dosage des tanins condensés a été réalisé par la méthode décrite par **Julkunen-Titto, (1985)** utilisant la vaniline. Cette dernière réagit avec les flavan 3-ols libres et l'unité terminale des proanthocyanidines donnant une coloration rouge dont l'intensité est proportionnelle au taux de flavanols présents dans le milieu et qui représente un maximum d'absorption à 500nm de longueur d'onde.

➤ Mode opératoire

Nous avons procédé aux étapes suivantes:

- Préparer deux séries de tubes à essai (deux tubes dans chaque série).
- 1ml de la solution d'échantillon de concentration 1mg/ml a été introduit dans un tube de chacune des deux séries.
- Ajouter 5 ml de la solution vanilline à 1%, HCl à 8% (réactif de l'analyse) dans chacun des tubes de la première série à 1 minute d'intervalle.
- Ajouter 5 ml de la solution HCl à 4% dans chacun des tubes de la deuxième série à 1 minute d'intervalle.
- Les tubes sont ensuite introduits au bain marie à 30°C pendant 20 min.
- Lire les DO à 500nm en respectant l'intervalle d'une minute.

➤ Calcul de la concentration

La teneur en tanins condensés est calculée à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage de catéchine (0.3mg/ml). Cette courbe a été réalisée dans les mêmes conditions avec six niveaux de concentration (Figure 13). Les teneurs en tanins sont exprimées en mg de catéchine par gramme d'extrait (mg catéchine/g extrait).

1.2.3. Dosage des polyphénols totaux

➤ Principe

Le dosage des composés phénoliques a été effectué selon la méthode de **Wolfe et al., (2003)**, utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. L'oxydation des phénols, réduit ce réactif en un composé de couleur bleue, l'intensité de la couleur est proportionnelle au taux des composés phénoliques oxydés.

➤ **Mode opératoire**

1.5 ml de réactif Folin-Ciocalteu dilué 10× est ajouté à 200µl de la solution d'échantillon de concentration 1mg/ml. Le mélange est agité vigoureusement puis incubé à l'obscurité pendant 5min à 25°C. Ensuite, 1.5ml de carbonate de sodium Na₂CO₃ (60g/l) est ajouté. Le mélange est incubé à l'obscurité pendant 90min à 20°C avant de lire la densité optique à 725nm.

➤ **Calcul de la concentration**

La teneur en polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (0.2mg/ml). Cette courbe a été réalisée dans les mêmes conditions avec cinq niveaux de concentration (Figure14). Les teneurs en polyphénols totaux sont exprimées en mg équivalent d'acide gallique par 100 gramme d'extrait (mg EAG/100g extrait).

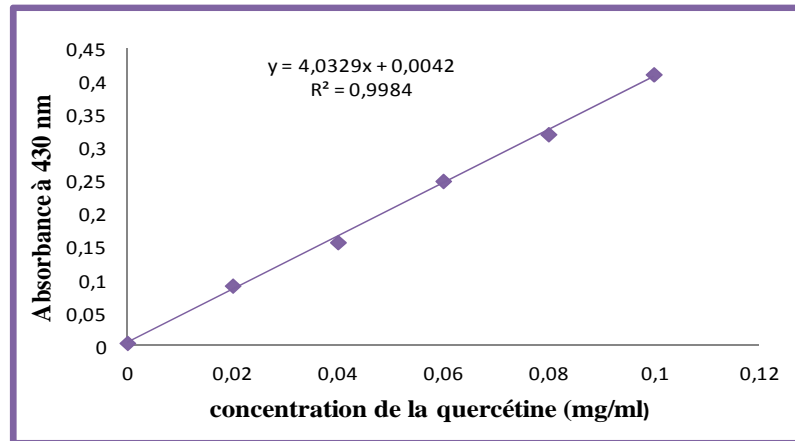


Figure 12: Courbe d'étalonnage de la quercétine (0.1mg/ml).

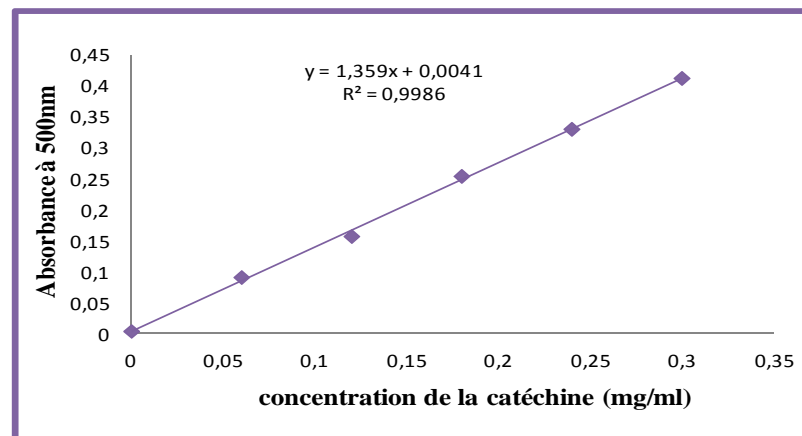


Figure 13: Courbe d'étalonnage de la catéchine (0.3mg/ml).

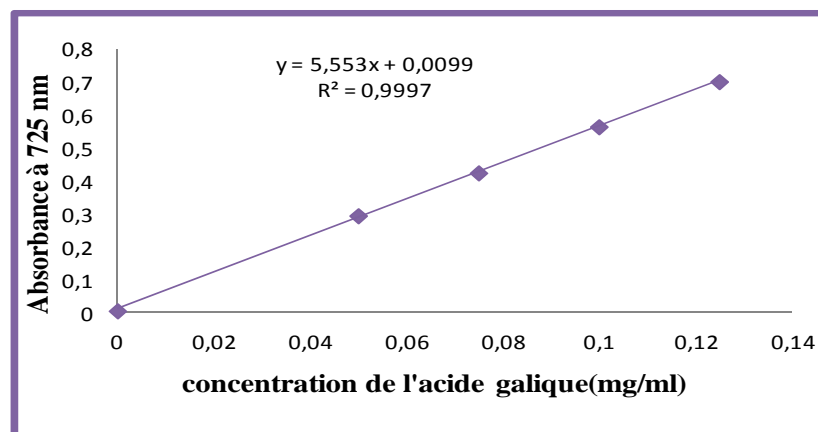


Figure 14: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (0.2mg/ml).

1.3. Evaluation du potentiel anti-radicalaire

1.3.1. Test de DPPH

➤ Principe

Le potentiel anti-radicalaire est déterminé selon la méthode de **Blois, (1958)**, utilisant le 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl (DPPH). Ce dernier agit en tant qu'un radical libre stable à une température ambiante. Le principe de cette méthode est basé sur la réduction du DPPH par un antioxydant présent dans le composé à tester (généralement les composés phénoliques) formant un nouveau composé de coloration jaune (Figure 15). Ce dernier montrait un spectre d'absorption à 517nm.

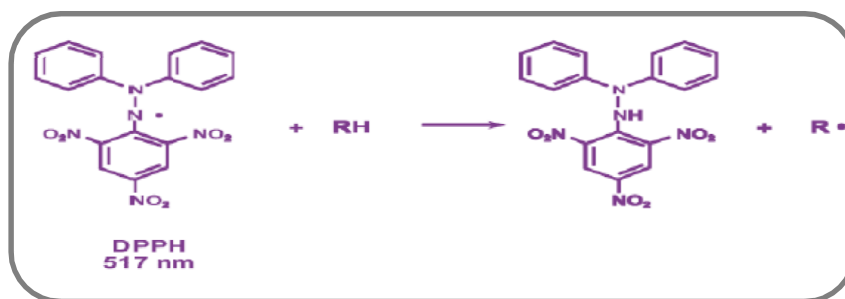


Figure 15: Réaction de réduction de DPPH.

➤ Mode opératoire

À partir de l'échantillon à analyser on prépare la solution mère (1mg/ml) à partir du la quelle on prépare plusieurs solutions à différentes concentrations par dilution (on obtient une gamme des concentrations). Les différentes étapes de mode opératoire sont représentés par le tableau suivant:

Réactifs	Blanc	Totale 100%	Essai
Échantillon (ml)	-	-	2
DPPH (0.3 mM) (ml)	-	2	2
Éthanol (ml)	2	2	-

Après agitation par un vortex, les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. L'absorbance est mesurée à 517 nm.

➤ Calcul du potentiel anti-radicalaire

Le potentiel anti-radicalaire est déterminé en termes d'IC₅₀, concentration de l'extrait qui exerce 50% d'inhibition des radicaux libres DPPH. Pour calculer l'IC₅₀ de l'échantillon, il faut tracer une courbe qui représente le pourcentage d'inhibition (PI) en fonction de la concentration. Les résultats peuvent être exprimés en tant que pourcentages d'activité anti-radicalaire, en utilisant la formule suivante:

$$PI = \left(1 - \frac{DO \text{ essai}}{DO \text{ T } 100\%}\right) \times 100 \quad \text{ou} \quad \frac{Do \text{ T } 100\% - DO \text{ essai}}{DO \text{ T } 100\%} \times 100$$

1.3.2. Test de NBT/Riboflavine

➤ Principe

Dans ce teste, nous avons utilisé la méthode décrite par **Yen et Chen, (1995)**. La génération de l'anion superoxyde se fait par l'oxydation de la riboflavine couplée à la réduction de nitrobluetetrazolium (NBT). Le composé libéré (formazan) présente un spectre d'absorbance à 560nm. L'effet antioxydant est traduit en pourcentage d'inhibition de la formation de formazan par rapport au contrôle négatif (ne contient pas l'extrait à testé).

➤ Mode opératoire

À partir de l'échantillon à analyser on prépare la solution mère (1mg/ml) à partir du la quelle on prépare plusieurs solutions à différentes concentrations par dilution (on obtient une gamme des concentrations). Les différentes étapes de mode opératoire sont représentés par le tableau suivant:

Réactifs	Blanc	Totale 100%	Essai
Tampon phosphate (67mM) (µl)	800	800	800
H ₂ O distillée (µl)	600	500	400
EDTA ₄ Na (µl)	100	100	100
Échantillon (µl)	-	-	100
NBT (1.5mM) (µl)	-	100	100
Riboflavine (0.12mM) (µl)	50	50	50

On agite et on incube pendant 5min sous une lampe de bureau, l'absorbance est mesurée à 560nm.

➤ Calcul du potentiel scavenger de l'anion superoxyde

Il est déterminé en termes d'IC₅₀, concentration de l'huile de *Nigella sativa* qui exerce 50% d'inhibition. Pour calculer l'IC₅₀ de l'échantillon, il faut tracer une courbe pourcentage d'inhibition (PI) en fonction de la concentration. Les résultats peuvent être exprimés en tant que pourcentages d'activité scavenger de l'anion superoxyde, en utilisant la formule suivante:

$$PI = \left(1 - \frac{DO \text{ esai}}{DO \text{ T } 100\%}\right) \times 100 \quad \text{ou} \quad \frac{Do \text{ T } 100\% - DO \text{ esai}}{DO \text{ T } 100\%} \times 100$$

2. Etude biologique

2.1. Animaux et régime

Dans notre étude, nous avons travaillé sur 36 rats blanc mâles *Ratus ratus* de la souche Wistar provenant de l'institut Pasteur d'Alger (centre d'élevage, El Kouba-Alger) d'un poids moyen de 235±10g. Ces rats ont été soumis à une période d'adaptation de deux semaines environ aux conditions de l'animalerie de la faculté des sciences (département de biochimie université d'Annaba) à des conditions ambiantes de température (23±2°C) et d'hygrométrie (40%), ainsi qu'une photopériode naturelle.

Les rats sont élevés dans des cages en polyéthylène qui sont tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois. Les cages ont été nettoyées et la litière changée tous les deux jours jusqu'à la fin de l'expérimentation. Ils ont été nourris avec un concentré équilibré (ONAB, El-Harrouche), dont la composition est détaillée dans le tableau 2.

Tableau 2: Composition de 1 kilogramme d'aliment.

Matière alimentaire	Quantité en g/kg d'aliment	Pourcentage (%)
Mais	620	62
Soja	260	26
Phosphate	16	1.6
Calcaire	9	0.9
Cellulose	10	1.0
Minéraux	10	1.0
Vitamines	10	1.0

2.2. Traitement des rats

Les rats ont été répartis en deux groupes expérimentaux, chaque groupe est composé de 18 rats, il s'agit de:

- Groupe A: rats non traités reçoit 2 ml d'eau distillée par voie orale.
- Groupe B: rats traités par l'huile de nigelle (NS) à raison de 2 ml/Kg du poids corporel (PC), cette dose a été choisie selon les travaux de **Zaoui *et al.*, (2002)**; **Mahmoud *et al.*, (2002)**; **Kokdil *et al.*, (2005)**. L'huile de nigelle a été administrée aux rats par voie orale (per os) à l'aide d'une seringue une fois par jours à un temps fixe (10:00 du matin) pendant cinq semaines.

Après cinq semaines de prétraitement le groupe A est subdivisé en trois sous groupes de six rats chacun, il s'agit de:

- Sous groupe (A₁, T): témoins sains, les rats reçoivent 2ml d'eau distillée par voie orale
- Sous groupe (A₂, AlCl₃): rats traités par le chlorure d'aluminium AlCl₃ (fournit par Sigma chemical co. (USA)) préalablement mélangée avec l'aliment à raison de 34 mg/kg du PC, cette dose a été choisie selon les travaux de **El-Demerdash, (2004)**; **Newairy *et al.*, (2009)**.
- Sous groupe (A₃, AlCl₃ + AAL): rats traités par l'AlCl₃ avec la même dose que celle du sous groupe A₂ avec supplémentation quotidienne en acide alpha lipoïque dissout dans l'eau distillée à raison de 35 mg/kg du PC par voie orale, cette dose a été choisie selon les travaux de **Malarkodi et varalakshmi, (2003)**; **Prahalathan *et al.*, (2006)**. Cette solution a été administrée aux rats une fois par jour à un temps fixe (11:00 du matin).

Du même le groupe B est subdivisé en trois sous groupes de six rats chacun, il s'agit de:

- Sous groupe (B₁, AlCl₃+ AAL+NS): rats traités par AlCl₃, AAL et NS avec les mêmes doses que celle des sous groupes A₂, A₃ et B₃ respectivement.
- Sous groupe (B₂, AlCl₃ +NS): rats traités par l'AlCl₃ avec la même dose que celle du sous-groupe A₂ avec supplémentation quotidienne par voie orale en NS à raison de 2ml/kg du PC à un temps fixe (10:00 du matin).
- Sous groupe (B₃, NS): rats traités par l'huile de nigelle à raison de 2ml/kg du PC par voie orale une fois par jours à un temps fixe (10:00 du matin).

Le traitement par AlCl₃ ainsi que par les combinaisons AlCl₃+AAL, AlCl₃+AAL+NS et AlCl₃+ NS est poursuivi pendant 21 jours.

Les animaux ont été pesés tous les sept jours pendant toute la période de traitement afin de suivre l'évolution du poids corporel. De plus, la consommation quotidienne de l'aliment et de l'eau de boisson ainsi que la quantité d'aluminium ingérée ont été également mesurées quotidiennement au cours de l'expérimentation.

3. Sacrifices des rats et prélèvement des échantillons

A la fin de l'expérimentation les différents groupes de rats sont sacrifiés par décapitation.

3.1. Prélèvement sanguin

Les prélèvements ont été réalisés soit:

- Sur des tubes à EDTA, pour déterminer la formule de numération sanguine (FNS).
- Sur des tubes héparinés, centrifugés ensuite (10 min à 3000 tours/min) afin de séparer le culot du plasma, qui a été conservé à -18°C pour le dosage ultérieur des paramètres biochimiques à l'exception du fer, tandis que le culot a été utilisé pour récupérer les érythrocytes. Le lavage des érythrocytes a été réalisé selon la méthode décrite par **Dodge et al., (1963)**. Les érythrocytes précipités sont lavés trois fois avec un tampon phosphate (0.1M, pH 7.4) et centrifuger à 3000 tr/min pendant 15 min. Le culot cellulaire obtenu sur héparine servira pour mesurer les paramètres du stress oxydatif.
- Sur des tubes sec, sans anticoagulant, centrifugés ensuite (10 min à 3000 tours/min) afin de récupérer le sérum, qui a été conservé à -18°C pour doser les hormones et le fer.

3.2. Prélèvement des organes

Les animaux sacrifiés ont été pesés puis ouverts ventralement après dissection des animaux le foie, les reins, le cœur, les testicules et le cerveau sont rapidement prélevés, débarrassés de leurs tissus adipeux, rincés avec une solution de chlorure de sodium (NaCl à 0,9%) puis pesés. Ensuite la moitié de chacun de ces organes a été conservés dans le formol afin de réaliser les coupes histologiques. L'autre moitié a été conservée dans le congélateur (-18°C) pour le dosage des paramètres du stress oxydatif. La figure 16 schématise les différentes étapes du protocole expérimental.

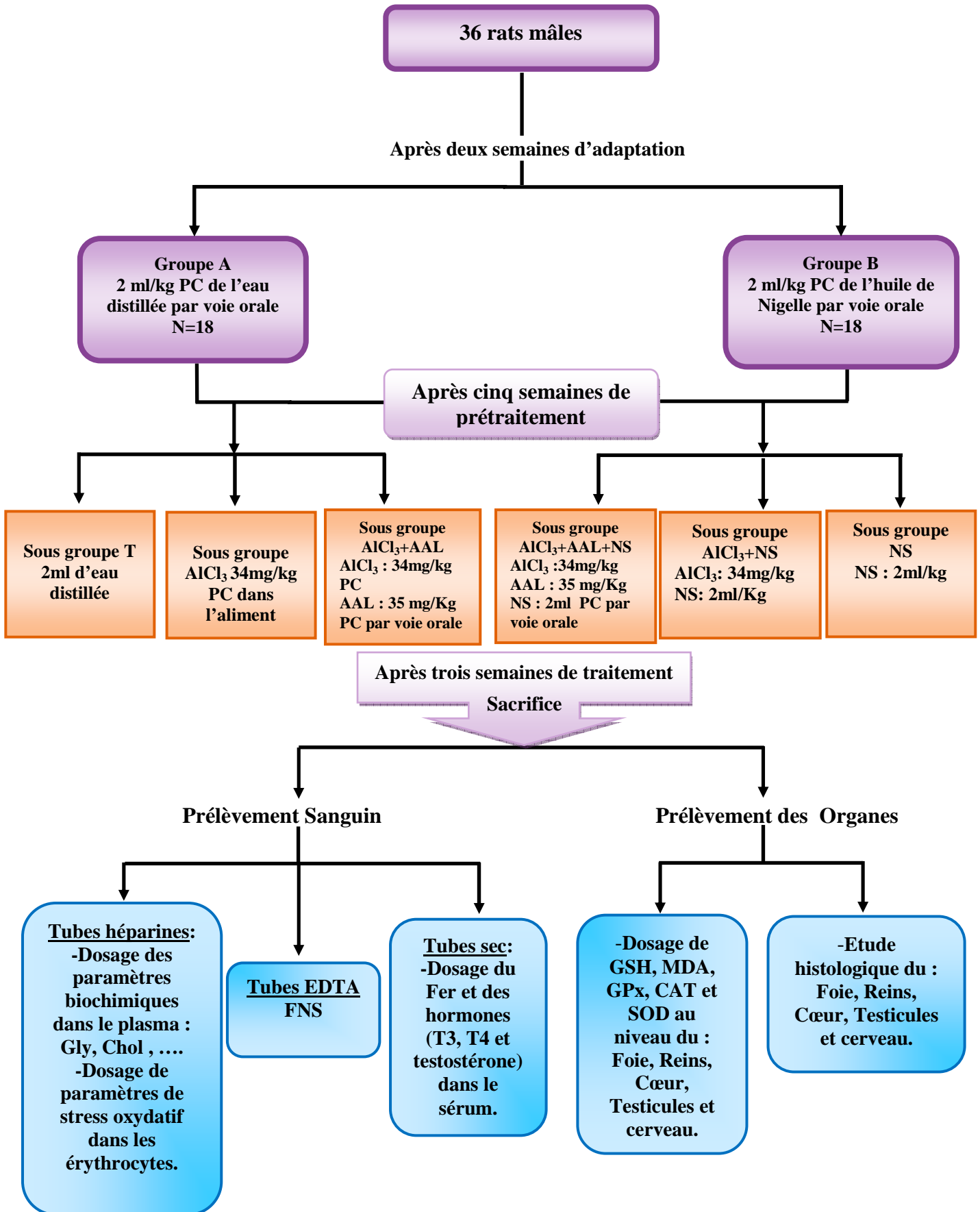


Figure 16: Schéma récapitulatif du protocole expérimental.

4. Détermination de la formule de numération sanguine (FNS)

La détermination de la formule de numération sanguine (FNS) a été effectuée à l'aide d'un automate de type « Selectra E »

5. Techniques de dosage

5.1. Dosage des hormones thyroïdiennes et de la testostérone

Le dosage de la triiodothyronine (T₃), de la thyroxine (T₄) et de la Testostérone a été effectué à l'aide d'un automate de type « Ellexys 2010 ».

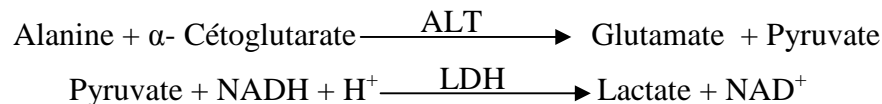
5.2. Dosage des paramètres biochimiques

Le dosage des paramètres biochimiques a été effectué selon les fiches techniques Spinreact.

5.2.1. Détermination de l'activité d'alanine aminotransferase (ALAT/TGP, EC 2.6.1.2)

➤ Principe

L'alanine aminotransferase (ALAT) appelée aussi glutamate pyruvate transaminase (TGP) catalyse le transfert réversible d'un groupe amine à partir de l'alanine au α -cétoglutarate formant le glutamate et le pyruvate. Le pyruvate produit est réduit en lactate par le lactate déshydrogénase (LDH) et le NADH selon le schéma réactionnel suivant:



Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité de l'alanine aminotransférase présente dans l'échantillon (Murray, 1984).

➤ Réactifs utilisés

Réactifs	Composition	Concentration
R1 Tampon	Tris pH 7.8	100 mmol/l
	L-alanine	500 mmol/l
R2 Substrat	NADH	0.18 mmol/l
	Lactate déshydrogénase (LDH)	1200 U/l
	α -Cétoglutarate	15 mmol/l

Pour préparer le réactif de travail nous avons dissout un comprimé du réactif R₂ dans une fiole du réactif R₁. Ce réactif est stable 21 jours à 2-8°C.

➤ **Échantillon:** plasma.

➤ **Mode opératoire**

Réactif de travail (ml)	1.0
Échantillon (µl)	100

On mélange et on incube pendant 1 minute et on fait une première lecture de l'absorbance optique (A) à 340 nm. L'absorbance optique (A) est relie à nouveau 3 fois après 1, 2, 3, minutes.

➤ **Calcul de l'activité**

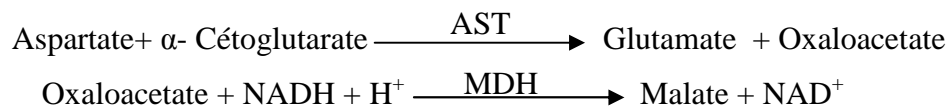
$$\text{Activité ALAT (U/L)} = \Delta A / \text{min} \times 1750$$

$\Delta A / \text{min}$: la valeur moyenne des trois lectures par minute.

5.2.2. Détermination de l'activité d'aspartate aminotransférase (ASAT/TGO, EC 2.6.1.1)

➤ **Principe**

L'aspartate aminotransferase (ASAT) appelée aussi l'oxaloacétate de glutamate transférase (TGO) catalyse le transfert réversible d'un groupe amine à partir de l'aspartate au α -cétoglutarate formant le glutamate et l'oxaloacetate. L'oxaloacetate produit est réduit en malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH (Murray, 1984).



➤ **Réactifs utilisés**

Réactifs	Composition	Concentration
R1 Tampon	Tris pH 7.8	80mmol/l
	L-aspartate	200mmol/l
R2 Substrat	NADH	0.18mmol/l
	Lactate déshydrogénase (LDH)	800U/l
	Malate déshydrogénase (MDA)	600U/l
	α -Cétoglutarate	12mmol/l

Pour préparer le réactif de travail nous avons dissout un comprimé du réactif R₂ dans une fiole du réactif R₁. Ce réactif est stable 21 jours à 2-8°C.

- **Échantillon:** plasma.
- **Mode opératoire**

Réactif de travail (ml)	1.0
Échantillon (µl)	100

On mélange et on incube pendant 1 minute et on fait une première lecture de l'absorbance optique (A) à 340 nm. L'absorbance optique (A) est relie à nouveau 3 fois après 1, 2, 3, minutes.

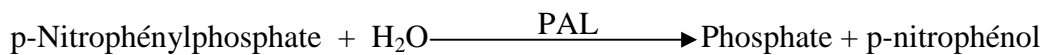
- **Calcul de l'activité**

$$\text{Activité ASAT (U/L)} = \Delta A / \text{min} \times$$

5.2.3. Détermination de l'activité de la phosphatase alcaline (PAL, EC 3.1.3.1)

- **Principe**

La phosphatase alcaline catalyse l'hydrolyse du p-Nitrophénylphosphate à pH 10.4 en phosphate et p-nitrophénol (Composé jaune) (Wenger *et al.*, 1984; Rosalki *et al.*, 1993).



- **Réactifs utilisés**

Réactifs	Composition	Concentration
R1 Tampon	Diéthanolamine (DEA) pH 10.4 Chlorure de magnisium	1 mmol/l 0.5 mmol/l
R2 Substrat	p-Nitrophénylphosphate (pNPP)	10 mmol/l

Pour préparer le réactif de travail nous avons dissout un comprimé du réactif R₂ dans une fiole du réactif R₁. Ce réactif est stable 21 jours à 2-8°C.

- **Échantillon:** plasma.
- **Mode opératoire**

Réactif de travail (ml)	1.2
Échantillon (µl)	20

On mélange et on incube pendant une minute ensuite, on mesure la variation d'absorbance par minute ($\Delta A/\text{min}$) à 405nm, pendant 3 minutes.

➤ **Calcul de l'activité**

$$\text{Activité phosphatase alcaline (U/L)} = \Delta A / \text{min} \times 3300$$

5.2.4. Détermination de l'activité du lactate déshydrogénase (LDH, EC 1.1.1.27)

➤ **Principe**

Le lactate déshydrogénase catalyse la réduction du pyruvate par le NADH selon la réaction suivante:



Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité de LDH présente dans l'échantillon (**Pesce, 1984**).

➤ **Réactifs utilisés**

Réactifs	Composition	Concentration
R1 Tampon	Imidazol	65 mmol/l
	Pyruvate	0.6 mmol/l
R2 Substrat	NADH	0.18 mmol/l

Pour préparer le réactif de travail nous avons dissout un comprimé du réactif R₂ dans une fiole du réactif R₁. Ce réactif est stable 2 jours à 2-8°C.

➤ **Échantillon:** plasma.

➤ **Mode opératoire**

Température	37°C
Réactif de travail (ml)	3.0
Échantillon (µl)	50

On agite et on incube une minute à 37°C et on fait une première lecture de l'absorbance optique (A) à 340 nm. L'absorbance optique (A) est relie à nouveau 3 fois après 1, 2, 3, minutes.

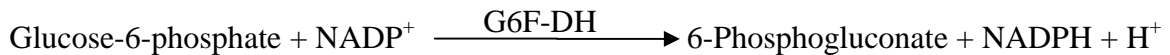
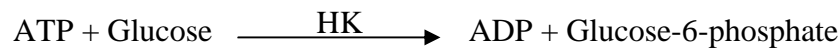
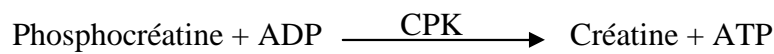
➤ Calcul de l'activité

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

5.2.5. Détermination de l'activité de la créatine phosphokinase (CPK, EC 2.7.3.2)

➤ Principe

La créatine phosphokinase (CPK) catalyse le transfert réversible d'un groupe phosphate de la phosphocréatine vers l'ADP. Cette réaction s'ajoute à d'autres catalysées par l'hexokinase (HK) et par le glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6P-DH):



La vitesse de formation de NADPH déterminé par photométrie, est proportionnelle à la concentration catalytique de CPK dans l'échantillon testé (Gerhardt *et al.*, 1979; Abbot *et al.*, 1984).

➤ Réactifs utilisés

Réactifs	Composition	Concentration
R1 Tampon	Imidazole pH 7.0 Glucose Acétate de magnésium EDTA	100 mmol/L 20 mmol/L 10 mmol/L 2 mmol/L
R2 Substrat	ADP AMP di-Adénosine-5-pentaphosphate NADP+ Hexokinase (HK) Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6F-DH) N-acétylcysteine Phosphate de créatine	2 mmol/L 5 mmol/L 10 mmol/L 2 mmol/L 2500 U/L 1500 U/L 20 mmol/L 30 mmol/L

Pour préparer le réactif de travail nous avons dissout une tablette de R₂ dans une capsule R₁ et mélanger le contenu doucement. Ce réactif est stable 10 jours à 2-8 °C.

➤ Échantillon: plasma.

➤ **Mode opératoire**

Température	37°C
Réactif de travail (ml)	1.0
Échantillon (µl)	20

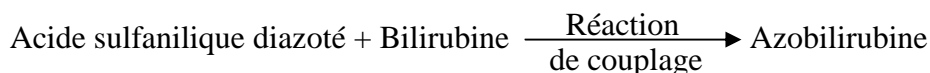
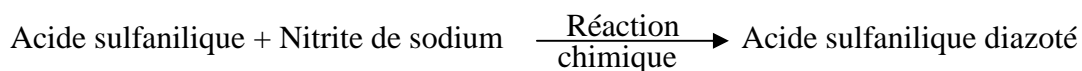
On agite et on incube pendant deux minute à 37°C et on fait une première lecture de l'absorbance optique (A) à 340 nm. Relie à nouveau chaque minute pendant 3 minutes.

➤ **Calcul de l'activité**

$$\text{Activité CPK (U/L)} = \Delta A / \text{min} \times 8095$$

5.2.6. Dosage de la bilirubine totale et directe➤ **Principe**

La bilirubine est définie comme la quantité de pigment biliaire dans le plasma réagissant avec l'acide sulfanilique diazoté à pH acide pour produire l'azobilirubine selon le schéma réactionnel suivant:



Cette réaction est instantanée avec la bilirubine directe (la bilirubine conjuguée), par contre avec la bilirubine totale (bilirubine non conjuguée) elle est indirecte et qui nécessite la solubilisation par le diméthylsulfoxyde (DMSO), en absence de DMSO, seule la bilirubine directe réagit (**Malloy et al., 1937; Kaplan et al., 1984**).

➤ **Réactifs utilisés**

Réactifs	Composition	Concentration
R₁ (D)	Acide sulfanilique	30 mmol/l
	Acide hydrochloridrique	150 mmol/l
R₂ (T)	Acide sulfanilique	30 mmol/l
	Acide hydrochloridrique	50 mmol/l
	Diméthylsulfoxyde (DMSO)	7 mol/l
R₃	Nitrite de sodium	29 mmol/l

➤ **Échantillon:** plasma.

➤ **Mode opératoire**

Réactifs	Blanc	B. totale	Blanc	B. directe
R ₁ (D) (ml)	-	-	1.5	1.5
R ₂ (T) (ml)	1.5	1.5	-	-
R ₃ (µl)	-	50	-	50
Échantillon (µl)	100	100	100	100
H ₂ O distillée (µl)	50	-	50	-

Mélanger et lire la densité optique après 5 minutes d'incubation à une longueur d'onde 555nm.

➤ **Calcul de la concentration**

$$\text{Bilirubine plasmatique (mg/dl)} = [(A) \text{ échantillon} - (A) \text{ blanc}] \times \text{facteur B}$$

Facteur B totale = 19,1 ; **Facteur B directe** = 14.

5.2.7. Dosage du glucose

➤ **Principe**

Sous l'action du glucose oxydase, le glucose est oxydé en acide gluconique avec libération du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ qui réagit sous l'action d'une peroxydase avec le phénol et le 4-aminophénazone pour former la quinone qui est un complexe coloré en rose. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration du glucose dans l'échantillon (**Trinder, 1969; Kaplan, 1984**).



➤ **Réactifs utilisés**

Réactifs	Composition	Concentration
Réactif	Tris pH 7.4	92 mmol/l
	Phénol	0.3 mmol/l
	Glucose oxydase (GOD)	15000 U/l
	Peroxydase (POD)	1000 U/l
	4-aminophénazone (4-AP)	2.6 mmol/l
Étalon	Glucose	100 mg/dl

- **Échantillon:** plasma.
- **Mode opératoire**

Réactifs	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif (ml)	1.0	1.0	1.0
Étalon (µl)	-	10	-
Échantillon (µl)	-	-	10
H ₂ O distillée (µl)	10	-	-

Mélanger et incuber pendant 10 minutes à 37°C. La lecture de l'absorbance optique (A) à 505 nm s'effectue contre le blanc réactif. La coloration est stable pendant 30 minutes.

- **Calcul de la concentration**

$$\text{Glucose (mg/dl)} = \frac{(A)\text{échantillon}}{(A)\text{étalon}} \times 100\text{mg/dl (concentration de l'étalon)}$$

5.2.8. Dosage des protéines totales

- **Principe**

Les ions cuivriques, dans un milieu alcalin, interagissent avec les liaisons peptidiques des protéines formant un complexe coloré en bleu-violet. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration des protéines totales dans les échantillons (**Koller, 1984; Burtis, 1999**).

- **Réactifs utilisés**

Réactifs	Composition	Concentration
R Biuret	Tartrate de sodium potassium	15 mmol/l
	Sodium iodique	100 mmol/l
	Potassium iodique	5 mmol/l
	Cuivre de sulfate	19 mmol/l
Étalon	Sérum albumine bovine	70 g/l

- **Échantillon:** plasma.
- **Mode opératoire**

Réactifs	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif (ml)	1.0	1.0	1.0
Étalon (µl)	-	25	-
Échantillon (µl)	-	-	25
H ₂ O distillée (µl)	25	-	-

Mélanger et incuber pendant 5 minutes à 37°C. L'absorbance optique (A) est lue à 540 nm contre le blanc réactif. La coloration est stable pendant 30 minutes.

➤ **Calcul de la concentration**

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

5.2.9. Dosage d'albumine

➤ **Principe**

L'albumine réagit avec le vert de bromocrésol (BCG), pour former un complexe coloré. Le pH du milieu est maintenu à 4.2 par le tampon. Après l'incubation, l'absorbance du mélange est mesurée à 628 nm (Rodkey, 1965; Doumas, 1971; Webster, 1974; Gendler *et al.*, 1984).

➤ **Réactifs utilisés**

Réactifs	Composition	Concentration
R ₁	Vert de bromocrésol pH 4.2	0.12m mol/l.
Étalon	Albumine	5g/dl

➤ **Échantillon:** plasma.

➤ **Mode opératoire**

Réactifs	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif (ml)	1.0	1.0	1.0
Étalon (µl)	-	5	-
Échantillon (µl)	-	-	5
H ₂ O distillée (µl)	5	-	-

Après une incubation à température ambiante pendant 10 minutes, l'absorbance optique est lue à 630 nm contre le blanc réactif. La coloration est stable pendant une heure à température ambiante.

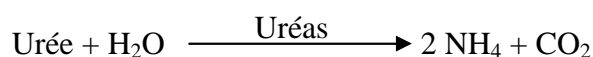
➤ **Calcul de la concentration**

$$\text{Albumine (g/dl)} = \frac{(A)\text{échantillon}}{(A)\text{étalon}} \times 5 \text{ g/dl (concentration de l'étalon)}$$

5.2.10. Dosage de l'urée

➤ Principe

Sous l'action de l'uréase, l'urée est hydrolysée en ammoniacque (NH₄) et dioxyde de carbone (CO₂). Les ions d'ammoniaques formés réagissent avec le salicylate et l'hypochlorite de sodium (NaClO) en présence de nitroprusside pour donner un complexe coloré en vert, l'intensité de couleur est proportionnelle à la concentration de l'urée dans le plasma (Fawcett *et al.*, 1960 ; Tabacco *et al.*, 1979; Kaplan, 1984).



➤ Réactifs utilisés

Réactifs	Composition	Concentration
R₁ Tampon	Phosphate pH 6.7	50 mmol/l
	EDTA	2 mmol/l
	Salicylate de sodium	400 mmol/l
	Nitroprusside de sodium	10 mmol/l
R₂ NaClO	Hypochlorite de sodium (NaClO)	140 mmol/l
	Hydroxide de sodium	150 mmol/l
R₃ Enzymes	Urease	30000U/l
Étalon	Solution standard d'urée	50 mg/dl

Pour préparer le réactif de travail nous avons dissout un comprimé du réactif R₃ dans un flacon du réactif R₁. Ce réactif est stable un mois à 2-8°C.

➤ **Échantillon:** plasma.

➤ **Mode opératoire**

Réactifs	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Étalon (µl)	-	10	-
Échantillon (µl)	-	-	10
H ₂ O distillée (µl)	10	-	-

Après agitation et incubation à 37° pendant 5 minutes, on pipette:

Réactif	Blanc	Étalon	Échantillon
R ₂ (ml)	1.0	1.0	1.0

Après une deuxième incubation à 37°C pendant 5 minutes, l'absorbance optique (A) est lue à 580 nm contre le blanc réactif. La coloration est stable pendant 30 minutes.

➤ **Calcul de la concentration**

$$\text{Urée (mg/dl)} = \frac{(A)\text{échantillon}}{(A)\text{étalon}} \times 50\text{mg/dl (concentration de l'étalon)}$$

5.2.11. Dosage de la créatinine

➤ **Principe**

L'essai est basé sur la réaction de la créatinine avec le picrate de sodium c'est la réaction de Jaffé. La créatinine réagit avec le picrate alcalin pour donner un complexe coloré, mesuré dans un intervalle de temps défini et proportionnel à la concentration en créatinine dans l'échantillon (Murray, 1984).

➤ **Réactifs utilisés**

Réactifs	Composition	Concentration
R ₁	Acide picrique	17.5 mmol/l
R ₂	Hydroxyde de sodium	0.29 mmol/l
Étalon	Créatinine	2 mg/ dl

Pour préparer le réactif de travail nous avons mélangé des volumes égaux du réactif R₁ et du réactif R₂. Le réactif de travail est stable 10 jours à 15-20°C

➤ **Échantillon:** plasma.

➤ **Mode opératoire**

Réactifs	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif (ml)	1.0	1.0	1.0
Étalon (µl)	-	100	-
Échantillon (µl)	-	-	100
H ₂ O distillée (µl)	100	-	-

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

➤ **Calcul de la concentration**

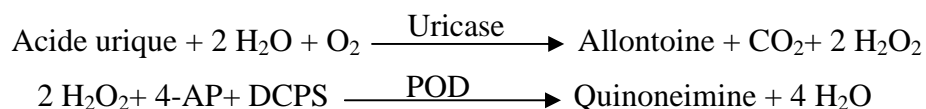
$$\text{Créatinine (mg/dl)} = \frac{(\Delta A)\text{échantillon} - (\Delta A)\text{Blanc}}{(\Delta A)\text{étalon} - (\Delta A)\text{Blanc}} \times 2\text{mg/dl (concentration de l'étalon)}$$

$$\Delta A = (A_2 - A_1).$$

5.2.12. Dosage de l'acide urique

➤ **Principe**

L'acide urique est oxydé par l'uricase en allantoinine et H_2O_2 , ce dernier et en présence de la peroxydase (POD), 4- Aminophénazone (4-AP) et le 2-4 Dichlorophénol sulfonate (DCPS) forme un complexe coloré le quinoneimine où l'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de l'acide urique plasmatique (**Fossati *et al.*, 1980; Schultz, 1984**).



➤ **Réactifs utilisés**

Réactifs	Composition	Concentration
R₁ Tampon	Phosphate pH 7.4	50 mmol/ L
	2-4 Dichlorophénol sulfonate (DCPS)	4 mmol/ L
R₂ Enzymes	Uricase	60 U/L
	Peroxydase (POD)	660 U/L
	Ascorbate oxydase	200 U/L
	4- Aminophénazone (4- AP)	1 mmol/ L
Étalon	Acide urique	6 mg/dl

Le réactif de travail est préparé en mélangeant le contenu du réactif (R₂) dans la fiole du réactif (R₁). Le réactif de travail est stable un mois à 2-8°C.

➤ **Échantillon:** plasma.

➤ **Mode opératoire**

Réactifs	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Étalon (µl)	-	25	-
Échantillon (µl)	-	-	25
H ₂ O distillée (µl)	25	-	-

On agite et on incube pendant 5 minutes à 37°C. L'absorbance optique (A) est lue à 520 nm contre le blanc réactif. La coloration est stable pendant 30 minutes.

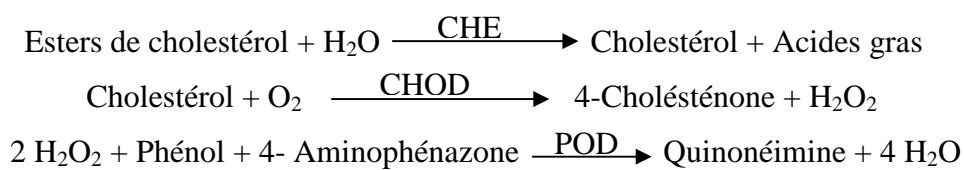
➤ **Calcul de la concentration**

$$\text{Acide urique (mg/dl)} = \frac{(A)_{\text{échantillon}}}{(A)_{\text{étalon}}} \times 6 \text{ (concentration de l'étalon)}$$

5.2.13. Dosage du cholestérol

➤ **Principe**

Le cholestérol et ses esters sont libérés à partir des lipoprotéines par des détergents. Le cholestérol estérase hydrolyse les esters du cholestérol. Le cholestérol libéré est oxydé par le cholestérol oxydase en 4-cholesténone avec formation du H₂O₂. Ce dernier réagit avec le phénol et le 4-Aminophénazone pour donner sous l'action d'une peroxydase, du quinonéimine rosâtre. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration du cholestérol dans l'échantillon (Meiattini *et al.*, 1978; Naito *et al.*, 1984).



➤ **Réactifs utilisés**

Réactifs	Composition	Concentration
R₁ Tampon	PIPES pH 6.9	90 mmol/l
	Phénol	26 mmol /l
R₂ Enzymes	Cholestérol estérase (CHE)	300 U/l
	Cholestérol oxydase (CHOD)	300 U/l
	Peroxydase (POD)	1250 U/l
	4- Aminophénazone (4- AP)	0.4 mmol/l
Étalon	Cholestérol	200 mg/dl

Le réactif de travail est préparé en mélangeant le contenu de la fiole du réactif (R₂) dans un flacon du réactif (R₁). Le réactif de travail est stable 4 mois à 2-8°C.

- **Échantillon:** plasma.
- **Mode opératoire**

Réactifs	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Étalon (µl)	-	10	-
Échantillon (µl)	-	-	10
H ₂ O distillée (µl)	10	-	-

Nous mélangeons et nous laissons incuber pendant 5 minutes à 37°C. L'absorbance optique (A) est lue à 505 nm contre le blanc réactif. La coloration est stable pendant 60 minutes.

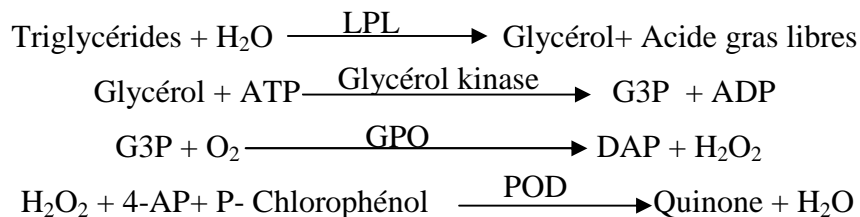
- **Calcul de la concentration**

$$\text{Cholestérol (mg/dl)} = \frac{(A)\text{échantillon}}{(A)\text{étalon}} \times 200\text{mg/dl (concentrations de l'étalon)}$$

5.2.14. Dosage des triglycérides

- **Principe**

Les triglycérides sous l'action de la lipoprotéine lipase sont hydrolysés en libèrent du glycérol et des acides gras libres. Le glycérol, sous l'effet du glycérol kinase et l'ATP, forme l'adenosine-5-diphosphate (ADP) et le glycérol-3-phosphate (G3P) qui est converti en dihydroxyacétone phosphate (DAP) et H₂O₂ sous l'action du glycérol phosphate déshydrogénase (GPO). Le H₂O₂ libéré réagit avec 4-aminophenazone (4-AP) et le p-chlorophénol pour donner, sous l'action d'une peroxydase (POD), de la quinone qui est un complexe coloré en rose. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration des triglycérides dans l'échantillon (Buccolo *et al.*, 1973; Fossati *et al.*, 1982; Kaplan *et al.*, 1984).



➤ Réactifs utilisés

Réactifs	Composition	Concentration
R₁ Tampon	GOOD pH 7.5 p-chlorophénol	50 mmol/l 2 mmol/l
R₂ Enzymes	Lipoprotéine Lipase (LPL) Glycérol kinase (GK) Glycérol-3- P- Oxydase (GPO) Peroxydase (POD) 4-Aminophénazone (4-AP) ATP	150000 U/l 500 U/l 2500 U/l 440U/l 0.1 mmol/l 0.1 mmol/l
Étalon	Triglycérides	200 mg/dl

Le réactif de travail est préparé en mélangeant le contenu de la fiole du réactif (R₂) dans un flacon du réactif (R₁). Le réactif de travail est stable 6 semaines à 2-8°C.

➤ **Échantillon:** plasma.

➤ **Mode opératoire**

Réactifs	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Étalon (µl)	-	10	-
Échantillon (µl)	-	-	10
H₂O distillée (µl)	10	-	-

Après agitation et incubation pendant 5 minutes à 37°C. L'absorbance optique (A) est lue à 505 nm contre le blanc réactif. La coloration est stable pendant 30 minutes.

➤ **Calcul de la concentration**

$$\text{Triglycérides (mg/dl)} = \frac{(A)\text{échantillon}}{(A)\text{étalon}} \times 200\text{mg/dl (concentrations de l'étalon)}$$

5.2.15. Dosage du HDL-cholestérol

➤ Principe

Les VLDL et les LDL sont précipités par le phosphotungstate en présence du magnésium. Après centrifugation le surnageant contenant les HDL est utilisé pour la détermination du HDL-cholestérol (Grove, 1979; Naito *et al.*, 1984).

➤ Réactifs utilisés

Réactif	Composition	Concentration
Réactif de précipitation	Acide phosphotungstique	14 mmol/l
	Chloride de magnésium	2 mmol /l

➤ Échantillon: plasma.

➤ Mode opératoire

Réactif (µl)	100
Échantillon (ml)	1.0

Nous mélangeons et nous laissons incuber pendant 10 minutes à température ambiante. Ensuite on centrifuge les échantillons à 4000 tr/min pendant 20 minutes. Pour déterminer la concentration de HDL-cholestérol nous avons suivi les mêmes étapes du dosage du cholestérol.

➤ Calcul de la concentration

La concentration du HDL-cholestérol est calculée par la formule suivante:

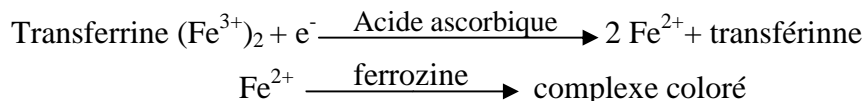
$$\text{HDL-cholestérol (mg/dl)} = \frac{(A)\text{échantillon}}{(A)\text{étalon}} \times \text{concentrations de l'étalon mg/dl}$$

$$\text{LDL-cholestérol (mg/dl)} = \text{Total cholestérol} - \frac{\text{Triglycérides}}{5} \times \text{HDL-cholestérol}$$

5.2.16. Dosage du fer

➤ Principe

Dans un milieu acide le fer est dissocié du complexe fer-transferrine. Le fer libre est réduit sous sa forme bivalente (ions ferreux) sous l'action de l'acide ascorbique. Les ions ferreux donnent un complexe coloré en réagissant avec la ferrozine (**Itano, 1984; Perrota et al., 1984**).



➤ Réactifs utilisés

Réactifs	Composition	Concentration
R ₁ (Tampon)	Acetate pH 4.9	100 mmol/l
R ₂ (Réducteur)	Acide ascorbique	99.7%
R ₃ (Solution chromogène)	Ferrozine	40 mmol/l
Étalon	Fer	100µg/l

Pour préparer le réactif de travail nous avons dissout le contenu du tube du réactif R₂ dans le flacon du réactif R₁. Le mélange est stable trois mois à 2-8°C.

➤ Échantillon: sérum.

➤ Mode opératoire

Réactifs	Réactif de travail Blanc	Étalon	Échantillon Blanc	Échantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0
R ₃ (gouttes)	1	1	-	-
H ₂ O distillée (µl)	200	-		
Étalon (µl)	-	200	-	-
Échantillon (µl)	-	-	200	200

On mélange et on incube cinq minutes à 37 °C ensuite l'absorbance est mesurée à 562 nm.

➤ Calcul de la concentration

$$\text{Fer (}\mu\text{g/dl)} = \frac{(A)\text{échantillon} - (A)\text{Blanc}}{(A)\text{étalon}} \times 100 \mu\text{g/dl (concentration de l'étalon).}$$

5.3. Dosage des paramètres de stress oxydatif

Tous les réactifs utilisés ont pour origine Sigma chemical co. (USA)

5.3.1. Préparation de l'homogénat

Un gramme de chaque organe étudié des rats des différents groupes expérimentaux, a été broyé et homogénéisé dans 2ml du tampon TBS (Tris 50mM, NaCl 150mM pH 7.4) à l'aide d'un homogénéisateur (Ultra-Turax), puis centrifugé à 9000tours /min à -4°C pendant 15 min. Le surnageant obtenu est aliquoté dans des tubes eppendorfs et conservé à -20°C en attendant d'effectuer les dosages des paramètres de stress oxydatif.

5.3.2. Dosage des protéines

➤ Principe

Le dosage des protéines est déterminé selon la méthode de **Bradford, (1976)**, qui utilise le Bleu Brillant de Coomassie G250 (BBC) comme réactif. Ce dernier, réagit avec les groupements amines (-NH₂) des protéines pour former un complexe de couleur bleue. L'apparition de cette couleur reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité établit la concentration des protéines qui est mesurée spectrophotométriquement à 595nm (à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible Jenway 6305).

➤ Mode opératoire

- Prélever 0.1 ml de l'homogénat ;
- Ajouter 5 ml de bleu brillant de Coomassie (BBC) (G250) ;
- Agiter et laisser le mélange à température ambiante pendant 5 min pour la stabilisation de la couleur ;
- Mesurer l'absorbance de l'échantillon à 595nm contre le blanc contenant la solution de tampon phosphate à la place de l'homogénat.

La densité optique obtenue est rapportée sur la courbe d'étalonnage (1mg/ml de BSA) préalablement réalisée dans les mêmes conditions, en utilisant le sérum albumine bovin (BSA) comme standard (Figure17).

5.3.3. Détermination du taux du glutathion réduit (GSH)

➤ Principe

Le dosage du glutathion réduit (GSH) est réalisé selon la méthode d'**Ellman, (1959)**, avec quelques modifications **Jollow *et al.*, (1974)**. Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5-mercaptopurique qui résulte de la réduction de l'acide 5-5-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion.

➤ Mode opératoire

- Prélever 0.8 ml de l'homogénat ;
- Ajouter 0.2 ml de la solution d'acide sulfosalicylique (0.25%) et laisser pendant 15 min dans un bain de glace ;
- Centrifuger à 1000 tours/min pendant 5 min ;
- Prélever 0.5 ml du surnageant ;
- Ajouter 1ml du tampon Tris-EDTA (contenant 0.4M de Tris, 0.02M d'EDTA, pH 9.6)
- Ajouter 0.025 ml de l'acide 5-5-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) à 0.01 M ;
- Laisser pendant 5 min à une température ambiante et lire les densités optiques à 412nm contre le blanc réactif.

➤ Calcul de la concentration

On calcule la concentration du GSH exprimée en nanomoles par milligramme de protéines (nmol/mg prot) selon la formule suivante:

$$\text{GSH (nmol GSH/mg proteins)} = \frac{\text{DO} \times 1 \times 1.525}{13100 \times 0.8 \times 0.5 \text{ mg protéines}}$$

DO: Densité optique.

1: Volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation.

1.525: Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant.

13100: Coefficient d'absorbance du groupement -SH à 412 nm.

0.8: Volume de l'homogénat après déprotéinisation trouvé dans un 1 ml.

0.5: Volume du surnageant trouvé dans un 1.525 ml.

5.3.4. Détermination du taux de la malondialdéhyde (MDA)

➤ Principe

Le dosage de la malondialdéhyde (MDA) est réalisé selon la méthode de **Buege et Aust, (1984)**. Le principe de ce dosage est basé sur la formation d'une réaction entre les fonctions aldéhydes de la MDA libérées par l'hydrolyse acide à 80°C et l'acide thiobarbiturique (TBA) donnant un complexe de couleur rose qui peut être donc mesurer par spectrophotométrie d'absorption à 530 nm (figure 18).

➤ Mode opératoire

- Prélever 375 µl de l'homogénat (surnageant) ;
- Ajouter 150 µl de la solution tampon TBS (Tris 50mM, NaCl 150mM pH 7.4) ;
- Ajouter 375 µl de la solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%) ;
- Vortexer et Centrifuger à 1000 tours/min pendant 10 min à 4°C ;
- Prélever 400 µl du surnageant ;
- Ajouter 80 µl du HCl (0.6 M) ;
- Ajouter 320 µl de la solution Tris-TBA (Tris 26 mM, TBA 120mM) ;
- Mélanger et incuber au bain marie à une température de 80°C pendant 10 min ;
- Lire les densités optiques à 530 nm contre le blanc réactif.

➤ Calcule de la concentration

On calcule la concentration de MDA exprimée en nanomoles par milligramme de protéines (nmol/mg prot) selon l'équation:

$$\text{MDA (nmol/mg protéines)} = \frac{\text{DO} \times 10^6}{\text{E} \times \text{L} \times \text{X} \times \text{Fd}}$$

C : Concentration en nmol/mg de protéines.

DO : Densité optique lue à 530 nm.

E : Coefficient d'extinction molaire du MDA = $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

L : Longueur du trajet optique = 0.779 cm.

X : Concentration de l'extrait en protéines (mg/ml).

Fd : Facteur de dilution : Fd = 0.2083.

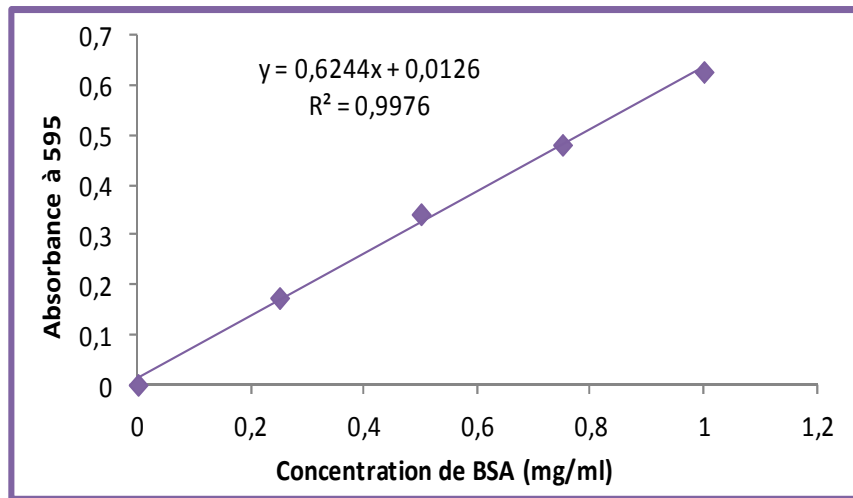


Figure 17: Courbe d'étalonnage de la BSA (1mg/ml).

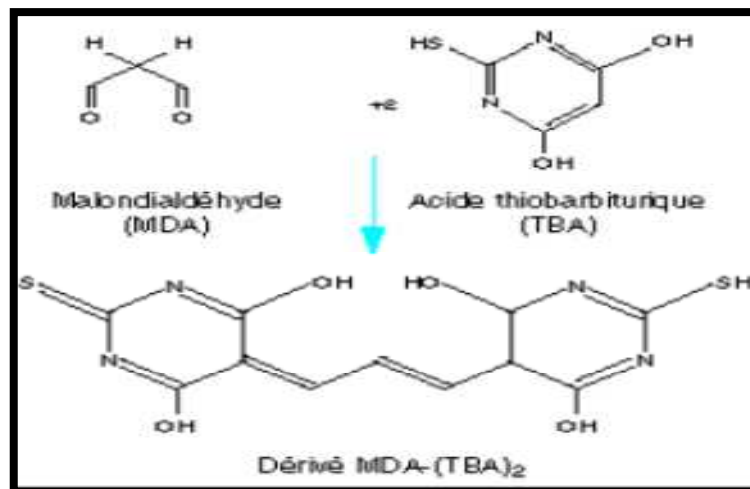


Figure 18: Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique.

5.3.5. Détermination de l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx) (E.C. 1.11.1.9)

➤ Principe

L'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx) a été mesurée par la méthode de **Flohe et Gunzler, (1984)**. Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) 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 (0.1mM) ;
- Ajouter 0.2 ml de la solution tampon TBS (Tris 50mM, NaCl 150mM pH 7.4) ;
- Incuber au bain marie à 25°C, pendant 5 min ;
- Ajouter 0.2 ml de H_2O_2 (1.3 mM) pour initier la réaction et laisser agir pendant 10min
- Ajouter 1ml de TCA (1%) pour arrêter la réaction et laisser pendant 30 min dans un bain de glace ;
- Centrifuger à 3000 tours/min durant 10 min ;
- Prélever 0.48 ml du surnageant ;
- Ajouter 2.2 ml de la solution tampon TBS (Tris 50mM, NaCl 150mM pH 7.4) ;
- Ajouter 0.32 ml de DTNB (1.0mM) ;
- Mélanger et après 5 minutes lire les densités optiques à 412 nm.

➤ Calcul de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique du GPx est exprimée en nanomoles de GSH oxydé par milligramme de protéines (nmolGSH/mg prot) selon l'équation:

$$\text{GPx (nmol GSH/mg protéines)} = \left[\frac{(\text{DO}_{\text{échantillon}} - \text{DO}_{\text{étalon}}) \times 0.04}{\text{DO}_{\text{étalon}}} \right] \times \frac{5}{\text{mg protéines}}$$

DO échantillon: Densité optique de l'échantillon.

DO étalon: Densité optique de l'étalon.

0.04: Concentration de substrat (GSH).

5.3.6. Détermination de l'activité enzymatique de la catalase (E.C.1.11.1.6)

➤ Principe

La méthode d'Aebi, (1974), est utilisée pour déterminer l'activité de la catalase. Le principe de cette méthode consiste à mesurer la variation de la densité optique à 240nm consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène en faisant réagir dans le tampon phosphate (100mM) et H₂O₂ (500mM) pendant 1minutes à pH 7.4 à une température d'incubation de 25°C.

➤ Mode opératoire

Réactifs	Blanc	Échantillon
Tampon phosphate (100mM, pH7.5) (µl)	800	780
H ₂ O ₂ (500mM) (µl)	200	200
Homogénat (µl)	-	20

➤ Calcule de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique de la catalase est exprimée en micromoles de H₂O₂ par minute par milligramme de protéines (µmol H₂O₂/min/mg prot) selon la formule suivante:

$$\text{Catalase } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min/mg protéines}) = \frac{\Delta\text{DO}_{/\text{min}}}{\varepsilon \times X \times L \times 0.02}$$

ε: Coefficient d'extinction moléculaire de l'eau oxygénée, $\varepsilon_{\text{H}_2\text{O}_2} = 0.043 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1} = 0,043 \mu\text{mol cm}^{-1}\text{ml}^{-1}$.

L: Trajet optique de la cuve = 1 cm.

X: Concentration de protéines en mg/ml.

5.3.7. Détermination de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD) (E.C.1.15.1.1)

➤ Principe

L'activité enzymatique de la superoxyde dismutase est déterminée par la méthode de **Asada et al., (1974)**. Le principe de cette méthode est basé sur l'oxydation du NBT (Nitrobleu-tétrazolium) par l'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$, ce dernier formé par la réaction de photo-réduction du complexe riboflavine/méthionine. Dans un milieu aérobie, le mélange riboflavine, méthionine et NBT donne une coloration bleuâtre. La présence de SOD inhibe l'oxydation du NBT.

➤ Mode opératoire

Réactifs	Blanc	Étalon	Échantillon
EDTA-Met (0.3mM) (µl)	1000	1000	1000
Tampon phosphate (50mM, pH7.8) (µl)	892.2	892.2	892.2
Échantillon (µl)	-	-	50
Tampon phosphate (50mM, pH7.8) (µl)	1000	1000	950
NBT (2.64mM) (µl)	85.2	85.2	85.2
Riboflavine (0.26Mm) (µl)	22.6	22.6	22.6

Incuber les cuves contenant l'échantillon ainsi que la cuve du blanc sous une lampe de bureau (source lumineuse) pendant 20min. Lire la DO à 560 nm

➤ Calcule de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique de la SOD est exprimée en unité enzymatique par milligramme de protéines (U/mg de prot) selon la formule:

$$\text{SOD (U/mg de protéines)} = \left[\frac{(\text{DO}_{\text{Blanc}} - \text{DO}_{\text{échantillon}})}{\text{DO}_{\text{Blanc}}} \times 100 \right] \times 20$$

6. Etude histologique

Les coupes histologiques ont été réalisées à l'hôpital d'Ibn Roched d'Annaba service d'anatomie pathologie à l'aide d'un appareil automatique. Afin de réaliser les coupes histologiques nous avons utilisé la technique classique décrite par **Hould, (1984)**, qui comporte les étapes suivantes:

- **Fixation:** la fixation des échantillons a été faite par immersion dans le formol. Ensuite les organes étudiés de chaque rat sont retirés du formol puis coupés à l'aide d'une lame bistouri afin de réaliser des prélèvements pour l'étude histologique avec une surface de 1 à 2 cm² et une épaisseur proche de 1.5 mm, les pièces obtenues sont ensuite mises dans des cassettes spécialisées à parois tournées qui permettent le passage des liquides.
- **Déshydratation:** par immersion successive des pièces dans des bains d'éthanol de degré croissant (70, 80, 90 et 100%) pour des durées adaptées à leurs épaisseurs puis dans un bain de xylène. Les deux derniers bains sont séparés par un lavage à l'eau distillée.
- **Inclusion et réalisation des blocs:** après déshydratation les pièces anatomiques sont d'abord imprégnées de paraffine liquide par passage dans plusieurs bains, puis à l'aide d'une pince métallique, chaque pièce est extraite du dernier bain d'imprégnation est versée rapidement entre des barres adaptables à leur dimensions dit barres de Leuckart, dont le fond contient de la paraffine. Cette étape est appelée étape de l'enrobage. Après refroidissement et solidification on se trouve en présence d'un bloc de paraffine dur à l'intérieur duquel la pièce prélevée est incluse. Cette opération fait appel à des appareils dit 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. A la fin on accompagne le bloc d'une étiquette d'identification.
- **Confection des coupes:** elles sont faites à l'aide d'un appareil spécial appelé microtome, qui permet de réaliser des tranches de section de 2 à 5 µm d'épaisseur reliées entre elles sous forme des rubans, les quelles sont par la suite étalées, dépliées et fixées sur des lames porte-objets à l'aide d'une eau gélative chauffée.
- **Déparaffinage et réhydratation:** un trajet inverse de celui qui avait nécessité l'inclusion doit être parcouru. Le déparaffinage est fait par la chaleur (on met les lames dans une étuve 100° pendant 20min) et dans deux bains du xylène (solvant de la paraffine), ensuite la réhydratation est effectuée en immergeant les lames dans des bains d'éthanol de degré décroissant (100, 90, 80 et 70%) puis dans l'eau distillée.

- **Coloration:** la coloration est faite selon la technique à l'Hématoxyline-Eosine ou (Hématéine-Eosine), qui nécessite la présence de l'alcool acide, l'eau ammoniacale et la solution d'Eosine. Elle suit les étapes suivantes:
- 1- Immerger les lames dans un bain d'hématoxyline de Harris (15min) qui colore en bleu violacée les structures basophiles (noyaux).
 - 2- Différencier dans l'alcool acide, puis les rincer à l'eau de robinet en suite vérifier la différenciation au microscope.
 - 3- Bleuir dans un bain d'eau ammoniacale.
 - 4- Immerger dans un bain d'Eosine (15secondes à 2min) qui colore les structures acidophiles (cytoplasme) en rose.
 - 5- Enfin, déshydrater, éclaircir et monter les échantillons entre lame et lamelle puis passer à l'observation au microscope photonique, lequel est équipé d'un appareil photographique qui permet la réalisation des photographiées.

7. Traitement statistique des résultats

Les résultats ont été rassemblés dans des tableaux, exprimés sous forme de moyenne plus ou moins l'écart type ($Moy \pm SEM$) illustrés par des histogrammes, les moyennes sont comparées par le teste d'ANOVA suivi par le test t de student.

Nous avons effectué deux comparaisons:

- Les groupes traités ($AlCl_3$, $AlCl_3+AAL$, $AlCl_3+AAL+NS$, $AlCl_3+NS$ et NS) par rapport au groupe témoin:
- *: Différence significative ($p \leq 0.05$) ;
 - ** : Différence hautement significative ($p \leq 0.01$) ;
 - *** : Différence très hautement significative ($p \leq 0.001$).
- Les groupes traités ($AlCl_3+AAL$, $AlCl_3+AAL+NS$ et $AlCl_3+NS$) par rapport au groupe traité ($AlCl_3$):
- #: Différence significative ($p \leq 0.05$) ;
 - ##: Différence hautement significative ($p \leq 0.01$) ;
 - ###: Différence très hautement significative ($p \leq 0.001$).

Avec **p** : Seuil de signification.



RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre I: Etude phytochimique

1. Teneur en flavonoïdes, en tanins et en polyphénols de l'huile de *Nigella sativa*

Les résultats des tests phytochimiques effectués sur l'huile de nigelle sont rapportés dans le tableau 3. L'analyse quantitative des composés phénoliques révèle que la valeur des polyphénols totaux est de l'ordre de 0.38 mg EAG/100g NSO, tandis que la teneur en flavonoïdes est 0.5 mg EQ/g NSO et la concentration des tanins est 0.4 mg EC/g NSO. De plus, cette analyse montre que les flavonoïdes sont les composés majoritaires de cette huile.

2. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antiradicalaire de l'huile lyophilisée indique que les grains de nigelle présentent une importante activité antioxydante avec des concentrations d'inhibition de 59.9 mg/ml et 86.1 mg/ml du radical DPPH et de l'anion superoxyde respectivement (Tableau 3).

Tableau 3: Teneurs en composés phénoliques et activité antioxydante de l'huile de nigelle.

Teneur en flavonoïdes (mg EQ/g NSO)	0.5±0.01
Teneur en tanins condensés (mg EC/g NSO)	0.4±0.01
Teneur en polyphénols totaux (mg EAG /100 g NSO)	0.38±0.01
50% potentiel anti-radicalaire de DPPH (mg/ml)	59.9±2.52
50% potentiel scavenger de l'anion superoxyde (mg/ml)	86.1±2.23

EAG: Equivalents d'acide gallique. EQ: Equivalents de quercétine. EC: Equivalents de catéchine.

➤ Discussion

Afin de proposer des alternatives thérapeutiques peu onéreuses avec moins d'effets indésirables, les recours au traitement par les plantes ainsi que la recherche des nouvelles substances à activités biologiques constituent une des plus grandes préoccupations scientifiques au cours de ces dernières années (**Djeridane et al., 2007; Krishnaiah et al., 2010**).

L'effet thérapeutique d'une plante médicinale est attribué à l'action de ses constituants, de ce fait l'analyse phytochimique est une étape préliminaire nécessaire pour identifier la présence des différents composants connus par leurs effets bénéfiques dans la plante étudiée (**Djeridane et al., 2007; Mariod et al., 2009; Krishnaiah et al., 2010**).

L'effet antioxydant des extraits végétaux est majoritairement attribué à la présence des composés phénoliques, ce groupe de composés est l'un des groupes ubiquitaires le plus largement distribués chez les végétaux. En effet, les composés phénoliques possédant de nombreux autres vertus médicinales à savoir: anti-apoptotique, antiviellissement, anti-carcinogène, anti-inflammatoire, anti-athérosclérotique, protection contre les maladies cardiovasculaires et amélioration de la fonction endothéliale, ainsi que l'inhibition de l'angiogenèse et la prolifération cellulaires (**Djeridane et al., 2007; Mariod et al., 2009; Popovici et al., 2009**).

L'activité antioxydant d'un composé bioactive, sert comme indicateur très significatif du potentiel antioxydant, elle correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. De nombreuses méthodes sont utilisées actuellement pour évaluer cette activité (**Bourgou et al., 2008; Popovici et al., 2009**).

Plusieurs travaux ont été consacrés pour évaluer les effets antioxydants des plantes médicinales (**Popovici et al., 2009; Krishnaiah et al., 2010; Messarah et al., 2012^b**). Pour cela, nous nous sommes intéressés, dans le présent travail, à étudier les effets bénéfiques de l'huile de nigelle (*Nigella sativa*) contre le stress oxydatif induit par le chlorure d'aluminium. Nous avons réalisé une étude phytochimique préliminaire *in vitro* qui vise à déterminer la teneur en composés phénoliques ainsi que d'évaluer l'activité antioxydante de l'huile de nigelle. L'activité antioxydante de l'huile de *Nigella sativa* est évaluée en utilisant deux méthodes, le piégeage du radical libre DPPH et l'effet scavenger vis-à-vis le radical superoxyde.

Le DPPH est un radical libre stable, très utilisé pour tester les activités de piégeage d'une molécule antioxydante vis-à-vis les radicaux libres. En présence des composés antiradicalaires le radical DPPH est réduit en α - α , diphényl- β -picryl-hydrazine. Les absorbances mesurées servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon (Erkan *et al.*, 2008; Krishnaiah *et al.*, 2010).

Les résultats obtenus montrent la présence des taux notables et variables en composés phénoliques dont les polyphénols, les flavonoïdes et les tanins, ceci signifie que les grains de nigelle ainsi que l'huile qui en est extraite sont une bonne source en substances antioxydantes, donc l'effet exercé sur les paramètres dosés au cours de notre étude peut être due à l'un de ces composés ou à la conjugaison entre eux. Nos résultats concordent avec d'autres travaux de recherche (Al-Saleh *et al.*, 2006; Bourgou *et al.*, 2008; Mariod *et al.*, 2009) qui ont montrés que les principales substances bioactives du nigelle sont les flavonoïdes, les polyphénols et les tanins. Les résultats de notre étude préliminaire prouvent aussi que l'espèce *Nigella sativa* a un bon pouvoir de neutralisation du radical DPPH (Bourgou *et al.*, 2008; Krishnaiah *et al.*, 2010).

Dans cette étude, l'effet scavenger de l'huile des grains de *Nigella sativa* vis-à-vis du radical superoxyde a été évalué spectrophotométriquement en suivant la diminution de la réduction de NBT (nitroblue tetrazolium) en formazan. Les résultats obtenus ont montré que l'effet scavenger du *Nigella sativa* semble être lié à sa richesse en composés phénoliques (polyphénols, flavonoïdes et tanins). De plus, il est partiellement attribué à la présence d'autres substances telle que les huiles essentielles (Al-Saleh *et al.*, 2006; Bourgou *et al.*, 2008).

Chapitre II: Impact du chlorure d'aluminium sur la variation de quelques paramètres physiologiques et hématologiques: Effets protecteurs de la supplémentation en huile de nigelle et/ou en acide alpha lipoïque

1. Variation du Poids corporel

Durant les 5 semaines du prétraitement, aucune différence significative n'apparaît entre le lot NS et le lot témoin. A partir de la 7^{ème} semaine, une diminution non significative est enregistrée chez le lot $AlCl_3$ comparant au témoin.

Après 10 semaines de traitement, nos résultats (Tableau 4) montrent une baisse significative du poids corporel chez les rats du lot $AlCl_3$ comparativement aux rats du lot témoin. Parallèlement, le traitement des rats par la combinaison $AlCl_3$ +AAL ainsi que par la combinaison $AlCl_3$ +NS a amélioré le gain du poids corporel par rapport aux rats du lot $AlCl_3$, cette amélioration est statistiquement significative.

2. Variation de la consommation quotidienne d'aliment

Dans notre étude, les résultats montrent une diminution significative ($P \leq 0.001$) de la consommation quotidienne d'aliment chez le groupe $AlCl_3$ (-12.01%) ainsi que chez le groupe $AlCl_3$ +AAL+NS (-9.64%) par rapport au groupe témoin. Nous avons enregistré aussi, une augmentation significative chez les groupes $AlCl_3$ +AAL et $AlCl_3$ +NS comparativement au groupe $AlCl_3$ (Tableau 5).

3. Variation de la consommation quotidienne d'eau de boisson

Concernant la consommation quotidienne de l'eau de boisson, nos résultats révèlent une diminution significative de l'ordre de (-34.64% et -17.25%) comparant le groupe $AlCl_3$ +NS aux groupes témoin et $AlCl_3$ respectivement (Tableau 5).

Tableau 4: Variation du poids corporel (g) chez les rats témoins et les rats traités.

Paramètres	Lots expérimentaux					
	T	AlCl ₃	AlCl ₃ +AAL	AlCl ₃ +AAL+NS	AlCl ₃ +NS	NS
Poids initial (g)	236.33±51.34	242.67±41.63	243.17±29.74	243.17±28.23	240.17±21.53	241.33±22.37
Poids final (g)	311.17±54.61	261.17±38.20*	326.5±46.85 [#]	315±32.24	318.83±13.54 [#]	324±34.13
%	-	- 16.06	+ 25.01	-	+ 22.07	-
Gain de poids (g)	+74.84	+ 18.5	+ 83.33	+ 71.83	+ 78.66	+ 82.67

Tableau 5: Variation de la consommation d'aliment (g/rat/j) et de l'eau de boisson (ml/rat/j) chez les rats témoins et les rats traités.

Paramètres	Lots expérimentaux					
	T	AlCl ₃	AlCl ₃ +AAL	AlCl ₃ +AAL+NS	AlCl ₃ +NS	NS
Quantité d'aliment consommée (g/rat/j)	21.14±2.26	18.6 ± 4 ^{***}	20.87±2.31 ^{###}	19.1±2.1 ^{***}	21.62±2.54 ^{###}	21.6±2.25
%	-	- 12.01	+ 12.20	- 9.64	+ 16.23	-
Quantité d'eau consommée (ml/rat/j)	24.94±8.82	19.7±6.30	24.09±9.05	23.34±6.02	16.3±6.16 ^{**,#}	22.15±8.1
%	-	-	-	-	- 34.64, - 17.25	-
Quantité d'AlCl ₃ ingérée (mg/rat/j)	-	6.32±1.35	7.1±1.35	6.5±1.05	7.34±1.2	-

*p≤ 0.05 ; **p≤ 0.01 ; ***p≤0.001 par comparaison avec les rats témoins.

[#]p≤0.05 ; ^{###}p≤0.001 par comparaison avec les rats traités par AlCl₃.

4. Variation du poids relatif de certains organes

Les résultats obtenus (Tableau 6, Figure 19) montrent une augmentation significative du poids relatif du foie chez les lots $AlCl_3$ et $AlCl_3+AAL+NS$ comparativement au lot témoin. Nos résultats montrent également une augmentation significative du poids relatif des reins, du cœur et du cerveau chez le lot $AlCl_3$ par rapport au lot témoin. Concernant le poids relatif des testicules, nos résultats révèlent une augmentation significative chez le lot $AlCl_3$ et le lot $AlCl_3+NS$ par rapport au témoin.

Par contre, une diminution considérable du poids relatif des organes étudiés est enregistrée après suppléments en NS et/ou en AAL. Les diminutions observées chez les lots $AlCl_3+AAL$, $AlCl_3+AAL+NS$ et $AlCl_3+NS$ comparativement au lot $AlCl_3$ sont statistiquement significatives.

Tableau 6: Variation du poids relatif (g /100g de PC) de certains organes (foie, reins, cœur, testicules et cerveau) chez les rats témoins et les rats traités.

Paramètres	Lots expérimentaux					
	T	$AlCl_3$	$AlCl_3+AAL$	$AlCl_3+AAL+NS$	$AlCl_3+NS$	NS
Poids relatif du foie (g/100g PC)	2.63±0.16	3.42±0.48**	2.68±0.22 [#]	3.12±0.23*	2.76±0.17 [#]	2.90±0.63
%	-	+ 30.03	-21.63	+ 18.63	- 19.29	-
Poids relatif des reins (g/100g PC)	0.54±0.02	0.88±0.1**	0.60±0.05 ^{##}	0.56±0.02 ^{##}	0.55±0.01 ^{##}	0.55±0.08
%	-	+ 62.96	- 31.81	- 36.36	- 37.5	-
Poids relatif du cœur (g/100g PC)	0.31±0.04	0.53±0.1**	0.34±0.03 [#]	0.32±0.04 [#]	0.3 ±0.02 [#]	0.28±0.04
%	-	+ 38.7	- 20.93	- 25.58	- 30.23	-
Poids relatif des testicules (g/100g PC)	0.6±0.23	1.2±0.24***	0.8±0.16 [#]	0.67±0.13 [#]	0.92±0.15*	0.62±0.1
%	-	+ 100	- 33.33	- 44.16	+ 53.33	-
Poids relatif du cerveau (g/100g PC)	0.31±0.05	0.54±0.1**	0.4±0.1 [#]	0.34±0.08 [#]	0.32±0.05 ^{##}	0.35±0.06
%	-	+ 74.19	- 25.92	- 37.03	- 40.74	-

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ par comparaison avec les rats témoins.

[#] $p \leq 0.05$; ^{##} $p \leq 0.01$ par comparaison avec les rats traités par $AlCl_3$.

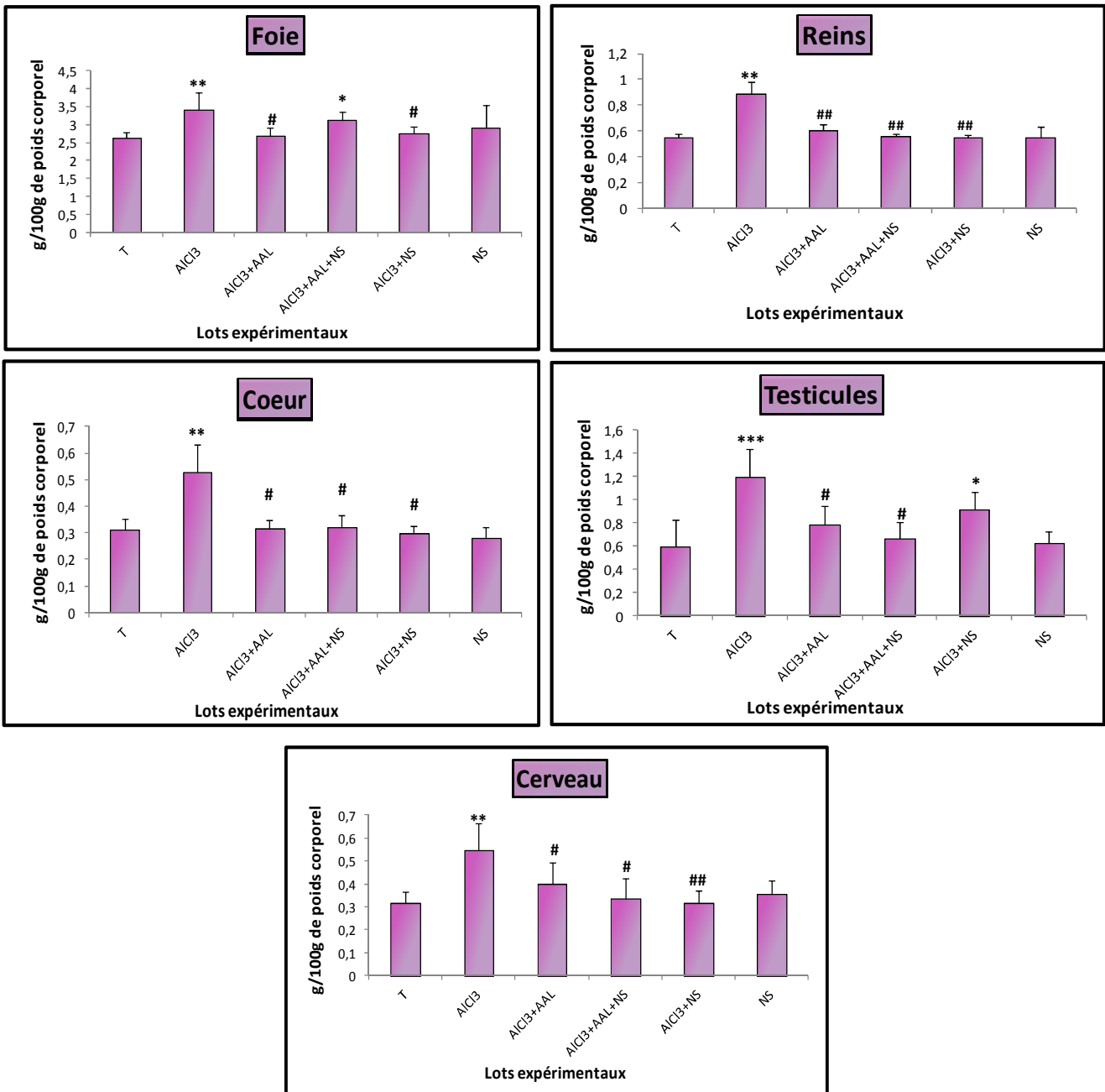


Figure 19: Variation du poids relatif de certains organes (foie, reins, cœur, testicules et cerveau) chez les rats témoins et les rats traités.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ par comparaison avec les rats témoins.

$p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$ par comparaison avec les rats traités par $AlCl_3$.

5. Variation des paramètres hématologiques

➤ Nombre des globules rouges

Les résultats obtenus montrent une diminution significative ($P \leq 0.05$) du nombre des globules rouges chez les rats du lot AlCl_3 (-18.97%) par rapport aux rats témoins (Tableau 7, Figure 20). Nos résultats révèlent aussi une augmentation significative chez les lots $\text{AlCl}_3 + \text{AAL}$, $\text{AlCl}_3 + \text{AAL} + \text{NS}$ et $\text{AlCl}_3 + \text{NS}$ comparativement au lot AlCl_3 .

➤ Nombre des globules blancs

D'après les résultats obtenus (Tableau 7, Figure 20), nous avons enregistré une augmentation significative du nombre des globules blancs (+26.18%) chez les rats du lot traité par AlCl_3 et les rats du lot NS par rapport au témoin. En revanche, nous avons enregistré un rétablissement par diminution significative du nombre des globules blancs chez les groupes $\text{AlCl}_3 + \text{AAL}$, $\text{AlCl}_3 + \text{AAL} + \text{NS}$ et $\text{AlCl}_3 + \text{NS}$ comparativement au groupe AlCl_3 .

➤ Taux d'hématocrite

On note chez le lot NS une augmentation significative ($P \leq 0.01$) du taux d'hématocrite (+5.52%) par rapport au lot témoin (Tableau 7, Figure 20).

➤ Taux d'hémoglobine et concentration corpusculaire moyen en hémoglobine (CCMH)

Les résultats de notre étude révèlent, une diminution statistiquement significative ($P \leq 0.01$) du taux d'hémoglobine (-17.75%) et du CCMH (-5.11%) chez le lot AlCl_3 par rapport au lot témoin. Par contre, le traitement des rats par les combinaisons $\text{AlCl}_3 + \text{AAL}$, $\text{AlCl}_3 + \text{AAL} + \text{NS}$ et $\text{AlCl}_3 + \text{NS}$ a entraîné une amélioration figuré par une augmentation hautement significative du taux d'hémoglobine et du CCMH comparativement au lot AlCl_3 (Tableau 7, Figure 20).

➤ Volume globulaire moyen (VGM) et taux des plaquettes

D'après nos résultats, aucune différence significative du volume globulaire moyen et du taux des plaquettes n'est enregistrée entre les rats des différents lots traités (AlCl_3 , $\text{AlCl}_3 + \text{AAL}$, $\text{AlCl}_3 + \text{AAL} + \text{NS}$, $\text{AlCl}_3 + \text{NS}$ et NS) et les rats du lot témoin (Tableau 7, Figure 20).

6. Effet sur la concentration plasmatique en fer sérique

Selon les résultats obtenus (Tableau 7, Figure 20) on remarque par rapport au lot témoin une augmentation de la concentration du fer sérique chez les lots AlCl₃ (+48.14%), AlCl₃+AAL+NS (+57.03%), AlCl₃+AAL (+45.92%) et AlCl₃+NS (+29.92%), cette augmentation est statistiquement significative.

Tableau 7: Variation des paramètres hématologiques et de la concentration en fer sérique chez les rats témoins et les rats traités.

Paramètres	Lots expérimentaux					
	T	AlCl ₃	AlCl ₃ +AAL	AlCl ₃ +AAL+NS	AlCl ₃ +NS	NS
Globules rouges (x10 ⁶ /μl)	8.96±0.31	7.26±0.32*	8.8±0.5 [#]	8.83±0.37 [#]	8.81±0.23 [#]	8.94±0.56
%	-	- 18.97	+ 21.21	+ 21.62	+ 21.34	-
Globules blancs (x10 ³ /μl)	10.31±1.81	13.01±0.72*	11.58±1.12 [#]	11.21±0.78 ^{##}	11.31±1.10 ^{##}	12.31±1*
%	-	+ 26.18	- 11	- 13.83	- 13.06	+ 19.4
Taux d'hématocrite (%)	44.55±1.33	43.6±1.5	43.85±1.78	43.15±1.98	43.65±0.9	47.01±1.42*
%	-	-	-	-	-	+ 5.52
Taux d'hémoglobine (g/dl)	14.81±0.58	12.18±0.53**	14.28±0.57 ^{##}	14.4±0.47 ^{##}	14.63±0.5 ^{##}	15.56±1.17
%	-	- 17.75	+ 17.24	+ 18.22	+ 20.11	-
CCMH (g/dl)	33.26±0.46	31.56±0.6**	33.21±0.62 ^{##}	33.36±0.64 ^{##}	33.86±0.53 ^{##}	34.5±0.47**
%	-	- 5.11	+ 5.19	+ 5.70	+ 7.28	+ 3.72
VGM (fl)	49.66±1.75	49.33±2.16	49.16±1.47	48.83±1.17	49.83±1.94	49.5±1.64
%	-	-	-	-	-	-
Plaquettes (10 ³ /μl)	721.66±8	688±7.11	701.83±2.1	722.33±3.94	704.33±6.44	718.66±3.73
%	-	-	-	-	-	-
Fer (μg/dl)	1.35±0.02	2 ±0.16***	1.97 ±0.358**	2.12 ±0.14***	1.75 ±0.23**	1.54 ±0.43
%	-	+ 48.14	+ 45.92	+ 57.03	+ 29.92	-

* p≤0.05 ; ** p≤0.01 ; *** p≤0.001 par comparaison avec les rats témoins.

[#] p≤0.05 ; ^{##} p≤0.01 par comparaison avec les rats traités par AlCl₃.

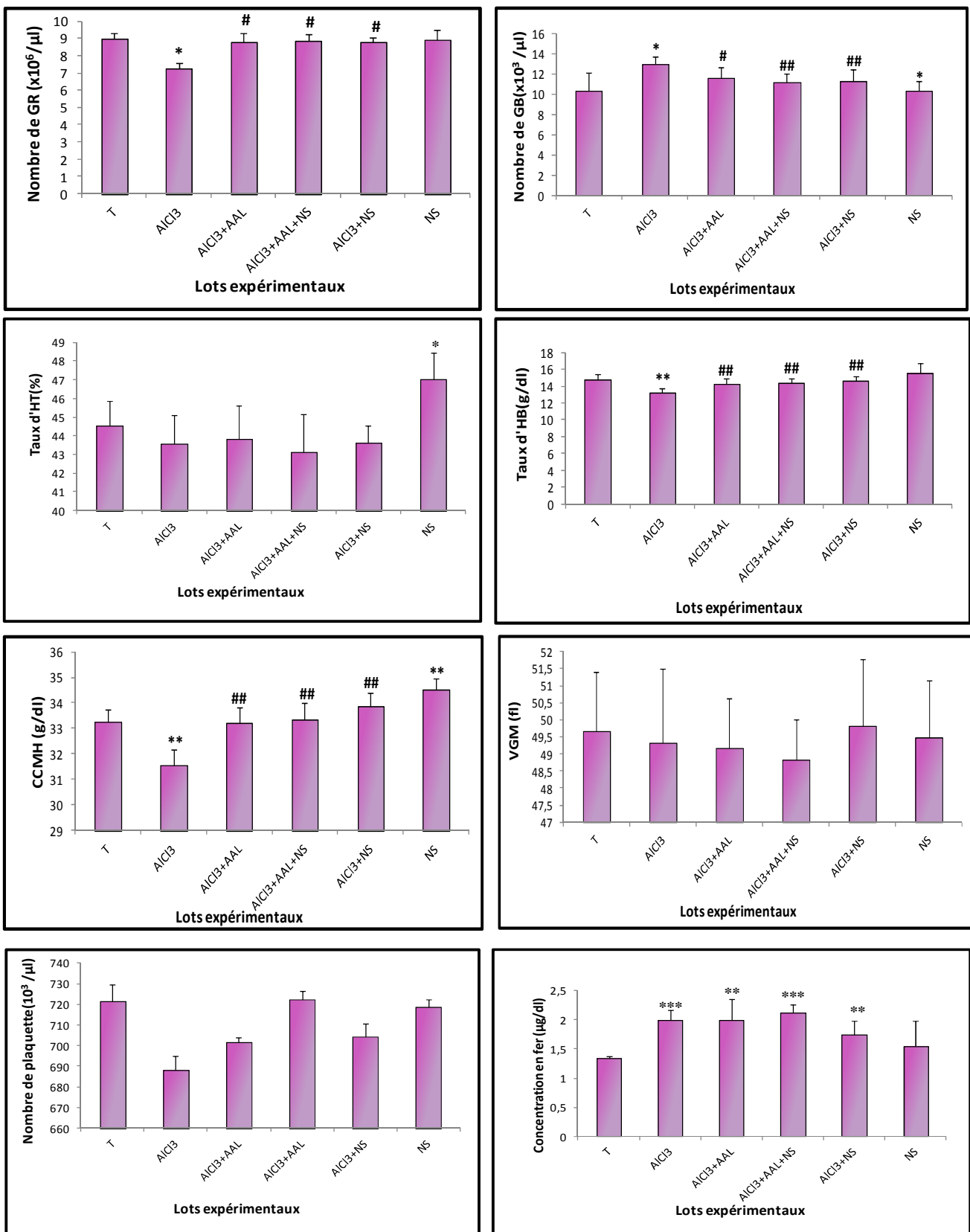


Figure 20: Variation des paramètres hématologiques et de la concentration en fer sérique chez les rats témoins et les rats traités.

* p<0.05 ; ** p<0.01 ; *** p<0.001 par comparaison avec les rats témoins.

p<0.05 ; ## p<0.01 par comparaison avec les rats traités par AlCl₃.

➤ Discussion

La présente étude a pour but de mettre en évidence les effets de l'huile de nigelle (*Nigella sativa*) et de l'acide alpha lipoïque sur les marqueurs du stress oxydatif au niveau sanguin et tissulaire, en utilisant le chlorure d'aluminium comme agent stressant. Cette étude est réalisée avec une concentration de 34 mg/kg du poids corporel du chlorure d'aluminium, une dose de 35 mg/kg du poids corporel d'acide alpha lipoïque et une dose de 2 ml/kg du poids corporel d'huile de nigelle (*Nigella sativa*).

Le foie et les reins représentent les organes clés du métabolisme et de détoxification d'aluminium ainsi que d'autres toxines, tandis que le cerveau représente la cible privilégiée des effets aluminiques. De plus, le cerveau est un organe sensible au stress oxydatif en raison de sa consommation importante d'oxygène et de sa richesse en acides gras insaturés d'une part. D'autre part, de son faible contenu en antioxydants qui le rendent plus vulnérable aux dommages oxydatifs par rapport aux autres organes de l'organisme (**Flora et al., 2003; Mahieu et al., 2005; Vitezeliene et al., 2011; Shrivastava, 2012**).

Au cours de notre étude, nous avons noté une diminution très hautement significative de la consommation quotidienne d'aliment accompagnée d'une diminution considérable du poids corporel et d'une augmentation du poids relatif des organes étudiés (foie, reins, cœurs, testicules et cerveau) chez les rats du groupe traité par le chlorure d'aluminium comparativement aux rats du groupe témoin. La diminution du poids corporel peut être expliquée par la diminution de la prise alimentaire suite à l'intoxication aluminique. Nos résultats sont en accord avec d'autres travaux (**Nehru et Anand, 2005; Guo et al., 2009; Koizumi et al., 2010; Zhu et al., 2012**) qui ont montrés que la croissance corporelle est affectée suite à l'intoxication par l'aluminium. De nombreuses autres études suggèrent que cette perte pondérale peut être expliquée par une augmentation du catabolisme des lipides et des protéines due aux dégâts oxydatifs induit par l'aluminium, associé avec une réduction conséquente de leurs synthèse hépatique (**Cherroret et al., 1995; El-Damardash, 2004; Sharma et al., 2007; Lukyanenko et al., 2013**).

En effet, l'hypertrophie des organes étudiés (foie, reins, cœur, testicules et cerveau) est la conséquence de l'accumulation de l'aluminium dans ces organes où il peut agir avec les groupements (-SH et -OH) des protéines ainsi que les acides gras insaturés des lipides par le biais des radicaux libres provoquant ainsi des effets délétères (**Nehru et Anand, 2005; Guo *et al.*, 2009; Mahieu *et al.*, 2009**).

Par ailleurs, l'administration orale de l'huile de nigelle et /ou d'acide alpha lipoïque a induit une amélioration de la consommation quotidienne d'aliment, une augmentation du gain de poids et une diminution du poids relatif des organes étudiés. Cette amélioration est due à l'effet protecteur de l'huile de nigelle ainsi que d'acide alpha lipoïque contre la toxicité du chlorure d'aluminium, en interférant avec son absorption et son métabolisme. Cette interférence augmente le taux d'excrétion urinaire ainsi que l'accumulation tissulaire du chlorure d'aluminium et préserve par conséquent ses effets délétères. Nos résultats sont en accord avec des études antérieures qui ont démontrés les effets bénéfiques de la nigelle (**El-Bahai *et al.*, 2009; Mohamadin *et al.*, 2010**) et de l'acide alpha lipoïque (**Shila *et al.*, 2005; Sahin *et al.*, 2006**).

La diminution du nombre des globules rouges, du taux d'hémoglobine et d'hématocrite ainsi que l'augmentation du nombre des globules blancs enregistrée après administration du chlorure d'aluminium aux rats pendant 21 jours, prouve que cet métal a un effet hématotoxique, il s'agit d'une anémie hémolytique. Cette anémie est probablement due aux effets des radicaux libres sur les parois des globules rouges, augmentant la peroxydation des lipides membranaires ce qui provoque l'hémolyse des érythrocytes. En outre, l'augmentation du taux des globules blancs reflète la présence d'œdème et d'inflammation au niveau tissulaire (activation du système immunitaire et de défense), ceci est confirmé par l'étude histologique. **Farina** et ses collaborateurs (**2005**) ont montré que l'exposition chronique au nitrate d'aluminium altère de nombreux paramètres hématologiques et provoquent par conséquent l'apparition d'une anémie, ceci confirme nos résultats. Des études réalisées par **Mahieu *et al.*, (2000)** indiquent également l'apparition d'une anémie de type microcytaire chez les rats traités par l'hydroxyde d'aluminium (à 80mg/kg PC par voie intrapéritonéale).

D'autre part, les radicaux libres peuvent facilement agir avec l'hémoglobine provoquant son oxydation et/ou avec les groupements sulfhydriles de l'acide δ -aminolévulinique déshydrogénase (ALAD enzyme clé qui catalyse la 2^{ème} étape de la biosynthèse de l'hème), dénaturant ou inhibant ainsi sa fonction, cet effet mène vers une diminution de la synthèse d'hémoglobine (**Shrivastava, 2012; Lukyanenko et al., 2013**).

Il a été rapporté que la perturbation du métabolisme ferrique participe aussi à l'apparition d'une anémie hémolytique. Selon des études récentes (**Folora et al., 2003; Mahieu et al., 2005**), cette perturbation est le résultat d'une inhibition compétitive entre le fer et l'aluminium sur le site de liaison à la transferrine ce qui traduit par un manque de fer dans les organes qui en besoin notons à titre d'exemple l'os, lieu de synthèse de la lignée des érythroblastes (cellules précurseurs des globules rouges) inhibant par conséquent cette synthèse et augmente le taux du fer sérique.

Cependant, **Yousef, (2004); Mahieu et al., (2005); Shi-liang et al., (2013)** montrent que l'aluminium provoque l'insuffisance rénale, cette pathologie constituée la cause principale de l'anémie hémolytique en diminuant la production des globules rouges suite d'une inhibition de synthèse de l'érythropoïétine (hormone stimule l'érythropoïèse).

L'anémie hémolytique observée après administration du $AlCl_3$ est corrigée chez les rats traités par la combinaison $AlCl_3$ + AAL et/ou NS. Ces effets bénéfiques sont liés à l'activité antioxydante de la nigelle et de l'acide alpha lipoïque elucidés dans des études précédentes, ces propriétés antioxydantes permettent aux NS et AAL de chélater le chlorure d'aluminium, diminuant ainsi sa concentration sanguine et inhibant ses effets cytotoxiques. Ce qui stimule la production de l'érythropoïétine, facilite l'incorporation du fer à l'hème et entraînant par conséquent la restauration de l'érythropoïèse. Nos résultats sont en accord avec ceux de **Mahmoud et al., (2002); Mahdy et Farrag, (2009); Caylak et al., (2008); Shabana et al., (2012)** suggèrent que le traitement par les molécules antioxydantes d'origine naturelle ou synthétique peuvent efficacement corrigées certaines types d'anémies. En effet, **Malarkodi et al., (2004)** ont montré que l'administration de l'acide alpha lipoïque a une dose de 35mg/kg PC aux rats par voie intrapéritonéale, entraîne une inhibition de la peroxydation lipidique au niveau des membranes érythrocytaires et préserve par conséquent l'hémolyse de ces dernières.

Plusieurs études (**Al-Saleh *et al.*, 2006**; **Hosseinzadeh *et al.*, 2007**; **Asgary *et al.*, 2013**; **Tayman *et al.*, 2013**) ont signalé que l'effet bénéfique du nigelle sur la variation des paramètres hématologiques peut être aussi lié à son effet anti-inflammatoire. Ces études confirment que la thymoquinone et la nigellone peuvent agir comme inhibiteurs de la génération des éicosanoïdes, des leucotriènes et d'histamine.

Chapitre III: Impact du chlorure d'aluminium sur la variation des hormones thyroïdiennes et de la testostérone: Effets protecteurs de la supplémentation en huile de nigelle et/ou en acide alpha lipoïque

1. Effet sur la concentration sérique des hormones thyroïdiennes

➤ Triiodothyronine (T₃)

Le dosage radio-immunologique de la T₃ sérique montre une diminution significative chez les rats traités par AlCl₃ (-25.49%) par rapport aux rats témoins. Ce taux est corrigé chez les groupes AlCl₃+AAL, AlCl₃+AAL+NS et AlCl₃+NS (Tableau 8, Figure 21).

➤ Thyroxine (T₄)

Nos résultats (Tableau 8, Figure 21) révèlent que le traitement des rats par AlCl₃ à raison de 35 mg/kg P.C provoque une diminution significative du T₄ (-30.73%) comparant au lot témoin. Alors qu'un rétablissement par une augmentation significative du taux sérique du T₄ est enregistrée après le traitement des rats par les combinaisons AlCl₃+AAL, AlCl₃+AAL+NS et AlCl₃+NS.

2. Effet sur la concentration sérique en testostérone

Les résultats obtenus montrent une diminution de la testostérone sérique chez les rats traités par le chlorure d'aluminium par rapport aux rats témoins. En revanche, l'administration de l'AAL et/ou la NS plus AlCl₃ entraîne une amélioration partielle de la concentration sérique en testostérone par rapport au lot AlCl₃ (Tableau 8, Figure 21).

Tableau 8: Variation de la concentration sérique (ng/ml) en triiodothyronine (T₃), en thyroxine (T₄) et en testostérone chez les rats témoins et les rats traités.

Paramètres	Lots expérimentaux					
	T	AlCl ₃	AlCl ₃ +AAL	AlCl ₃ +AAL+NS	AlCl ₃ +NS	NS
T ₃ (ng/ml)	3.53±0.23	2.63±0.26*	3.04±0.13 [#]	3.60±0.76 [#]	3.28±0.6 [#]	3.43±0.85
%	-	- 25.49	+ 15.58	+ 36.88	+ 24.71	-
T ₄ (ng/ml)	2.31±0.26	1.6±0.22*	2.18±0.21 ^{##}	2.04±0.38 [#]	2.14±0.11 ^{##}	2.23±0.54
%	-	- 30.73	+ 36.35	+ 27.5	+ 33.75	-
Testostérone (ng/ml)	2.38±0.2	0.61±0.4**	1.47±0.3 ^{*##}	2.3±0.56 ^{##}	1.9±0.45 ^{*##}	2.21±0.22
%	-	- 74.36	- 38.23, + 140.98	+ 277.04	- 20.16, + 211.47	-

* p≤0.05 ; ** p≤0.01 par comparaison avec les rats témoins.

[#]p≤0.05 ; ^{##}p≤0.01 par comparaison avec les rats traités par AlCl₃.

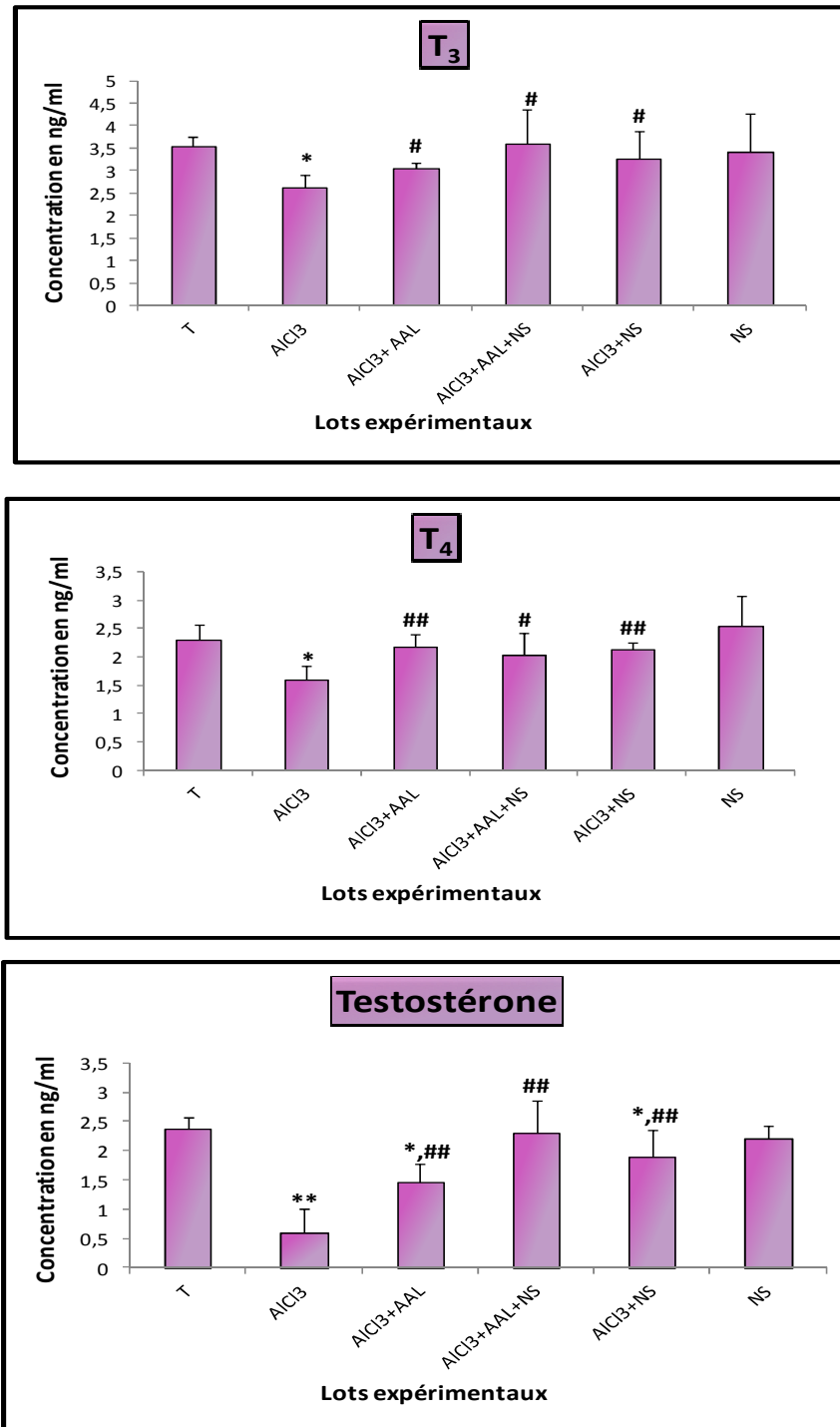


Figure 21: Variation de la concentration sérique en triiodothyronine (T₃), en thyroxine (T₄) et en testostérone chez les rats témoins et les rats traités.

*p≤0.05 ; **p≤0.01 par comparaison avec les rats témoins.

#p≤0.05 ; ##p≤0.01 par comparaison avec les rats traités par AIC₃.

➤ Discussion

Les hormones thyroïdiennes ont un rôle crucial dans la régulation du métabolisme glucidique, protéique, lipidique et phosphocalcique. Le dysfonctionnement thyroïdien provoque des perturbations du métabolisme basal notamment au niveau des mitochondries, qui sont les principaux sites de production des espèces réactives de l'oxygène suite à des fuites dans la chaîne respiratoire. Les travaux de **Messarah *et al.*, (2010, 2011)** ont montré l'installation d'un état de stress oxydatif en relation avec le dysfonctionnement thyroïdien caractérisé par une production accrue des ERO et une diminution de l'activité des enzymes antioxydantes.

En ce qui concerne le dosage des hormones thyroïdiennes, nous avons remarqué comparativement au groupe témoin une diminution de leurs concentrations sérique chez le groupe $AlCl_3$ qui peut être liée à l'influence du chlorure d'aluminium sur la sécrétion de TRH. Cette baisse, témoigne aussi une lésion des cellules thyroïdiennes. En corrélation avec nos observations, **Orihuela, (2009)** a obtenu des résultats similaires dans son étude sur des rats soumis à l'intoxication aluminique pendant 14 jours. Cette étude indique que l'accumulation des ERO générée par l'aluminium au niveau de la thyroïde provoque une diminution de la synthèse et de la sécrétion hormonale de cette glande. Des études réalisées par **Norman, (1997)** montrent que l'aluminium a également un effet sur l'axe hypothalamo-hypophysaire, inhibant la sécrétion de la TRH (thyrotropine releasing hormone) et de l'hormone thyroïdienne (thyroïdostimuline TSH), entraînant ainsi une diminution de la synthèse des hormones thyroïdiennes.

Du même, nos résultats montrent une baisse de la concentration sérique en testostérone, probablement liée à l'influence du chlorure d'aluminium sur la biosynthèse des androgènes. Cette influence est le résultat soit d'une inhibition de l'activité enzymatique du 17-cétostéroïde réductase qui convertit l'androstènedione en testostérone, soit d'une destruction des cellules de Leydig qui sont le lieu de production de la testostérone, par le biais des ERO provoquant la peroxydation lipidique. Cette altération tissulaire est révélée au niveau des coupes histologiques. Nos résultats sont en accord avec d'autres études réalisées sur des souris et des rats exposés aux différentes doses du chlorure d'aluminium par voie orale (**Yousef et Salama, 2009; Guo *et al.*, 2009**). De plus, **Yousef et Salama, (2009)** ont signalé que l'aluminium a aussi un effet inhibiteur sur la sécrétion des gonadotrophines (GnRH), du LH (luteinizing hormone) et du FSH (follicle stimulating hormone) au niveau d'anté-hypophyse et par conséquent sur les hormones testiculaires.

L'administration du NS et/ou d'AAL mène vers une restauration partielle de la concentration sérique des hormones thyroïdiennes et de la testostérone. L'explication possible de cette action est liée soit à l'effet protecteur et aux propriétés antioxydantes de NS et d'AAL contre la toxicité de l'aluminium ou bien à l'effet stimulateur sur la biosynthèse des androgènes. Des études récentes confirment ces effets bénéfiques (**Awadalla, 2012; El-beshbishy et al., 2012, 2014**). L'étude de **Awadalla, (2012)** montre que la nigelle agit favorablement sur la biosynthèse des androgènes grâce à sa richesse en molécules bioactives notamment les oligoéléments et les vitamines.

Chapitre IV: Hépatotoxicité induite par le chlorure d'aluminium: Effets protecteurs de la supplémentation en huile de nigelle et/ou en acide alpha lipoïque

1. Effet sur l'activité des aminotransaminases

Comparant au group témoin, le traitement des rats par AlCl_3 induit une augmentation significative de l'activité enzymatique des transaminases, l'alanine aminotransférase (ALAT) et l'aspartate aminotransférase (ASAT) (Tableau 9, Figure 22). En revanche, on enregistre un rétablissement par une diminution significative de l'activité de l'ALAT et de l'ASAT chez les groupes traités par les combinaisons AlCl_3 +AAL, AlCl_3 +AAL+NS et AlCl_3 +NS par rapport au groupe traité par AlCl_3 .

2. Effet sur l'activité de la phosphatase alcaline (PAL)

Nos résultats (Tableau 9, Figure 22) illustrent une augmentation significative de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline (PAL) chez le lot AlCl_3 par rapport au lot témoin. Cependant, le traitement des rats par l'AAL et/ou la NS induit une baisse significative de l'activité PAL comparativement au lot AlCl_3 .

3. Effet sur l'activité de lactate déshydrogénase (LDH)

Concernant l'activité enzymatique de lactate déshydrogénase (LDH), nos résultats (Tableau 9, Figure 22) révèlent une augmentation significative chez les lots AlCl_3 , AlCl_3 +AAL+NS et AlCl_3 +AAL par rapport au lot témoin. Par contre, une amélioration partielle est enregistrée chez le lot AlCl_3 +NS comparativement au lot AlCl_3 .

4. Effet sur l'activité de la créatine phosphokinase (CPK)

Le Tableau 9 ainsi que la Figure 22, montrent une augmentation significative de l'activité enzymatique de la créatine phosphokinase (CPK) chez le lot AlCl_3 (+15.14%) comparativement au lot témoin. Parallèlement, ils illustrent une diminution significative chez les lots AlCl_3 +AAL, AlCl_3 +AAL+NS et AlCl_3 +NS comparativement au lot AlCl_3 .

5. Effet sur la concentration plasmatique en bilirubine totale et direct

Les résultats obtenus montrent que le traitement par le chlorure d'aluminium provoque une augmentation de la concentration plasmatique en bilirubine totale et directe. Le traitement des rats par les combinaisons AlCl_3 +AAL, AlCl_3 +AAL+NS et AlCl_3 +NS a entraîné une amélioration de la concentration plasmatique en bilirubine total et direct, figuré par une diminution statistiquement significative comparativement au lot AlCl_3 (Tableau 9, Figure 23).

6. Effet sur la concentration plasmatique en glucose

Les résultats illustrés dans le Tableau 9 et par la Figure 23 indiquent une augmentation significative de la glycémie chez les groupes AlCl_3 et AlCl_3 +AAL comparativement au groupe témoin. Ils montrent aussi, un rétablissement par une diminution significative de la glycémie chez les groupes AlCl_3 +AAL et AlCl_3 +NS par rapport au groupe AlCl_3 .

7. Effet sur la concentration plasmatique en protéines totales et en albumine

Les résultats obtenus indiquent une baisse significative de la concentration plasmatique en protéines totales chez le lot AlCl_3 (-11.26%) par rapport au lot témoin. Du même, le dosage de l'albumine révèle une diminution significative de sa concentration plasmatique chez les rats traités par AlCl_3 . Par contre, on observe un rétablissement par une augmentation significative de la concentration plasmatique en protéine totales et en albumine chez les rats traités par les combinaisons AlCl_3 +AAL et AlCl_3 +NS et AlCl_3 +AAL+NS comparativement aux rats traités par AlCl_3 (Tableau 9, Figure 24).

Tableau 9: Variation de quelques biomarqueurs plasmatiques de la fonction hépatique chez les rats témoins et les rats traités.

Paramètres	Lots expérimentaux					
	T	AlCl ₃	AlCl ₃ +AAL	AlCl ₃ +AAL+NS	AlCl ₃ +NS	NS
ALAT (U/L)	162.36±3.19	209.5±5.67*	144.5±10.24###	153.12±4.08#	141.33±4.31#	132.61±2.28
%	-	+ 29.03	- 31.03	- 26.91	- 32.53	-
ASAT (U/L)	152.71±4.72	296.57±1.87***	197.32±7.32###	195.72±20.17###	221.55±4.04*#	160.77±4.22
%	-	+ 94.20	- 33.46	- 34	+ 45.07,- 25.3	-
PAL (U/L)	113.25±2.01	177.47±8.1***	117.68±1.7###	131.4±2.09##	111.8±8.29###	96±6.67
%	-	+ 56.7	- 33.7	- 25.95	- 37	-
LDH (U/L)	704.83±5.14	964.5±5.97***	882.66±4.61**	897.66±2.25***	879.33±2.69**#	660±4.75
%	-	+ 36.84	+ 25.23	+ 27.35	+ 24.75,- 8.83	-
CPK (U/L)	733.83±51.44	845±29.76**	704.66±21.7###	728.83±41.66##	787.33±34.13#	698.83±35.05
%	-	+ 15.14	- 16.60	- 13.74	- 6.82	-
Bilirubine totale (mg/dl)	1.6±0.17	2.05±0.28*	1.68±0.01##	1.78±0.14##	1.5±0.14#	1.33±0.32
%	-	+ 28.12	- 18.04	- 13.17	- 26.82	-
Bilirubine directe (mg/dl)	0.04±0.02	0.12±0.01**	0.1±0.03*	0.07±0.05###	0.05±0.02###	0.03±0.08
%	-	+ 200	+ 150	- 41.66	- 58.33	-
Glucose (mg/dl)	1.14±0.1	1.52±0.3*	1.01±0.06#	1.3±0.15	0.98±0.07##	1.13±0.11
%	-	+ 33.33	- 33.55	-	- 35.52	-
Protéines totales (g/dl)	92.7±4.2	82.26±5.93**	85.06±5.55	91.13±2.51#	89.58±2.83#	90.38±2.19
%	-	- 11.26	-	+ 10.78	+ 8.9	-
Albumine (g/dl)	43.09±3.2	31.19±7.14***	43.77±2.02###	45.61±2.5##	45.3±1.1##	43.73±1.5
%	-	- 27.61	+ 40.33	+ 46.23	+ 45.23	-

* p≤0.05 ; ** p≤0.01 ; *** p≤0.001 par comparaison avec les rats témoins.

p≤0.05 ; ## p≤0.01 ; ### p≤0.001 par comparaison avec les rats traités par AlCl₃.

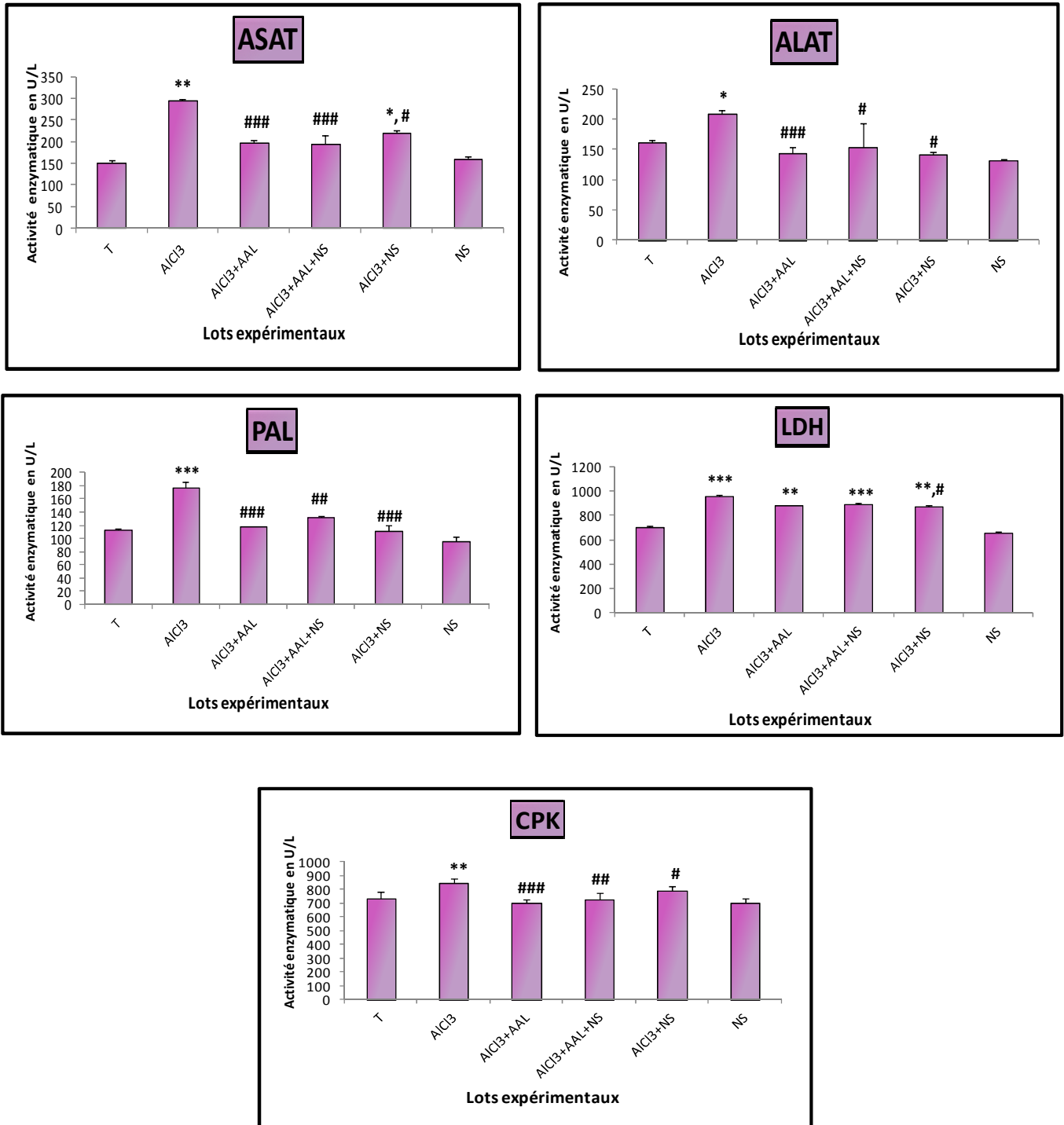


Figure 22: Variation de l'activité enzymatique des transaminases (ASAT, ALAT), de la phosphatase alcaline (PAL), de lactate déshydrogénase (LDH) et de la créatine phosphokinase (CPK) chez les rats témoins et les rats traités.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ par comparaison avec les rats témoins.

$p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$; ### $p \leq 0.001$ par comparaison avec les rats traités par AICl₃.

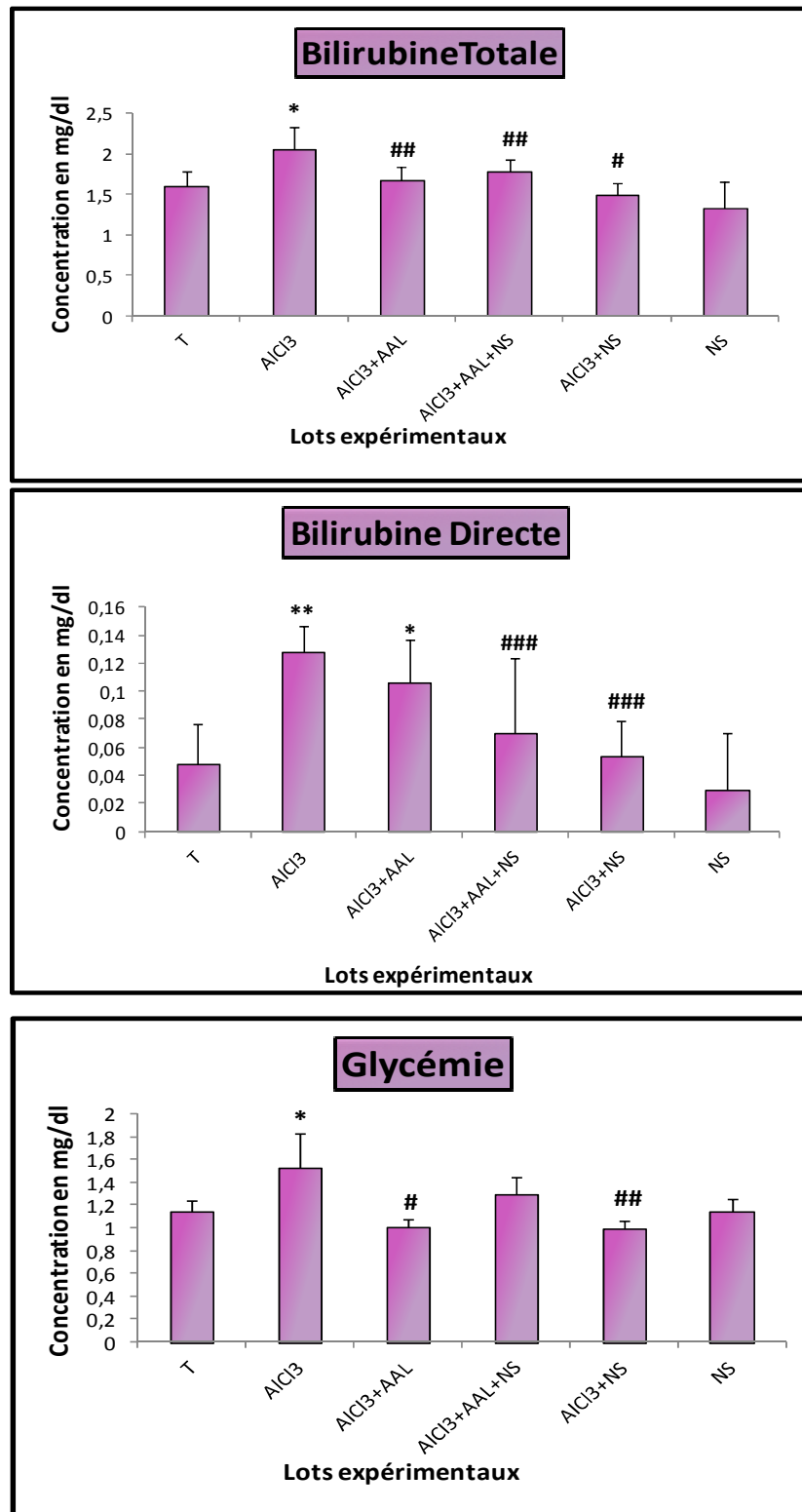


Figure 23: Variation de la concentration plasmatique en bilirubine totale, en bilirubine direct et en glucose chez les rats témoins et les rats traités.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ par comparaison avec les rats témoins.

$p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$; ### $p \leq 0.001$ par comparaison avec les rats traités par $AlCl_3$.

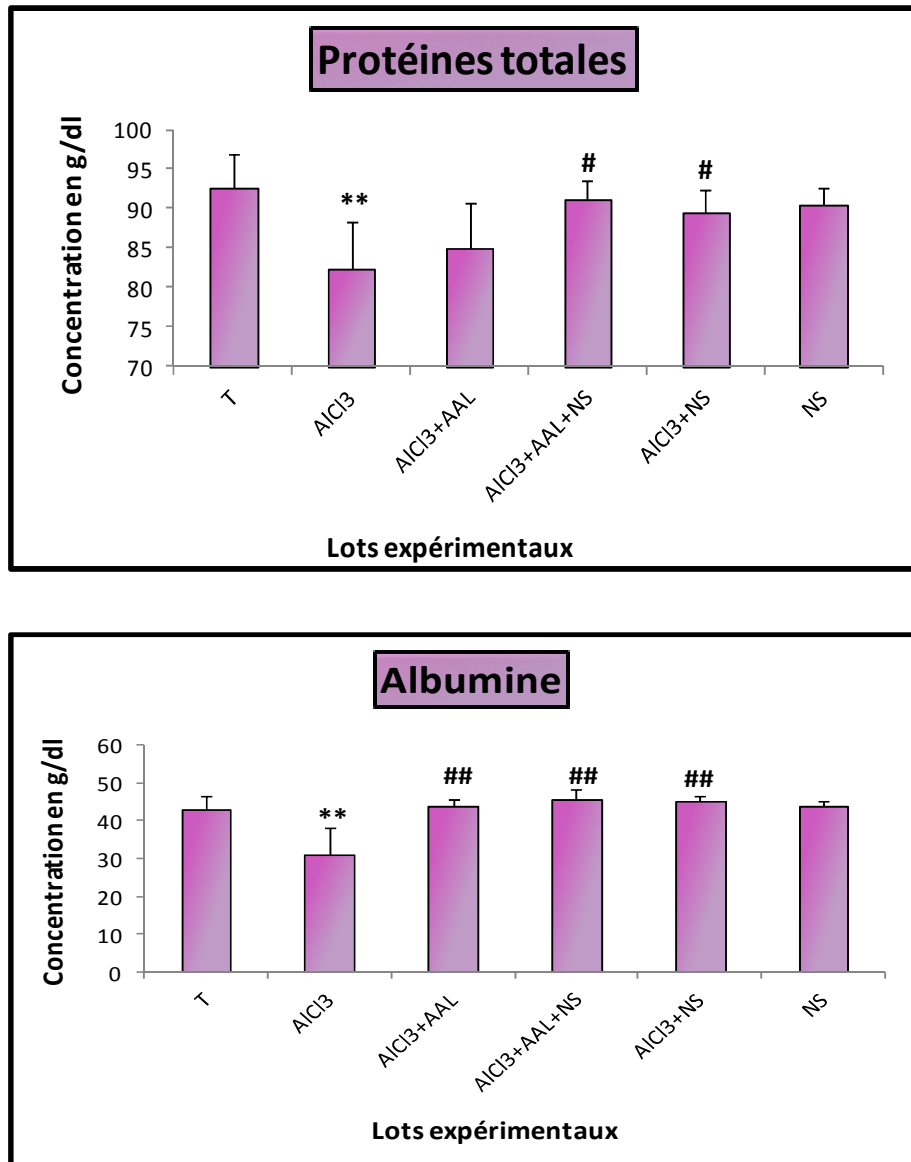


Figure 24: Variation de la concentration plasmatique en protéines totales et en albumine chez les rats témoins et les rats traités.

** $p \leq 0.01$ par comparaison avec les rats témoins.

$p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$ par comparaison avec les rats traités par AlCl_3 .

➤ Discussion

Plusieurs études ont montré que les métaux lourds interfèrent avec le métabolisme basal chez les animaux de laboratoire (**Yousef et Salama, 2009; Viezeliene et al., 2011; Messarh et al., 2012^a**). Le dosage de l'activité enzymatique des aminotransférases, des phosphatases ainsi que de lactate déshydrogénase et de la créatine phosphokinase, est d'une grande importance du point de vue clinique et toxicologique (biomarqueurs de la fonction hépatique). En effet, les perturbations de leurs activités sont des indicateurs d'une altération tissulaire le plus souvent au niveau hépatique vu son rôle dans la détoxification et le métabolisme des xénobiotiques à savoir le chlorure d'aluminium (**González et al., 2007, 2009**).

Les résultats de notre expérimentation suggèrent que l'administration de chlorure d'aluminium par voie orale à une dose de 34 mg/kg du poids corporel aux rats males a entraînée des perturbations bien claires de l'activité de l'ALAT, de l'ASAT, de la PAL, de LDH et de la CPK, ce qui reflète une perturbation de l'équilibre entre la biosynthèse et la dégradation de ces enzymes avec une cytolysse hépatique, qui mène à leur libération du cytosol hépatique vers la circulation sanguine. L'atteinte hépatocytaire peut être expliquée par l'hépatotoxicité de l'aluminium fortement liée à ses effets prooxydants. Elle peut être aussi liée à l'interférence de l'aluminium avec le phosphate et le métabolisme d'ATP. Ce qui entraîne une déplétion d'énergie, un changement de l'intégrité des membranes et mène vers une diminution du pH ainsi qu'à la destruction cellulaire. Cette altération est clairement révélée au niveau des coupes histologiques. Les résultats de notre étude sont similaires à ceux de **González et al., (2007, 2009); Viezeliene et al., (2011)** qui ont montrés que le traitement des souris par le chlorure d'aluminium (à 25, 30 et 35 mg/kg du PC) génère des dommages oxydatifs au niveau des hépatocytes suite à l'augmentation de la peroxydation lipidique membranaire provoquant ainsi la lyse cellulaire et augmente l'apoptose. **El-Damardash, (2004); Mahdy et Farrag, (2009)** confirment par leurs études l'hépatotoxicité du chlorure d'aluminium. Ils ont aussi enregistré des perturbations des biomarqueurs hépatiques chez des rats soumis à une intoxication orale par le chlorure d'aluminium pendant un mois.

Nous avons enregistré aussi chez le groupe AlCl_3 par rapport au groupe témoin une diminution de la concentration des protéines totales. On peut expliquer cette diminution soit par l'augmentation du catabolisme protéique et/ou la diminution de leurs synthèses au niveau du foie (perturbation du métabolisme protéique), ou bien par le fait que la plupart des protéines possèdent des groupements (SH, OH) qui réagissent facilement avec les radicaux libres générés par le chlorure d'aluminium provoquant ainsi leurs dénaturation et leurs fragmentation. Ces observations sont en relation avec ceux de **Kumar et al., (2009); Mahdy et Farrag, (2009)**. De ce fait, l'élévation de l'activité de l'ASAT et de l'ALAT peut être aussi expliquée par l'accumulation des acides aminés provenant de la dégradation des composés protéiques. Ces acides aminés peuvent se transformer en composés carboxyliques ce qui implique une forte activité des transaminases. **Kumar et al., (2009); Newairy et al., (2009)** ont également enregistré une augmentation de l'activité des transaminases liée à une augmentation du catabolisme protéique chez des rats traités oralement par l'aluminium pendant 12 semaines.

La bilirubine est le produit final de la dégradation d'hémoglobine (**González et al., 2007**), l'augmentation du taux plasmatique en bilirubine (totale et directe) enregistrée après administration du chlorure d'aluminium aux rats pendant 21 jours est un indicateur important de la dégradation accrue d'hémoglobine, cette augmentation peut être également expliquée par la diminution de la synthèse des protéines particulièrement l'albumine autant que le principal transporteur de la bilirubine. Ces résultats concordent avec ceux de **El-Demerdash, (2004); González et al., (2007); Mahdy et Farrag, (2009)**. Par ailleurs, l'albumine peut être considérée comme un antioxydant majeur (grâce à sa fonction thiols SH), donc la diminution de sa teneur plasmatique peut être due à ses effets antioxydants (**El-Demerdash, 2004; Kumar et al., 2009**).

L'hyperglycémie observée est probablement liée aux effets prooxydants du chlorure d'aluminium au niveau des cellules β pancréatique entraînant une insulino-déficience ou bien une insulino-résistance. Ce qui mène à une inhibition de la pénétration du glucose dans les tissus qui en besoin, soit suite à une diminution de la réponse à l'insuline au niveau des cellules insulinosensibles ou bien suite à une diminution de la stimulation du captage du glucose par l'insuline. Elle peut être aussi corrélée à l'hyperdégradation du glycogène hépatique suite à l'activation de certaines enzymes de la gluconéogenèse (fructose 1,6 diphosphatase et la phosphoénol pyruvate carboxykinase).

Cette activation est due suite à l'augmentation de la sécrétion du glucagon et/ou des corticostéroïdes probablement causée par l'effet inhibiteur de l'aluminium sur l'activité d'enzyme cholinestérase. L'accumulation de l'acétyl choline au niveau des sites neurologiques, stimule la sécrétion de l'hormone corticotrope (ACTH) par l'anté-hypophyse. Les mêmes observations ont été enregistrées dans d'autres travaux (**El-Damardash, 2004; Mahdy et Farrag, 2009**). **Newairy et ses collaborateurs (2009)** ont signalé que l'hyperglycémie observée chez les rats traités par le chlorure d'aluminium est la conséquence d'une perturbation du métabolisme glucidique.

En revanche, une atténuation de l'activité enzymatique des transaminases, de la phosphatase alcaline, de lactate déshydrogénase et de la créatine phosphokinase chez les groupes $AlCl_3$ +AAL, $AlCl_3$ +NS+AAL et $AlCl_3$ +NS a été enregistrée, témoignant que l'huile de nigelle ainsi que l'acide alpha lipoïque agissent favorablement sur le fonctionnement hépatique. Cette action est probablement liée à leurs capacités de diminuer les dommages hépatocytaires, telles que les nécroses et les lyses cellulaires ce qui mène vers une restauration des processus métaboliques. En accord avec nos résultats, un effet cytoprotecteur vis-à-vis les hépatocytes a été observé également au cours d'autres études (**Neves *et al.*, 2004; Kokdil *et al.*, 2005; Abdel-Zaher *et al.*, 2008; Krishnan et Muthukrishnan, 2012**). Des études récentes indiquent que les molécules bioactives de *Nigella sativa* notamment les flavonoïdes ont un effet antagoniste à l'effet prooxydant du chlorure d'aluminium (**Yaman et Balikci, 2010; Krishnan et Muthukrishnan, 2012**). D'autres études (**Neves *et al.*, 2004; Abdel-Zaher *et al.*, 2008**) indiquent que l'acide alpha lipoïque ainsi que ses métabolites et grâce au groupement SH, agit de la même façon des flavonoïdes contre le stress oxydatif induit par l'aluminium. De plus l'AAL joue le rôle du cofacteur de plusieurs enzymes métaboliques où l'activité de ces enzymes est très dépendante de son apport.

Le traitement par $AlCl_3$ associé à l'acide alpha lipoïque et/ou la nigelle induit aussi une diminution de la bilirubine et une augmentation de l'albumine. La diminution de la bilirubine notée serait probablement liée à la diminution de la dégradation d'hémoglobine et à l'augmentation du taux d'albumine (**Kokdil *et al.*, 2005; Mahdy et Farrag, 2009**). Tandis que l'augmentation de la concentration plasmatique en albumine est le résultat d'une augmentation de l'anabolisme des protéines et une diminution de leur catabolisme (**Neves *et al.*, 2004; Abdel-Zaher *et al.*, 2008**).

Par ailleurs, l'huile de nigelle et/ou l'acide alpha lipoïque exercent un effet bénéfique sur l'hyperglycémie. Cet effet est fortement lié à un effet cytoprotecteur vis-à-vis les cellules β des ilots de langerhans ce qui entraîne une amélioration de la sécrétion d'insuline. Il peut être aussi lié à des actions extra-pancréatiques. En effet, *Nigella sativa* et l'acide alpha lipoïque corrigent la résistance insulinaire et/ou inhibent l'absorption intestinale ainsi que la production endogène du glucose en activant la synthèse du glycogène par la stimulation du glycogène synthase. Ces constatations sont en accord avec d'autres études indiquant que l'huile de nigelle et l'acide alpha lipoïque ont un effet hypoglycémiant chez les rats (Neves *et al.*, 2004; Altan *et al.*, 2007; Winiarska *et al.*, 2008; Meddah *et al.*, 2009).

En outre, Ozkan *et al.*, (2005); Yi *et al.*, (2011) montrent dans leurs études que la stimulation de la sécrétion d'insuline peut être aussi liée à l'action directe de l'acide alpha lipoïque sur les canaux K^+ /ATP provoquant leur fermeture. Ce qui entraîne la dépolarisation membranaire et la stimulation de l'afflux Ca^{+2} (première étape clé pour la sécrétion d'insuline). Les mêmes études indiquent que l'activité hypoglycémiant de l'AAL est corrélée à l'augmentation de la capture du glucose au niveau des tissus périphériques, il stimule l'expression de l'ARN_m des protéines de transport du glucose (Glut₄) dans les muscles squelettiques.

Chapitre V: Néphrotoxicité induite par le chlorure d'aluminium: Effets protecteurs de la supplémentation en huile de nigelle et/ou en acide alpha lipoïque

1. Effet sur la concentration plasmatique en urée

Nos résultats montrent une variation significative du taux plasmatique en urée chez les lots traités par $AlCl_3$, $AlCl_3+AAL$, $AlCl_3+AAL+NS$ et $AlCl_3+NS$ comparativement au lot témoin. Par contre, chez les lots traités par $AlCl_3+AAL$, $AlCl_3+AAL+NS$ et $AlCl_3+NS$ ce taux est corrigé partiellement par rapport au lot $AlCl_3$ (Tableau 10, Figure 25).

2. Effet sur la concentration plasmatique en créatinine

D'après les résultats, nous avons enregistré une augmentation significative de la concentration plasmatique en créatinine chez les rats traités par $AlCl_3$ par rapport aux rats témoins. Le traitement des rats par l'AAL et/ou la NS améliore cette augmentation, comparativement au groupe $AlCl_3$ on observe une diminution significative chez les groupes traités par les combinaisons $AlCl_3+AAL$, $AlCl_3+AAL+NS$ et $AlCl_3+NS$ (Tableau 10, Figure 25).

3. Effet sur la concentration plasmatique en acide urique

Les résultats obtenus (Tableau 10, Figure 25) montrent une augmentation statistiquement significative de la concentration plasmatique en acide urique chez le lot $AlCl_3$ comparativement au lot témoin. Ils montrent aussi, un rétablissement par une diminution significative chez les lots $AlCl_3+AAL$, $AlCl_3+AAL+NS$ et $AlCl_3+NS$ comparativement au lot $AlCl_3$.

Tableau 10: Variation de la concentration plasmatique (mg/dl) en urée, en créatinine et en acide urique chez les rats témoins et les rats traités.

Paramètres	Lots expérimentaux					
	T	$AlCl_3$	$AlCl_3 + AAL$	$AlCl_3 + AAL + NS$	$AlCl_3 + NS$	NS
Urée (mg/dl)	0.22±0.03	0.45±0.04**	0.35±0.07* [#]	0.31±0.04* [#]	0.37±0.06* [#]	0.28±0.07
%	-	+ 104.54	+ 59.09, - 22.22	+ 40.90, - 31.11	+ 68.18, - 17.77	-
Créatinine (mg /dl)	34±8.02	53.5±9.22*	35±6.35 [#]	40.66±7.86 [#]	38.83±3.48 [#]	31.66±1.03
%	-	+ 57.35	- 34.57	- 24	- 27.42	-
Acide urique (mg/dl)	14.33±3.93	20.66±2.73**	15.33±3.61 [#]	14.16±3.31 [#]	14.66±3.77 [#]	13.16±3.31
%	-	+ 44.17	- 25.8	- 31.46	- 29.04	-

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ par comparaison avec les rats témoins.

[#] $p \leq 0.05$ par comparaison avec les rats traités par $AlCl_3$.

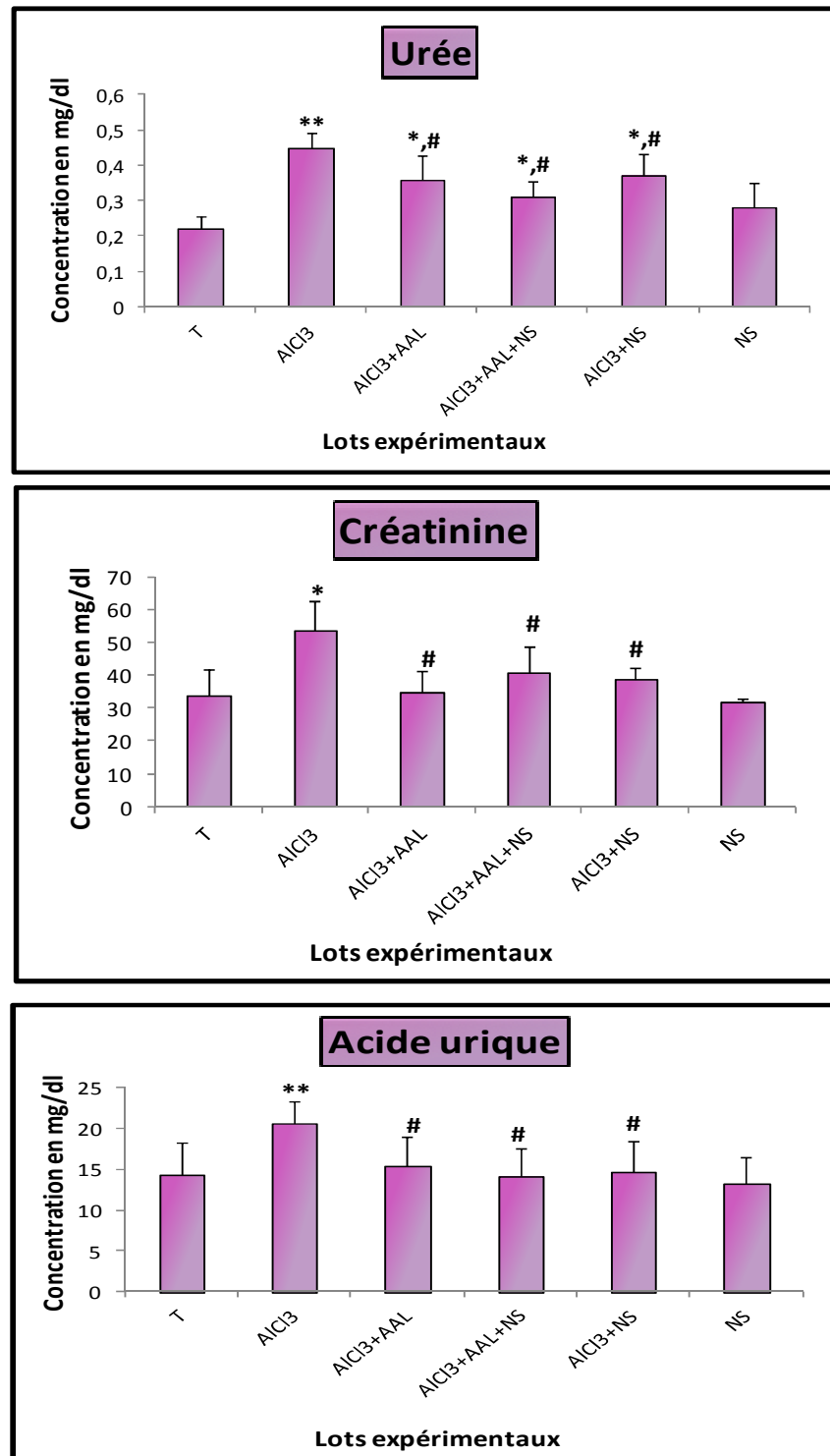


Figure 25: Variation de la concentration plasmatique en urée, en créatinine et en acide urique chez les rats témoins et les rats traités.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ par comparaison avec les rats témoins.

$p \leq 0.05$ par comparaison avec les rats traités par AlCl₃.

➤ Discussion

L'urée, la créatinine et l'acide urique, sont des paramètres essentiels pour évaluer la fonction rénale et la filtration glomérulaire (**Mahieu et al., 2005**). L'augmentation de la teneur plasmatique en acide urique, en créatinine et en urée enregistrer dans la présente étude chez le groupe $AlCl_3$, est considérée comme un biomarqueur du dysfonctionnement rénal qui est probablement corrélé à des changements de l'histoarchitecture rénale, visualisé par l'étude histologique. Les études de **Mahdy et Farrag, (2009)**; **Mahieu et al., (2009)** montrent clairement que l'exposition prolonger aux sels d'aluminium provoque des effets néphrotoxiques, qui peuvent altérer les cellules rénales chez les rats de la souche wistar.

L'urée et la créatinine sont les produits finals de la dégradation des protéines tandis que la purine est la principale source de l'acide urique (**Mahieu et al., 2005, Newairy et al., 2009**). De ce fait, l'augmentation de leurs taux plasmatique peut être corrélée soit à l'augmentation du catabolisme protéique, ou bien à l'augmentation de la glycation des protéines (c'est-à-dire la fixation du glucose plasmatique en excès sur les protéines selon une réaction non enzymatique), qui peut entrainer une atrophie musculaire accompagnée d'une libération accrue de la purine (**El-Demerdash, 2004; Kumar et al., 2009; Mahieu et al., 2009**).

Bien que l'acide urique puisse agir comme un antioxydant, en cas d'excès au niveau plasmatique il agira comme prooxydant ce qui augmente la production des ERO ainsi que leurs effets délétères (**El-Demerdash, 2004; Yousef, 2004**).

Chez les groupes traités par la combinaison chlorure d'aluminium et huile de nigelle comparés au groupe traité par le chlorure d'aluminium seul, les concentrations plasmatiques en urée, en acides urique et en créatinine sont diminuées. Du même, l'augmentation de la concentration plasmatique de ces paramètres causé par $AlCl_3$ a été déclinée après l'administration de l'acide alpha lipoïque. Ces effets sont liés aux propriétés antioxydantes de nigelle et de l'acide alpha lipoïque. En effet, l'extrait végétal et la molécule à pouvoir antioxydant utiliser dans la présente étude exercent un effet protecteur contre les attaques radicalaires diminuant ainsi la peroxydation lipidique, augmentent les processus de défense cellulaire vis-à-vis les effets cytotoxiques du stress oxydatif induit par le chlorure d'aluminium et préserve par conséquent l'altération rénale, cette conclusion est concomitante avec l'histologie des reins. De nombreuses études ont prouvé l'efficacité du nigelle dans l'amélioration de la fonction rénale (**Kokdil et al., 2005 ; Mahdy et Farrag, 2009; Ismail et al., 2010**).

D'autres études (**Neves *et al.*, 2004; Shanmugarajan *et al.*, 2008**) montrent également l'efficacité de l'acide alpha lipoïque contre la néphrotoxicité induite par les produits chimiques.

Kokdil *et al.*, (2005); Yaman et Balikci, (2010) ont rapporté dans leurs études que l'effet amélioratif de l'huile de nigelle sur le fonctionnement du rein est probablement lié à l'amélioration du métabolisme protéique. Des études récentes (**Abedl-Zaher *et al.*, 2008; Yi *et al.*, 2011**) ont également signalé que l'acide alpha lipoïque peut corriger le désordre métabolique et améliorer les teneurs plasmatiques en acide urique, en créatinine et en urée chez des rats et des souris traités par une dose orale d'AAL (100mg/kg PC).

Chapitre VI: Impact du chlorure d'aluminium sur le profil lipidique: Effets protecteurs de la supplémentation en huile de nigelle et/ou en acide alpha lipoïque

1. Effet sur la concentration plasmatique en cholestérol

Nos résultats révèlent, une variation significative du taux plasmatique en cholestérol chez les groupes AlCl_3 (+50.53%), $\text{AlCl}_3+\text{AAL}+\text{NS}$ (-29.03%), AlCl_3+NS (-20.43%) et NS (-34.40) par rapport au groupe témoin (Tableau 11, Figure 26). Tandis qu'on enregistre un rétablissement par une diminution significative chez les groupes AlCl_3+AAL , $\text{AlCl}_3+\text{AAL}+\text{NS}$ et AlCl_3+NS comparativement au groupe AlCl_3 .

2. Effet sur la concentration plasmatique en triglycérides et en HDL (High density lipoprotein)

Les résultats présentés dans le Tableau 11 et par la Figure 26 illustrent une diminution significative des triglycérides chez le lot AlCl_3+NS par rapport au lot témoin. Aussi, selon nos résultats on remarque une diminution significative d'HDL chez le lot AlCl_3 (-14.92%) comparativement au lot témoin.

Parallèlement, une amélioration par une augmentation significative du taux d'HDL est enregistrée chez les lots traités par les combinaisons AlCl_3+AAL , $\text{AlCl}_3+\text{AAL}+\text{NS}$ et AlCl_3+NS comparativement au lot AlCl_3 .

3. Effet sur la concentration plasmatique en LDL (Low density lipoprotein)

Les résultats de notre étude indiquent une augmentation significative de LDL chez les rats traités par AlCl_3 (+ 37.25%) comparativement aux rats témoins. On enregistre aussi une différence significative comparant les groupes traités par les combinaisons $\text{AlCl}_3+\text{AAL}+\text{NS}$, AlCl_3+NS et NS au groupe témoin.

En revanche, ce taux est corrigé après supplémentation en NS et/ou en AAL. La comparaison avec le groupe AlCl_3 révèlent une diminution significative chez les groupes AlCl_3+AAL , $\text{AlCl}_3+\text{AAL}+\text{NS}$ et AlCl_3+NS (Tableau 11, Figure 26).

4. Effet sur la concentration plasmatique en VLDL (Very low density lipoprotein)

L'analyse statistique des valeurs obtenues n'a montré aucune différence significative entre les six lots expérimentaux (Tableau 11, Figure 26).

Tableau 11: Variation de la concentration plasmatique (mg/dl) en cholestérol, en triglycérides, en HDL, en LDL et en VLDL chez les rats témoins et les rats traités.

Paramètres	Lots expérimentaux					
	T	AlCl ₃	AlCl ₃ +AAL	AlCl ₃ +AAL+NS	AlCl ₃ +NS	NS
Cholestérol (mg/dl)	0.93±0.07	1.4±0.15**	0.86±0.11 ^{##}	0.66±0.12 ^{**,#}	0.74±0.11 ^{**,#}	0.61±0.1 ^{**}
%	-	+ 50.53	- 38.57	- 29.03, - 52.85	- 20.43, - 47.14	- 34.40
Triglycérides (mg/dl)	0.92±0.06	1±0.07	0.81±0.26	0.94±0.15	0.64±0.09 ^{*,#}	0.9±0.12
%	-	-	-	-	- 11.95, - 36	-
HDL (mg/dl)	0.67±0.05	0.57±0.041 [*]	0.64±0.06 [#]	0.65±0.063 [#]	0.62±0.045 [#]	0.71±0.09
%	-	- 14.92	+ 12.28	+ 14.03	+ 8.77	-
LDL (mg/dl)	0.51±0.1	0.7±0.11 [*]	0.45±0.13 [#]	0.3±0.08 ^{*,##}	0.36±0.07 ^{**,#}	0.31±0.1 ^{**}
%	-	+ 37.25	- 35.71	- 41.17, - 57.14	- 29.41, - 48.57	- 39.21
VLDL (mg/dl)	0.18±0.01	0.19±0.05	0.17±0.04	0.18±0.03	0.15±0.02	0.18±0.02
%	-	-	-	-	-	-

*p≤0.05 ; **p≤0.01 par comparaison avec les rats témoins.

[#]p≤0.05 ; ^{##}p≤0.01 par comparaison avec les rats traités par AlCl₃.

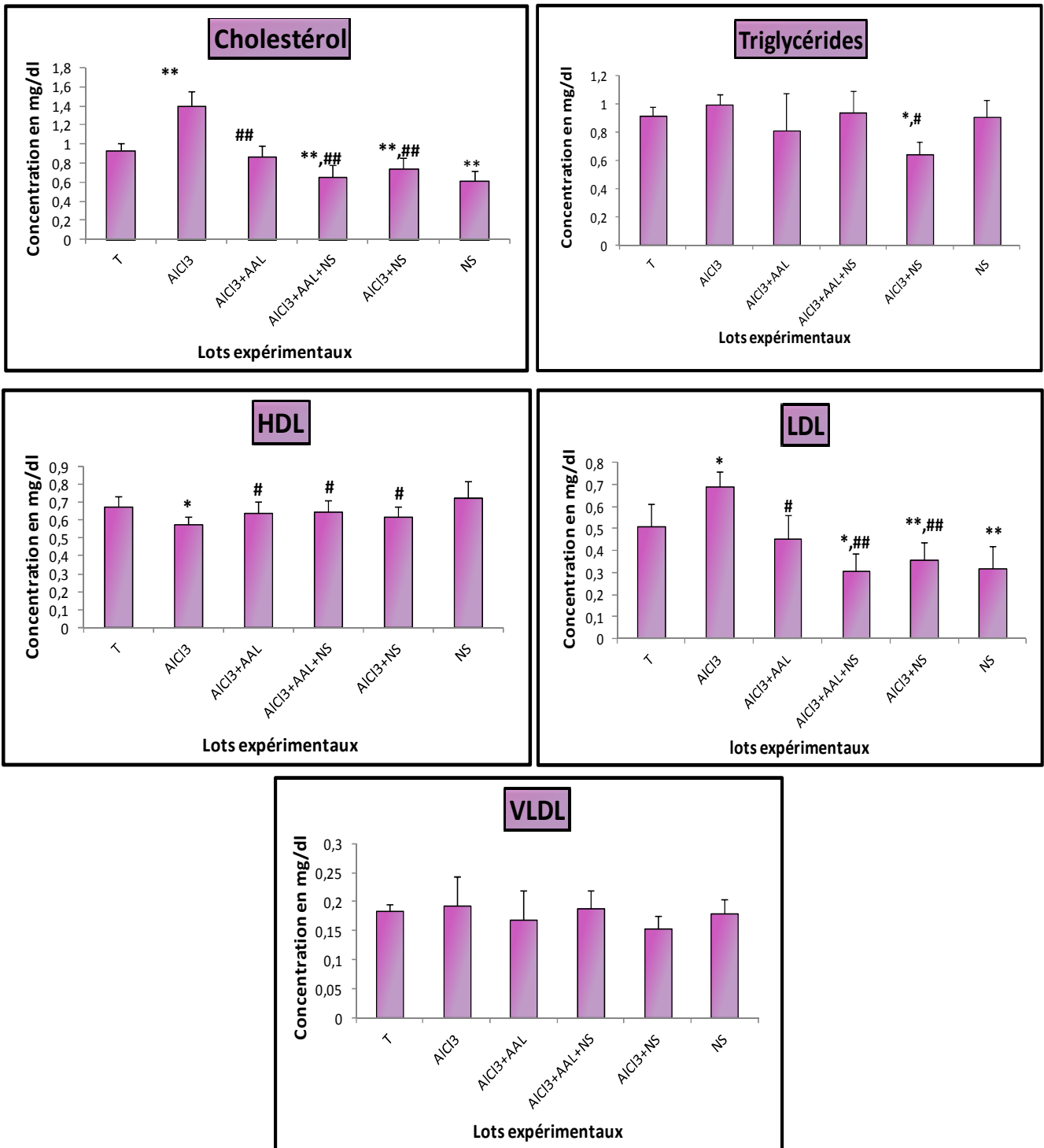


Figure 26: Variation de la concentration plasmatique en cholestérol, en triglycérides, en HDL, en LDL et en VLDL chez les rats témoins et les rats traités.

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ par comparaison avec les rats témoins.

$p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$ par comparaison avec les rats traités par AlCl_3 .

➤ Discussion

L'analyse des résultats obtenus montre des perturbations du profil lipidique chez les rats traités par AlCl_3 comparant aux rats témoins. Ces perturbations sont la conséquence d'une lipolyse intense au niveau des adipocytes induit par l'activation de la lipoprotéine lipase hormonosensible. D'autre part, l'hypercholestérolémie observée dans la présente étude peut être aussi considérée comme le résultat de l'insulinorésistance ou bien de l'effet inhibiteur d'aluminium sur les récepteurs à LDL situé au niveau des tissus périphériques. Il peut être aussi lié à l'augmentation de la concentration en VLDL. Du même, l'hypertriglycéridémie observée est liée à l'augmentation de la concentration en VLDL. Plusieurs études (**El-Damardash, 2004; Mailloux *et al.*, 2011; Shrivastava, 2012**) ont également montré que l'intoxication aluminique induit une augmentation de la concentration plasmatique en cholestérol, en triglycérides, en LDL et en VLDL accompagnée d'une diminution de la concentration en HDL.

La quantité totale du cholestérol plasmatique dépend du taux d'excrétion biliaire (sous forme de cholestérol ou de sel biliaire) et du taux de synthèse hépatique. **El-Damardash, (2004)** suggère que l'hypercholestérolémie enregistrée chez des rats traités quotidiennement par une dose de 34mg/kg PC du chlorure d'aluminium pendant 30 jours, est fortement liée à l'augmentation de sa synthèse hépatique suite à une stimulation de l'hydroxy-méthyle-glutaryl-CoA (HMG-CoA enzyme clé dans la biosynthèse du cholestérol) par l'aluminium.

Les études rapportées par **Mailloux *et al.*, (2011)** prouvent que la perturbation du cycle de Krebs induit par l'aluminium, entraîne l'accumulation du citrate qui va être transporter vers le cytosol dans le quelle il se transforme sous l'influence des enzymes lipogeniques en acides gras. Ces derniers subit une estérification (liaison avec le glycérol) pour donner des TG ce qui augmente leurs taux plasmatique ainsi que le taux de leurs transporteurs (VLDL). Tandis que, **Newairy *et al.*, (2009)** ont rapporté que l'augmentation de la concentration en VLDL enregistrée peut être expliquée, d'une part par l'augmentation de leurs synthèse hépatique et d'autre part par un ralentissement de leurs catabolisme.

Au contraire, nous avons constaté chez les rats traités par le chlorure d'aluminium associé avec l'huile de nigelle et/ou l'acide alpha lipoïque une amélioration de la cholestérolémie et du taux plasmatique en HDL et en LDL, avec une amélioration partielle de la triglycéridémie et du taux plasmatique en VLDL. Ces effets sont dus soit suite à une réduction de l'absorption intestinale du cholestérol et/ou une augmentation de son excrétion biliaire. Ou bien, suite à une diminution de la synthèse des acides gras, une inhibition de l'acétyl CoA carboxylase et une augmentation du catabolisme des LDL. En accord avec nos résultats, un effet hypocholestérolémiant de nigelle ainsi que d'acide alpha lipoïque a été également observé au cours d'autres études effectuées sur des rats et des lapins (**Cakatay et al., 2005; Mahdy et Farrag, 2009; Yi et al., 2011; Shabana et al., 2012**).

Malarkodi et Varalakshmi, (2003); Saad et al., (2010) indiquent dans leurs études que l'effet préventif exercé par l'acide alpha lipoïque sur le profil lipidique est fortement corrélé à la diminution de l'estérification du cholestérol intracellulaire par l'acyle-CoA (cholesterol acyl transferase, ACAT). Ils montrent aussi, que l'AAL inhibe l'activité enzymatique de la HMG-CoA réductase et de la lipoprotéine lipases ce qui diminué la synthèse hépatique du cholestérol.

L'effet hypolipémiant de l'huile de nigelle est attribué aux molécules bioactives contenus dans les grains. Les études de **Mahdy et Farrag, (2009); Shabana et al., (2012)** ont rapporté que les flavonoïdes, les huiles essentielles (notamment la thymoquinone et la nigellone), les phytostérols et les acides gras polyinsaturés tel que le β -sitosterol peuvent agir comme inhibiteurs de certaines enzymes clés du métabolisme lipidique. De plus, **Ismail et al., (2010)** suggèrent que l'effet hypocholestérolémiant de la nigelle peut être aussi lié à l'action de la thymoquinone au niveau des gènes responsables de métabolisme du cholestérol en augmentant spécifiquement le taux des ARN_m des récepteurs LDL et en diminuant celle de la HMG-CoA réductase. En effet, **Asgary et al., (2013)** ont suggéré que l'huile de nigelle peut agir sur les récepteurs LDL provoquant leur régulation (sensibilisation) ce qui mène vers une diminution du taux plasmatique en cholestérol chez les lapins hypercholestérimique et prévient l'athérosclérose.

Chapitre VII: Stress oxydatif induit par le chlorure d'aluminium: Effets protecteurs de la supplémentation en huile de nigelle et/ou en acide alpha lipoïque

1. Effet sur le taux du glutathion réduit (GSH)

Le dosage du GSH montre une diminution significative ($P \leq 0.01$) de leur teneur au niveau du foie (-21.96%), des reins (-32.21%), du cœur (-27.82%), des testicules (-29.28%), du cerveau (-16.26%) et des GR (-32.84%) chez le lot $AlCl_3$ comparativement au lot témoin.

Par contre, ces valeurs augmentent chez les lots $AlCl_3$ +AAL, $AlCl_3$ +AAL+NS et $AlCl_3$ +NS par rapport au lot $AlCl_3$. Comparant le lot NS avec le lot témoin, on enregistre une variation significative de la teneur en GSH dans le cœur (+56.26%) (Tableau 12, Figure 27).

Tableau 12: Variation de la teneur du glutathion réduit (nmol/mg de protéine) dans: le foie, les reins, le cœur, les testicules, le cerveau et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.

Paramètre	Les organes	Lots expérimentaux					
		T	$AlCl_3$	$AlCl_3$ +AAL	$AlCl_3$ +AAL+NS	$AlCl_3$ +NS	NS
GSH (nmol / mg prot)	foie	87.83±5.6	68.54±7.61**	79.93±9.84##	80.4±3.78#	80.77±6.55	89.6±12.25
	%	-	- 21.96	+ 16.61	+ 17.3	-	-
	Reins	50.17±1.14	34.01±7.42**	46.64±5.2#	48.73±4.35###	44.98±4.85#	50.51±8.16
	%	-	- 32.21	+ 37.13	+ 43.28	+ 32.25	-
	Cœur	53.41±3.42	38.55±1.73***	53.78±2.12####	52.47±1.03####	67.45±5.97**###	83.46±11.44**
	%	-	- 27.82	+ 39.50	+ 36.1	+ 26.28, + 74.96	+ 56.26
	Testicule	81.09±3.87	57.03±1.48***	82.27±9.58##	60.4±1.64***#	75.1±2.63*###	84.35±1.5
	%	-	- 29.28	+ 44.25	- 25.51, + 5.9	- 7.38, + 31.68	-
	Cerveau	106.73±4.29	89.37±3.55**	101.66±4.16##	105.24±3.03####	102.90±10.05#	111.76±6.31
	%	-	- 16.26	+ 13.75	+ 17.75	+ 15.13	-
	GR	24.78±0.52	16.64±0.3***	17.63±0.28**	22.71.810##	21.22±0.36	24.7±0.43
	%	-	- 32.84	- 28.85	+ 36.47	-	-

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ par comparaison avec les rats témoins.

$p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$; ### $p \leq 0.001$ par comparaison avec les rats traités par $AlCl_3$.

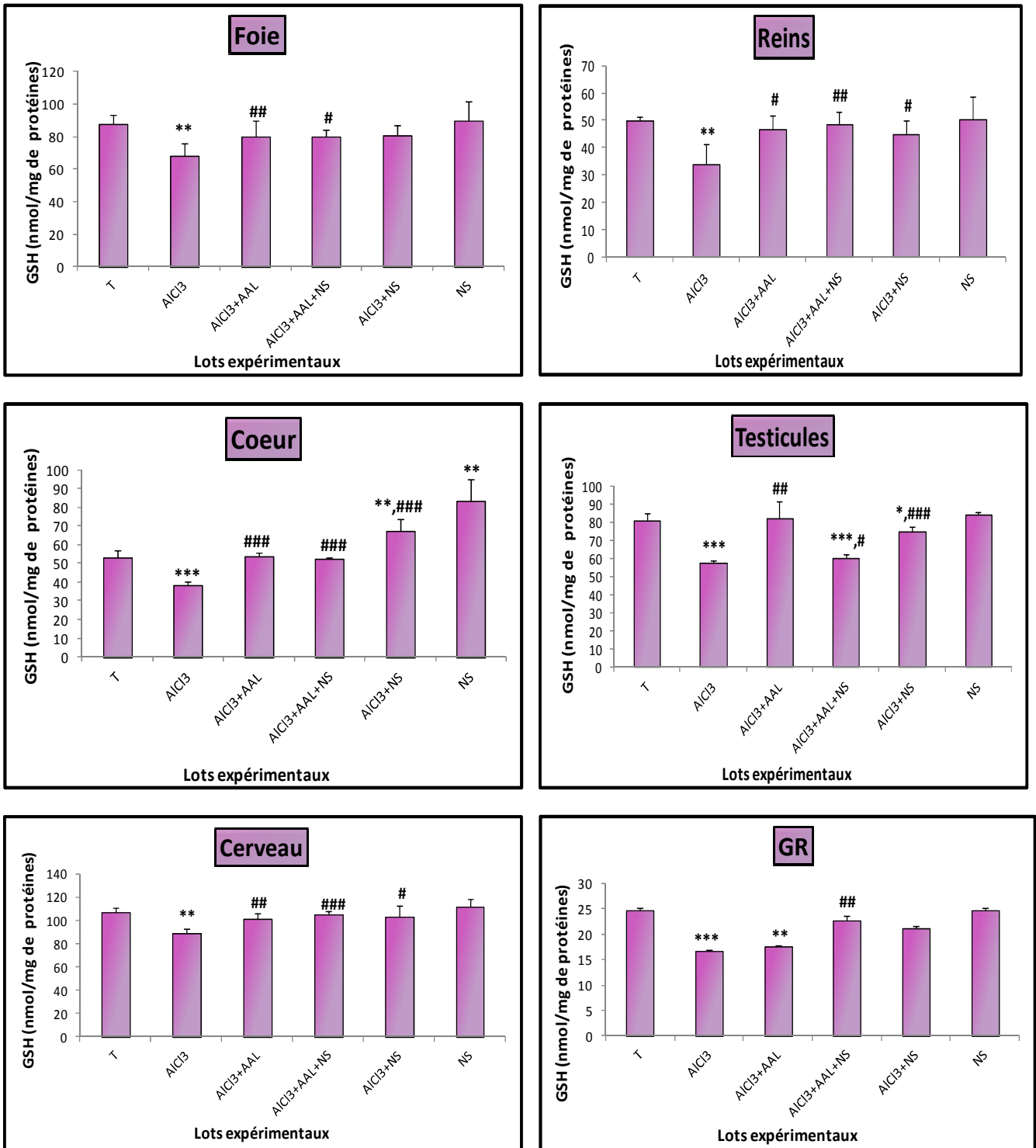


Figure 27: Variation de la teneur du glutathion réduit (GSH) dans le foie, les reins, le cœur, les testicules, le cerveau et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ par comparaison avec les rats témoins.

$p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$; ### $p \leq 0.001$ par comparaison avec les rats traités par AlCl_3 .

2. Effet sur le taux de la malondialdéhyde (MDA)

D'après les résultats de notre étude (Tableau 13, Figure 28) on observe une augmentation significative ($P \leq 0.05$) du taux de MDA au niveau du foie, des reins, du cœur, du cerveau et des GR comparant les rats traités par $AlCl_3$ et les rats témoins.

Par rapport aux rats traités par $AlCl_3$ le traitement par les combinaisons ($AlCl_3$ +AAL, $AlCl_3$ +AAL+NS et $AlCl_3$ +NS) entraîne un rétablissement par une diminution statistiquement significative du taux élevé de la malondialdéhyde dans le foie, les reins, le cœur, le cerveau et les GR.

Tableau 13: Variation de la teneur de la malondialdéhyde (MDA) (nmol/mg de protéine) dans: le foie, les reins, le cœur, les testicules, le cerveau et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.

Paramètre	Les organes	Les lots expérimentaux					
		T	$AlCl_3$	$AlCl_3$ +AAL	$AlCl_3$ +AAL+NS	$AlCl_3$ +NS	NS
MDA (nmol / mg prot)	foie	0.263±0.003	0.353±0.02**	0.272±0.03 [#]	0.25±0.02 ^{###}	0.294±0.01	0.28±0.002
	%	-	+ 34.22	- 22.94	- 29.17	-	-
	Reins	0.305±0.01	0.425±0.07*	0.335±0.01 [#]	0.312±0.02 [#]	0.347±0.034 [#]	0.294±0.03
	%	-	+ 39.34	- 21.17	- 26.58	- 18.35	-
	Cœur	0.34±0.07	0.48±0.03***	0.432±0.025**	0.323±0.01 ^{###}	0.361±0.03 ^{###}	0.335±0.05
	%	-	+ 41.17	+ 27.05	- 32.70	- 24.8	-
	Testicule	0.812±0.07	0.865±0.08	0.843±0.04	0.827±0.006	0.852±0.1	0.836±0.01
	%	-	-	-	-	-	-
	Cerveau	0.277±0.01	0.345±0.06*	0.221±0.07 [#]	0.284±0.01 [#]	0.312±0.02*	0.257±0.09
	%	-	+ 24.54	- 35.94	- 17.68	+ 9.56	-
	GR	0.317±0.02	0.435±0.01**	0.404±0.01**	0.354±0.02 ^{###}	0.382±0.007	0.33±0.01
	%	-	+ 37.22	+ 27.44	- 18.62	-	-

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ par comparaison avec les rats témoins.

[#] $p \leq 0.05$; ^{##} $p \leq 0.01$; ^{###} $p \leq 0.001$ par comparaison avec les rats traités par $AlCl_3$.

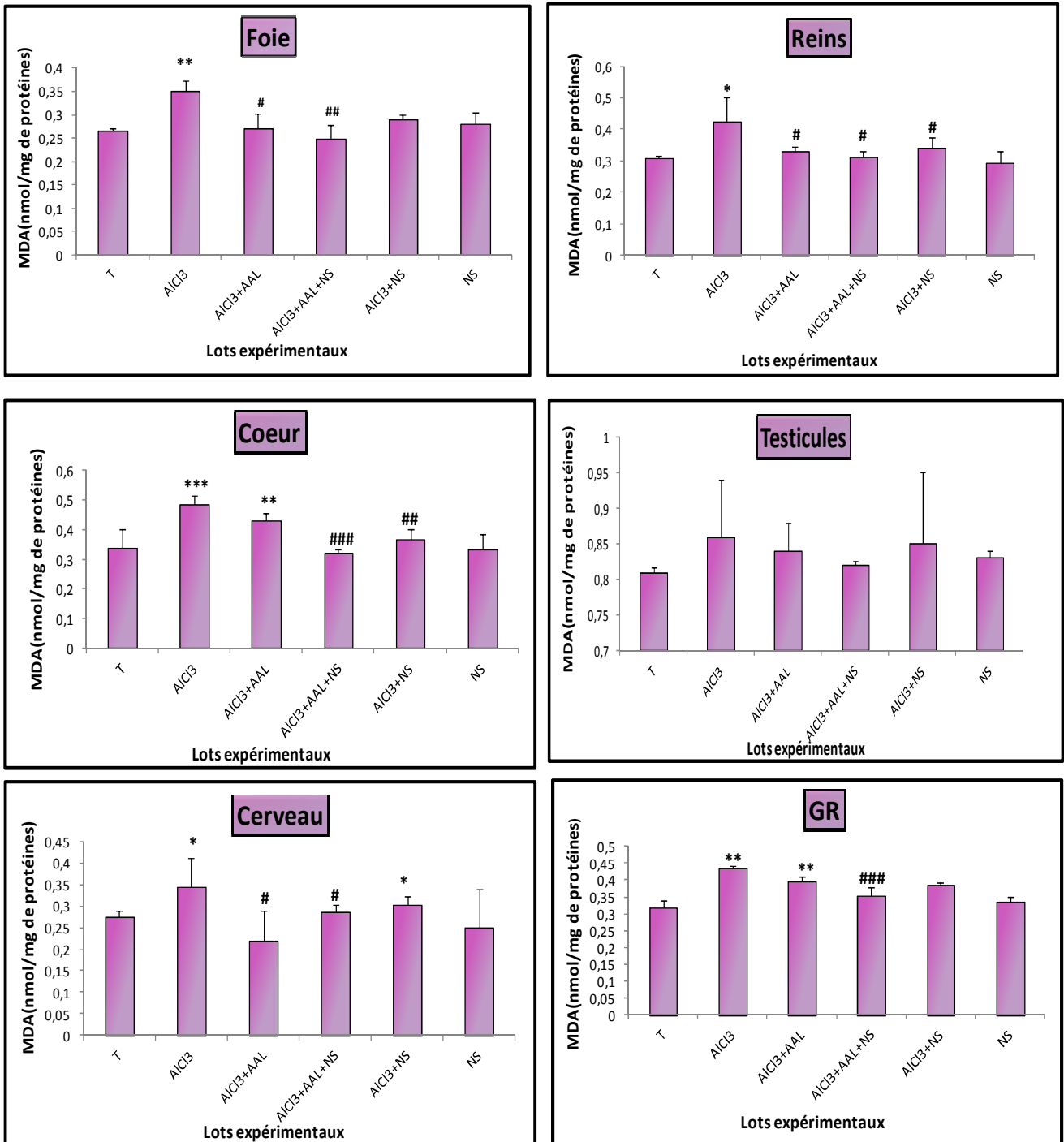


Figure 28: Variation de la teneur de la malondialdéhyde (MDA) dans le foie, les reins, le cœur, les testicules, le cerveau et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ par comparaison avec les rats témoins.

$p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$; ### $p \leq 0.001$ par comparaison avec les rats traités par $AlCl_3$.

3. Effet sur l'activité du glutathion peroxydase (GPx)

Les résultats illustrés dans le Tableau 14 et par la Figure 29 indiquent une diminution significative de l'activité enzymatique du glutathion peroxydase chez le group $AlCl_3$ comparativement au groupe témoin au niveau des organes étudiés ainsi qu'au niveau des GR. On observe également une augmentation significative de la GPx au niveau du cœur chez le groupe traité par la NS comparativement au groupe témoin.

En revanche, l'administration aux rats de l'AAL et/ou la NS + $AlCl_3$ entraîne une amélioration par augmentation de l'activité enzymatique du GPx dans le foie, les reins, le cœur, les testicules, le cerveau et les GR par rapport aux rats traités par $AlCl_3$.

Tableau 14: Variation de l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx) (nmol GSH/min/mg de protéine) dans : le foie, les reins, le cœur, les testicules, le cerveau et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.

Paramètre	Les organes	Lots expérimentaux					
		T	$AlCl_3$	$AlCl_3$ +AAL	$AlCl_3$ +AAL+NS	$AlCl_3$ +NS	NS
G Px (nmol GSH / min/ mg prot)	foie	0.17±0.006	0.145±0.003**	0.153±0.04*##	0.208±0.02##	0.162±0.01	0.177±0.01
	%	-	- 40.70	- 10, + 5.51	+ 43.44	-	-
	Reins	0.151±0.03	0.107±0.02**	0.134±0.04#	0.148±0.05##	0.143±0.08##	0.157±0.07
	%	-	- 29.13	+ 25.23	+ 38.31	+ 33.64	-
	Cœur	0.123±0.04	0.09±0.03**	0.105±0.02	0.117±0.05#	0.137±0.01##	0.142±0.003*
	%	-	- 26.82	-	+ 30	+ 52.22	+ 15.44
	Testicule	0.17±0.004	0.121±0.01**	0.157±0.007##	0.143±0.02#	0.164±0.04##	0.18±0.009
	%	-	- 28.82	+ 29.75	+ 18.18	+ 35.53	-
	Cerveau	0.209±0.02	0.116±0.03***	0.167±0.05#	0.194±0.07##	0.182±0.06##	0.24±0.09
	%	-	- 44.5	+ 43.96	+ 67.24	+ 56.9	-
	GR	0.193±0.07	0.15±0.004**	0.178±0.008#	0.221±0.005##	0.18±0.004#	0.202±0.004
	%	-	- 22.27	+ 18.66	+ 47.33	+ 20	-

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ par comparaison avec les rats témoins.

$p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$ par comparaison avec les rats traités par $AlCl_3$.

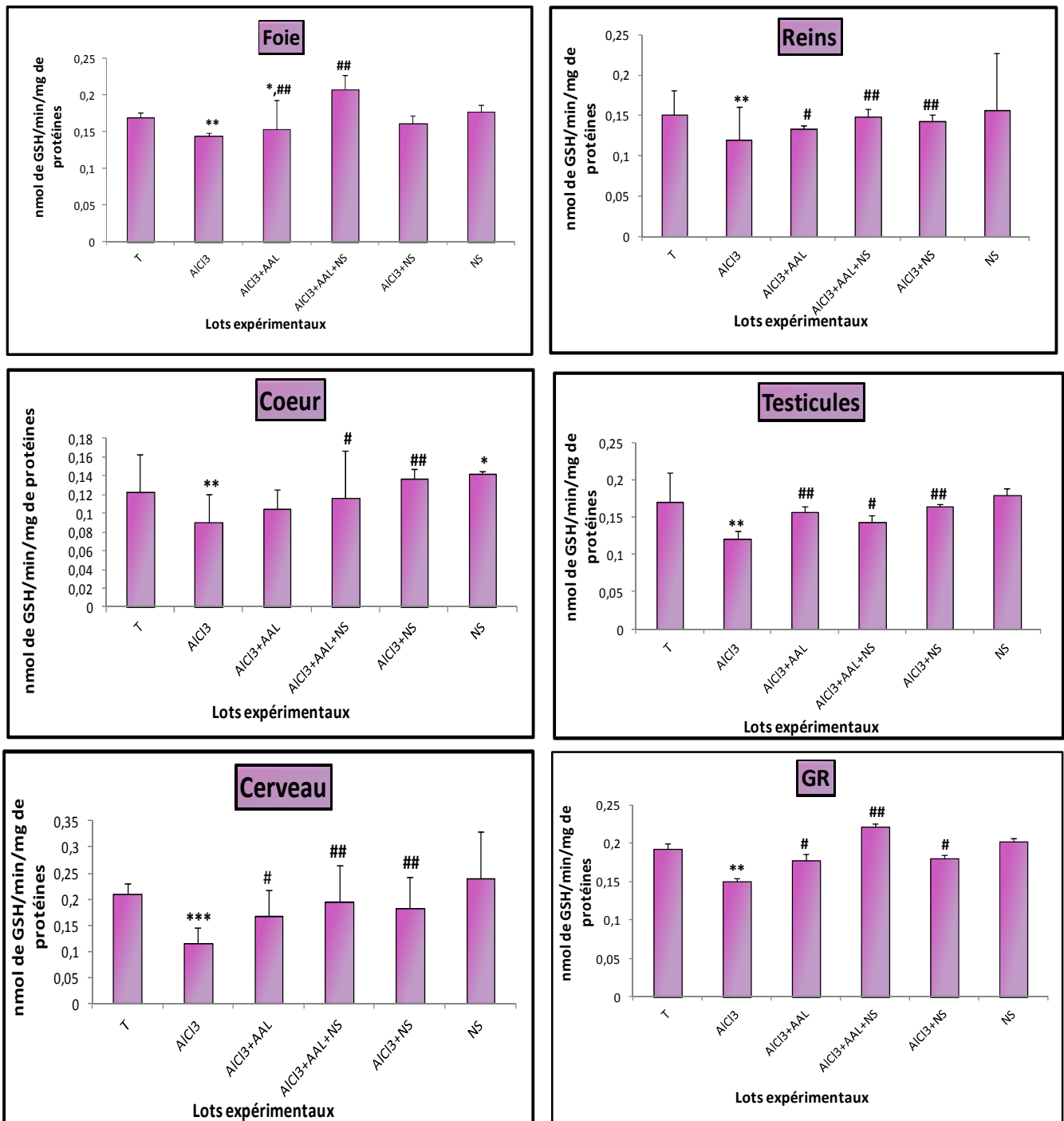


Figure 29: Variation de l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx) dans le foie, les reins, le cœur, les testicules, le cerveau et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ par comparaison avec les rats témoins.

$p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$ par comparaison avec les rats traités par AICl_3 .

4. Effet sur l'activité de la catalase

L'administration du AlCl₃ à raison de 34 mg/Kg P.C induit une variation significative (P≤0.001) de l'activité catalase dans le foie, les reins, le cœur, les testicules, le cerveau et les GR comparant aux rats témoins.

Cependant, chez les groupes AlCl₃+AAL, AlCl₃+AAL+NS et AlCl₃+NS on enregistre un rétablissement par augmentation de cette activité dans les organes étudiés ainsi que dans les GR par rapport au groupe AlCl₃ (Tableau 15, Figure 30).

Tableau 15: Variation de l'activité enzymatique de la catalase (μmol H₂O₂ dégrader/min/mg de protéine) dans : le foie, les reins, le cœur, les testicules, le cerveau et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.

Paramètre	Les organes	Lots expérimentaux					
		T	AlCl ₃	AlCl ₃ +AAL	AlCl ₃ +AAL+NS	AlCl ₃ +NS	NS
Catalase (μ mol H ₂ O ₂ dégrader /min/mg de protéines)	foie	7.052±0.09	5.666±0.2*	6.81±0.06* [#]	6.945±0.19 [#]	6.851±0.2	7.037±0.12
	%	-	- 19.65	- 3.43, + 20.19	+ 22.57	-	-
	Reins	5.505±0.07	3.408±0.1***	4.7±0.2 [#]	4.971±0.09 ^{###}	4.917±0.06 ^{###}	5.155±0.15
	%	-	- 38.09	+ 37.91	+ 45.86	+ 44.27	-
	Cœur	6.841±0.09	4.628±0.08***	4.934±0.1*	5.775±0.12 ^{###}	5.837±0.15 ^{###}	5.962±0.2
	%	-	- 32.34	- 27.87	+ 24.78	+ 26.12	-
	Testicule	6.641±0.64	4.371±0.5***	6.477±0.3 ^{###}	6.532±0.2 ^{###}	6.457±0.4 ^{###}	6.841±0.09
	%	-	- 34.18	+ 48.18	+ 49.43	+ 47.72	-
	Cerveau	3.21±0.1	1.98±0.6***	3.126±0.5 [#]	3.165±0.2 ^{###}	3.177±0.15 ^{###}	3.242±0.9
	%	-	- 38.31	+ 57.87	+ 59.84	+ 60.45	-
	GR	1.862±0.01	1.56±0.05**	1.656±0.05	1.804±0.17	1.752±0.04	1.90±0.07
	%	-	- 16.21	-	-	-	-

* p≤0.05 ; ** p≤0.01 ; *** p≤0.001 par comparaison avec les rats témoins.

[#] p ≤0.05 ; ^{###} p≤0.01 ; ^{####} p ≤0.001 par comparaison avec les rats traités par AlCl₃.

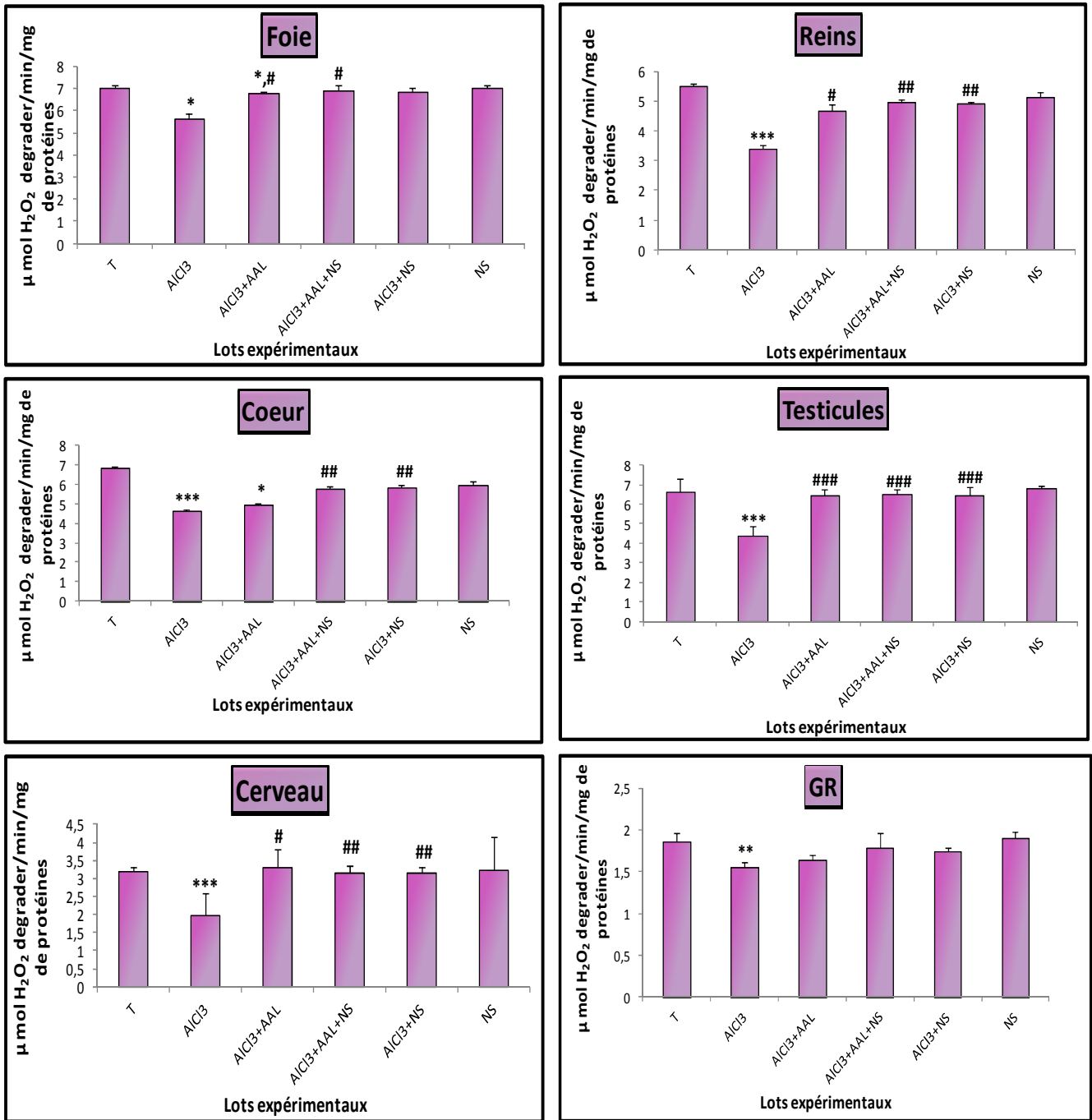


Figure 30: Variation de l'activité enzymatique de la catalase dans le foie, les reins, le cœur, les testicules, le cerveau et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ par comparaison avec les rats témoins.

$p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$; ### $p \leq 0.001$ par comparaison avec les rats traités par AIC₃.

5. Effet sur l'activité de la superoxyde dismutase (SOD)

Comparant au groupe témoin, la détermination de l'activité enzymatique de la SOD (Tableau 16, Figure 31), chez le groupe $AlCl_3$ révèle une diminution significative ($P \leq 0.05$) dans le foie (-55.77%), les reins (-33.71%), le cœur (-75.15%), les testicules (-31.11%), le cerveau (-59.43%) et les GR (-70.65%). Elle révèle aussi, une variation significative chez les groupes $AlCl_3$ +AAL, $AlCl_3$ +AAL+NS dans le foie et les GR ainsi que chez le groupe $AlCl_3$ +AAL dans le cerveau.

Par contre, la diminution de l'activité enzymatique de la SOD tissulaires et érythrocytaire est corrigée après le traitement des rats par les combinaisons ($AlCl_3$ +AAL, $AlCl_3$ +AAL+NS et $AlCl_3$ +NS), nos résultats révèlent une augmentation significative de cette activité comparativement aux rats traités par $AlCl_3$.

Tableau 16: Variation de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD) (U/mg de protéines) dans: le foie, les reins, le cœur, les testicules, le cerveau et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.

Paramètre	Les organes	Lots expérimentaux					
		T	$AlCl_3$	$AlCl_3$ +AAL	$AlCl_3$ +AAL+NS	$AlCl_3$ +NS	NS
SOD (U/mg de protéines)	foie	0.814±0.09	0.36±0.06 ^{***}	0.46±0.04 ^{***,#}	0.513±0.05 ^{*,###}	0.872±0.03 [#]	0.911±0.03
	%	-	- 55.77	- 43.48, + 27.77	- 36.97, + 42.5	+ 142.22	-
	Reins	1.105±0.12	0.751±0.09 ^{**}	0.91±0.15 [#]	0.964±0.1 ^{###}	1±0.12 [#]	1.165±0.19
	%	-	- 33.71	+ 21.17	+ 28.36	+ 33.15	-
	Cœur	0.161±0.07	0.04±0.02 [*]	0.133±0.04 ^{###}	0.152±0.04 ^{###}	0.17±0.05 ^{###}	0.181±0.1
	%	-	- 75.15	+ 232.5	+ 280	+ 325	-
	Testicule	1.35±0.18	0.93±0.12 [*]	1.204±0.15 [#]	1.13±0.24	1.273±0.17 [#]	1.47±0.2
	%	-	- 31.11	+ 29.46	-	+ 36.88	-
	Cerveau	0.567±0.09	0.23±0.09 ^{***}	0.354±0.07 ^{*,#}	0.621±0.12 ^{###}	0.477±0.18 ^{###}	0.603±0.06
	%	-	- 59.43	- 37.56, + 53.91	+ 170	+ 107.39	-
	GR	1.363±0.02	0.4±0.06 ^{***}	0.912±0.11 ^{*,#}	0.821±0.17 ^{*,#}	0.7±0.01 ^{**}	1.410±0.01
	%	-	- 70.65	- 33.08, +128	- 39.76, +105.25	- 48.64	-

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ par comparaison avec les rats témoins.

$p \leq 0.05$; ### $p \leq 0.01$ par comparaison avec les rats témoins traités par $AlCl_3$.

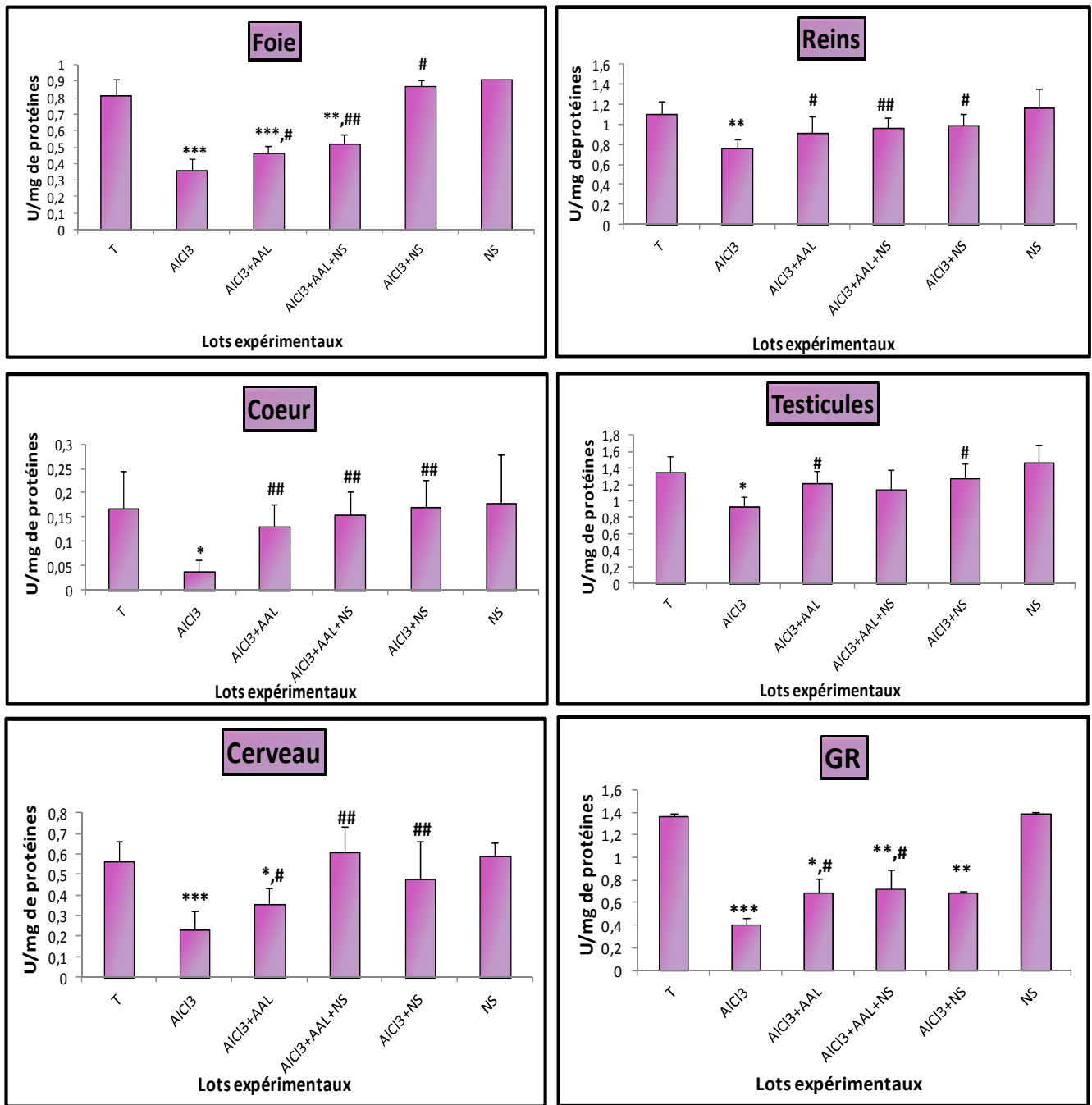


Figure 31: Variation de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD) dans le foie, les reins, le cœur, les testicules, le cerveau et les globules rouges (GR) chez les rats témoins et les rats traités.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ par comparaison avec les rats témoins.

$p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$ par comparaison avec les rats traités par $AlCl_3$.

➤ Discussion

La peroxydation lipidique (LPO) est le processus de la dégradation oxydative des acides gras polyinsaturés et son occurrence dans les membranes biologiques cause des changements dans la structure et la fonction membranaire. Elle cause une dépolarisation, une perturbation des lipides et une inhibition des enzymes membranaires. Module le transport des protéines et finalement cause la perte de l'intégrité de la membrane plasmique. Ceci explique la perturbation des activités transaminases et lactate déshydrogénase plasmique (données montrées précédemment) (**Flora et al., 2003; Sharma et al., 2007**). Le degré du LPO est mesuré en termes de malondialdéhyde (MDA, produit final de LPO). En effet, les taux élevés MDA sont des indices importantes de la toxicité et de la cancérogénicité de plusieurs xénobiotiques (**Abreo et al., 2004**).

L'augmentation de la peroxydation lipidique et des dommages oxydatifs provoque des perturbations remarquables dans l'activité des enzymes antioxydantes (GPx, Catalase, SOD) (**Prakash et Kumar, 2009; Shrivastava, 2012**). Ces derniers sont considérés comme la première ligne de la défense cellulaire contre les dommages oxydatifs. Elles empêchent l'induction d'un état du stress oxydant, maintiennent l'homéostasie des cellules et jouent un rôle important dans l'élimination des ERO. Les ERO peuvent être évaluées indirectement en mesurant les activités de ces enzymes (**Abreo et al., 2004; Nehru et Anand, 2005; Lukyanenko et al., 2013**).

Le glutathion réduit (GSH), un thiol endogène joue un rôle d'antioxydant. En outre, il est un réducteur physiologique responsable de maintenir le statut redox intracellulaire. Il joue aussi un rôle major dans la protection et la détoxification des composés prooxydants en agissant comme cosubstrat d'enzymes antioxydantes (**Mahieu et al., 2005; Nehru et Anand, 2005**).

Nos résultats révèlent une diminution significative de la teneur en glutathion au niveau des organes étudiés et des érythrocytes après administration du chlorure d'aluminium, cette baisse est le résultat de la diminution de la synthèse hépatique du glutathion. En effet, **Yousef et Salama, (2009)** ont trouvé des résultats similaires. Du même, **Viezeliene et al., (2011)** montrent que le traitement des souris par une injection intrapéritonéale du chlorure d'aluminium (25mg/kg PC) provoque une augmentation du glutathion oxydé (GSSG) et une diminution du glutathion réduit ainsi que de l'activité des enzymes GSH-dépendantes.

Des études récentes (**Newairy et al., 2009 ; Mailloux et al., 2011**) montrent que le chlorure d'aluminium a un effet inhibiteur sur l'activité glutamyl-cystéine synthétase, enzyme qui contrôle la biosynthèse du glutathion dans le foie. Il a aussi, un effet inhibiteur sur l'activité du glucose-6-phosphate déshydrogénase et du NADP-isocitrate déshydrogénase, enzyme impliquée dans la régénération du NADPH indispensable pour le renouvellement des molécules de glutathion. La diminution de la quantité du NADPH peut être aussi liée à l'hyperglycémie (le glucose utilisé par la voie des polyols consomme le NADPH).

D'autre part, la baisse du taux de GSH tissulaire et érythrocytaire pourrait être le résultat de la dégradation massive de ce tripeptide due à son rôle dans la détoxification des radicaux libres générés par l'aluminium, ces derniers réagissent avec une forte affinité aux groupements thiol (-SH) de la GSH (**Mahieu et al., 2005, 2009; Shrivastava, 2012**).

Les résultats de notre étude montrent aussi une augmentation du taux de malondialdéhyde (MDA) au niveau de tous les organes étudiés. Ceci témoigne l'installation d'un état de stress oxydatif chez les rats traités par le chlorure d'aluminium. Le niveau élevé de MDA pourrait être causé suite à une augmentation d'ions Fe^{+2} (liaison de l'Al sur la transferrine à la place de Fe^{+2}) capables de générer les ERO (réaction de fenton) tel que le radical hydroxyle qui a son tour peut initier la peroxydation lipidique et/ou suite à l'inactivation des enzymes impliquées dans la défense antioxydante. Nos résultats concordent avec ceux de **Prakash et Kumar, (2009); Sharma et al., (2007); Wu et al., (2012); Lukyanenko et al., (2013). Flora et al., (2003)** montrent que le traitement oral des rats par le nitrate d'aluminium augmente la peroxydation lipidique au niveau tissulaire.

Ainsi, l'augmentation excessive des radicaux libres induit aussi une perturbation de l'activité de GPx, catalase et SOD dans les organes étudiés des rats traités par le chlorure d'aluminium comparativement aux rats témoins. La baisse de l'activité des enzymes antioxydantes pourrait signaler soit un état d'épuisement à la suite de surexploitation par un stress oxydatif, soit tout simplement une inhibition de leurs expressions et dans les deux cas, cette baisse indique un déséquilibre antioxydant et un état de stress oxydatif.

La diminution de l'activité de GPx, catalase et SOD pourrait être expliquée également par l'épuisement de sélénium, du zinc, du cuivre et de GSH, coenzymes nécessaire au bon fonctionnement des enzymes antioxydantes. Ces observations ont été confirmées par les travaux de **Nehru et Anand, (2005); Sharma *et al.*, (2007); Yousef et Salama, (2009); Zhu *et al.*, (2012)** qui ont également enregistré une diminution de l'activité des enzymes antioxydantes suite à l'intoxication aluminique. Les études de **Guo *et al.*, (2009); Lukyanenko *et al.*, (2013)** ont rapporté que l'accumulation du chlorure d'aluminium inhibe l'absorption des oligoéléments, altère leur homéostasie et diminue leur capacité de liaison aux enzymes antioxydantes.

De plus de leurs effets bénéfiques sur les paramètres physiologiques, hématologiques et biochimiques l'huile de nigelle et l'acide alpha lipoïque exercent aussi des effets bénéfiques sur la variation des paramètres du stress oxydatif en augmentant les activités des enzymes antioxydantes (GPx, Catalase, SOD), en stimulant la production d'une importante quantité de GSH et en diminuant la peroxydation lipidique au niveau tissulaire et érythrocytaire. Plusieurs études (**Ilhan *et al.*, 2005; Mohamadin *et al.*, 2010; Awadalla, 2012; Krishnan et Muthukrishnan, 2012**), indiquent clairement l'effet protecteur de la nigelle vis-à-vis les effets cytotoxiques du stress oxydatif induit par différents xénobiotiques. D'autres recherches, ont montré aussi les effets antioxydants puissants de l'AAL dans la réduction de la peroxydation lipidique (**Prahalathan *et al.*, 2006; Sahin *et al.*, 2006; Moraes *et al.*, 2010; El-Beshbishy *et al.*, 2012**).

Les résultats enregistrés dans la présente étude, laissent suggérer que l'augmentation du taux de glutathion et de l'activité des enzymes antioxydantes sont traduites par la capacité de NS et AAL d'induire un effet scavenger vis-à-vis les radicaux libres produits par l'aluminium (réduction du stress oxydant), pour maintenir ainsi le taux normal de glutathion hépatique et des activités enzymatiques. La diminution du taux de MDA confirme ces suggestions. Il a été rapporté que l'activité anti-oxydante de nigelle ainsi que de l'acide alpha lipoïque est liée à leurs capacités de chélater les métaux lourds et les ions métalliques, de piéger les espèces réactives de l'oxygène, de régénérer les antioxydants endogènes (tels que la vitamine C, la vitamine E et le GSH) et de réparer par conséquent les dommages macromoléculaires au niveau cellulaires (**Kokilavani *et al.*, 2005; Amudah *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2013; Tayman *et al.*, 2013**).

Les travaux de recherche d'**Al-Saleh et al., (2006)** ainsi que d'**Awadalla, (2012)** ont montré que la NS présente une source importante de vitamines et d'oligoéléments qui sont des cofacteurs pour les enzymes antioxydantes. De plus, des études récentes ont montré que les activités antioxydantes efficaces de la NS sont attribuées à sa richesse en composés phénolique, alors que l'activité antioxydante d'AAL est attribuée à son groupement sulfhydryle (**Kokilavani et al., 2005; Morase et al., 2010**).

Selon des recherches antérieures réalisées sur des rats wistar pendant 70jours, **Shila et al., (2005)** montrent que l'acide alpha lipoïque (70 mg/kg PC par gavage) exerce leur effet antioxydant vis-à-vis le stress induit par l'arsenic (100ppm dans l'eau de boisson), en favorisant le captage cellulaire du glucose. Ce dernier, constitué le substrat pour la voie des pentoses phosphates ce qui augmente le taux cellulaire du NADPH et par conséquent augmente l'activité des enzymes antioxydantes telle que la catalase (régénération de ces enzymes par le NADPH provenant du voie des pentose phosphate).

De plus, **Abedel-Zaher et al., (2008); Winiarska et al., (2008)** ont constaté que l'AAL favorise la biosynthèse du glutathion réduit en augmentant l'absorption intestinale et le captage cellulaire de la cystéine. En outre, l'augmentation du taux de GSH conduit à l'augmentation de l'activité de la GPx.

Chapitre VIII: Impact du chlorure d'aluminium sur l'histoarchitecture de certains organes: Effets protecteurs de la supplémentation en huile de nigelle et/ou en acide alpha lipoïque

1. Etude histologique du foie

L'administration du chlorure d'aluminium (34mg/kg PC) aux rats provoque des changements au niveau de l'histoarchitecture des hépatocytes (Figure 32) caractérisés par la présence d'infiltrat inflammatoire lymphoplasmocytaire, ectasie vasculaire et des fibroses. En revanche, la supplémentation en NS et/ou en AAL diminue ces modifications intracellulaires des hépatocytes. On note un infiltrat inflammatoire lymphoplasmocytaire discret avec une absence d'ectasie vasculaire et des fibroses chez les groupes $AlCl_3$ +AAL, $AlCl_3$ +AAL +NS et $AlCl_3$ +NS comparativement au groupe $AlCl_3$.

2. Etude histologique des reins

La présente étude (Figure 33) montre aussi une altération structurale des reins marquée par une infiltration leucocytaire et des ectasies vasculaires chez les rats traités par le chlorure d'aluminium comparativement aux témoins. Par contre, une protection partielle est observée chez les rats traités par la combinaison NS et/ou AAL plus $AlCl_3$.

3. Etude histologique du cœur

L'étude histologique du cœur montre des œdèmes et des ectasies vasculaires chez les rats traités par le chlorure d'aluminium. Le traitement des rats par la combinaison NS et/ou AAL + $AlCl_3$ entraîne une protection partielle des cellules altérées (Figure 34).

4. Etude histologique des testicules

Dans notre étude, nous avons noté la présence des œdèmes et des congestions vasculaires (Figure 35) au niveau des testicules des rats traités par le chlorure d'aluminium par rapport aux rats témoins. Le traitement des rats par la combinaison $AlCl_3$ + NS améliore l'aspect histologique des testicules, tandis que le traitement par la combinaison $AlCl_3$ +AAL+NS ainsi que par la combinaison $AlCl_3$ +AAL montre une protection partielle objectivée par la présence des œdèmes discrets chez les groupes $AlCl_3$ +AAL et $AlCl_3$ +AAL+ NS.

5. Etude histologique du cerveau

En ce qui concerne l'histologie du cerveau (Figure 36) l'administration du chlorure d'aluminium (34mg/kg PC) provoque des destructions cellulaires marquées par des congestions vasculaires et des œdèmes. Par ailleurs, l'histologie du cerveau des rats supplémenté en NS et/ou AAL est comparable à celle des rats normaux.

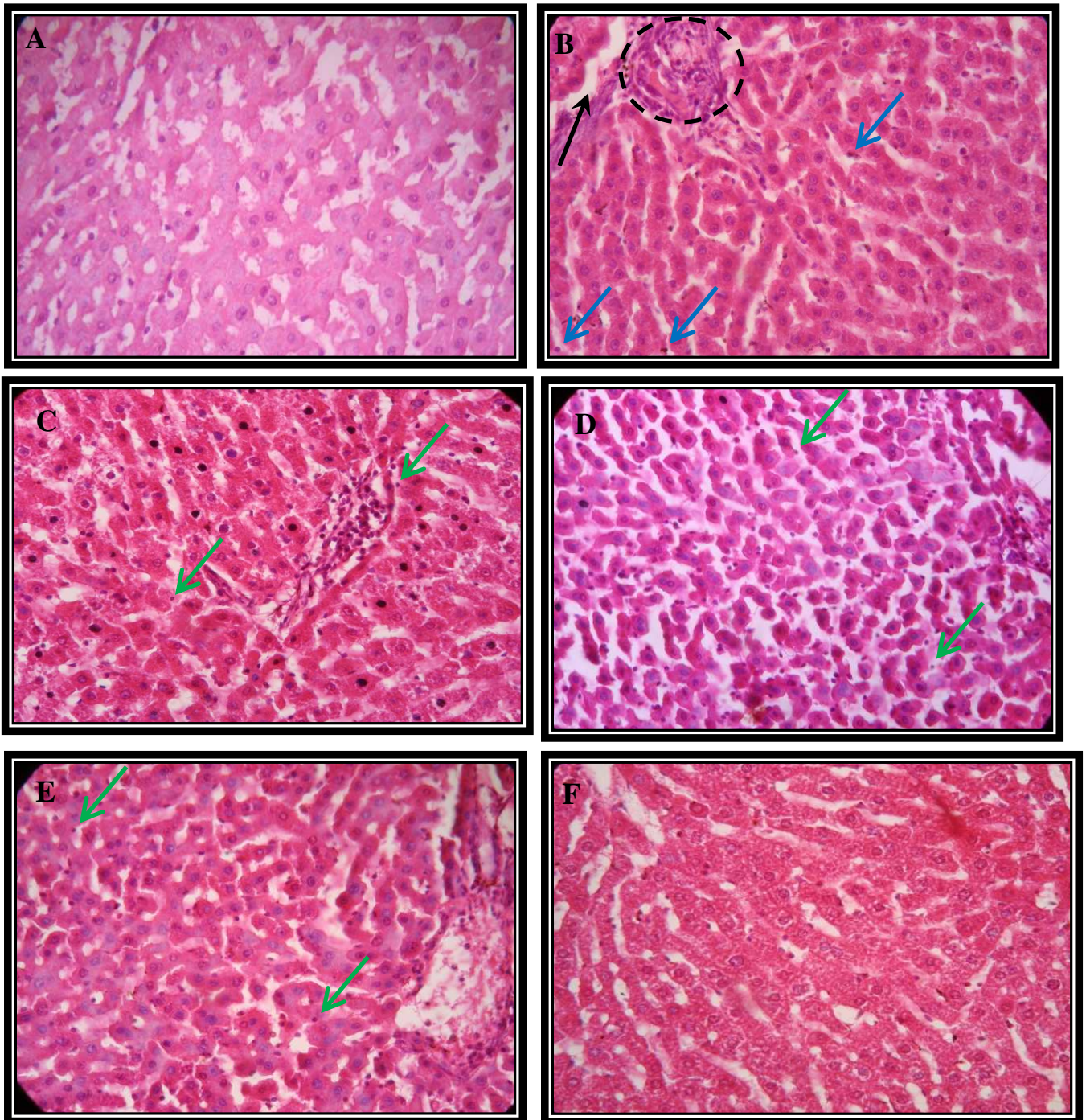


Figure 32: Coupes histologiques du foie (H E x400) : (A) rats témoins, (B) traités par $AlCl_3$, (C) traités par $AlCl_3$ +AAL, (D) traités par $AlCl_3$ +AAL+NS, (E) traités par $AlCl_3$ + NS, (F) traités par NS .

- Infiltra inflammatoires lymphoplasmocytaires
- Infiltra inflammatoires lymphoplasmocytaires discrets
- Fibroses
- Ectasie vasculaires

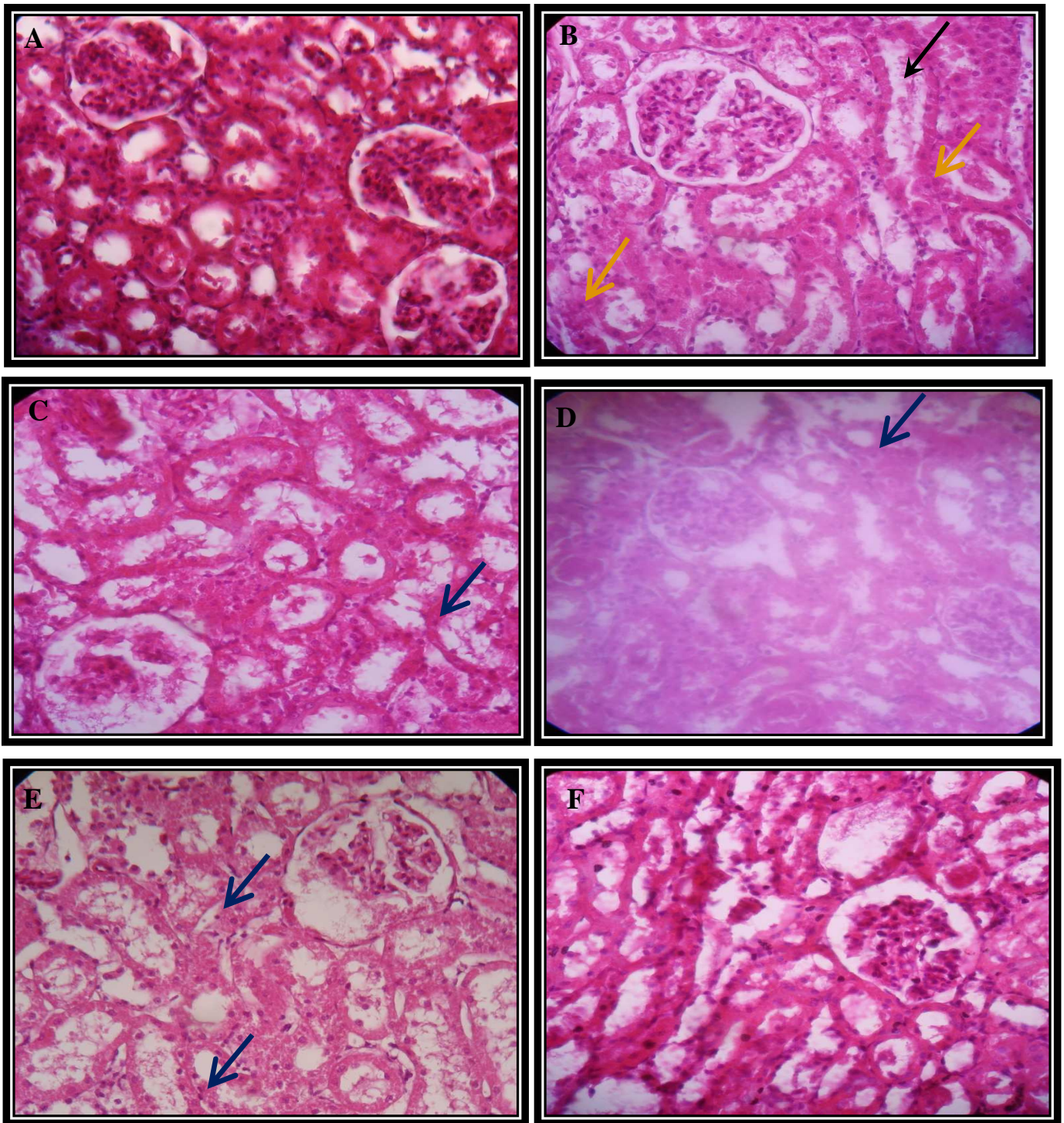





Figure 33: Coupes histologiques des reins (H E x400): (A) rats témoins, (B) traités par $AlCl_3$, (C) traités par $AlCl_3$ +AAL, (D) traités par $AlCl_3$ +AAL+NS, (E) traités par $AlCl_3$ + NS, (F) traités par NS.

-  Infiltration leucocytaire
-  Une légère infiltration leucocytaire
-  Ectasie vasculaires

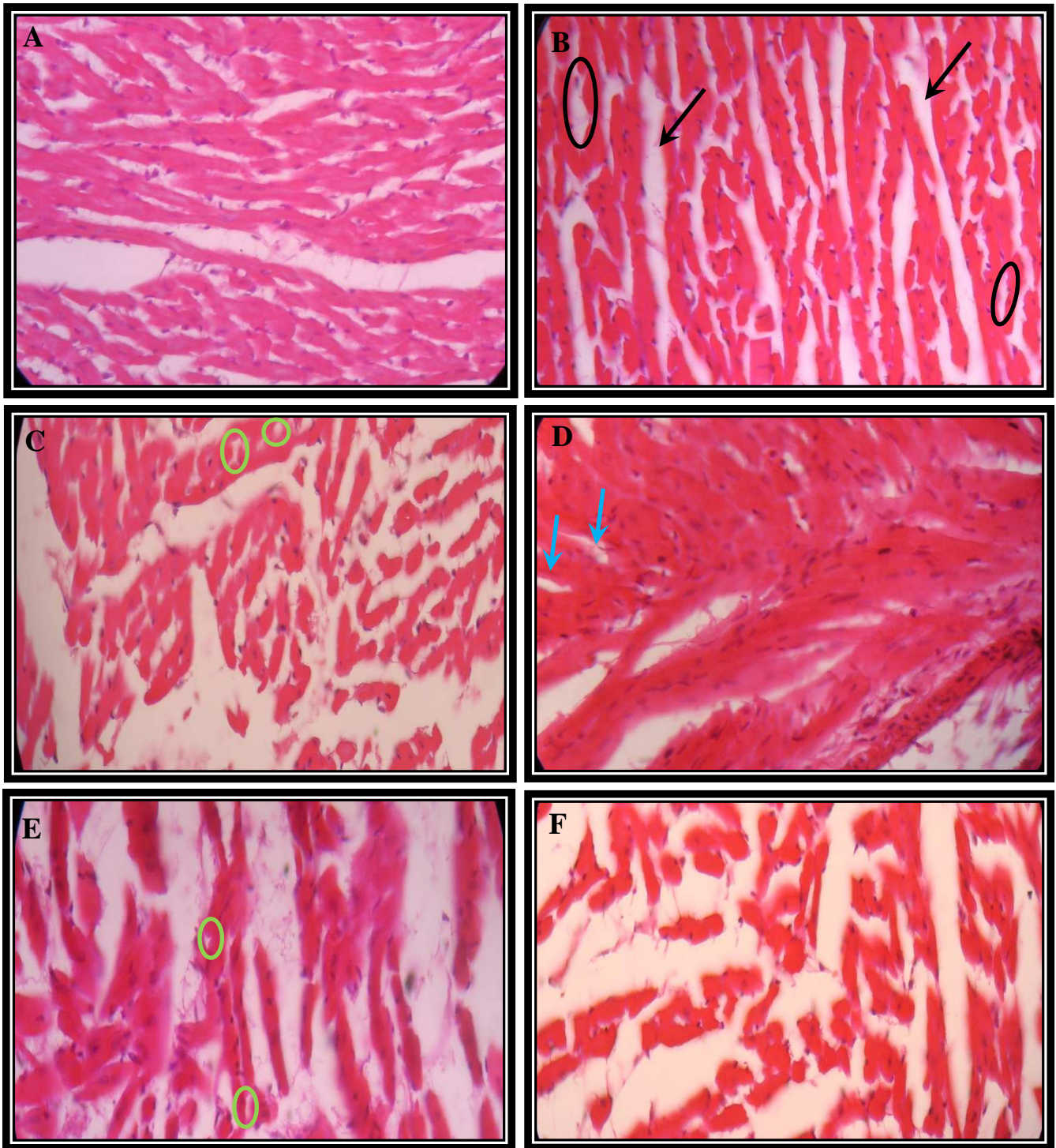






Figure 34: Coupes histologiques du cœur (H E x400): (A) rats témoins, (B) traités par $AlCl_3$, (C) traités par $AlCl_3$ +AAL, (D) traités par $AlCl_3$ +AAL+NS, (E) traités par $AlCl_3$ + NS, (F) traités par NS.

-  Œdèmes
-  Œdèmes discrètes
-  Ectasies vasculaires
-  Ectasies vasculaires discrètes

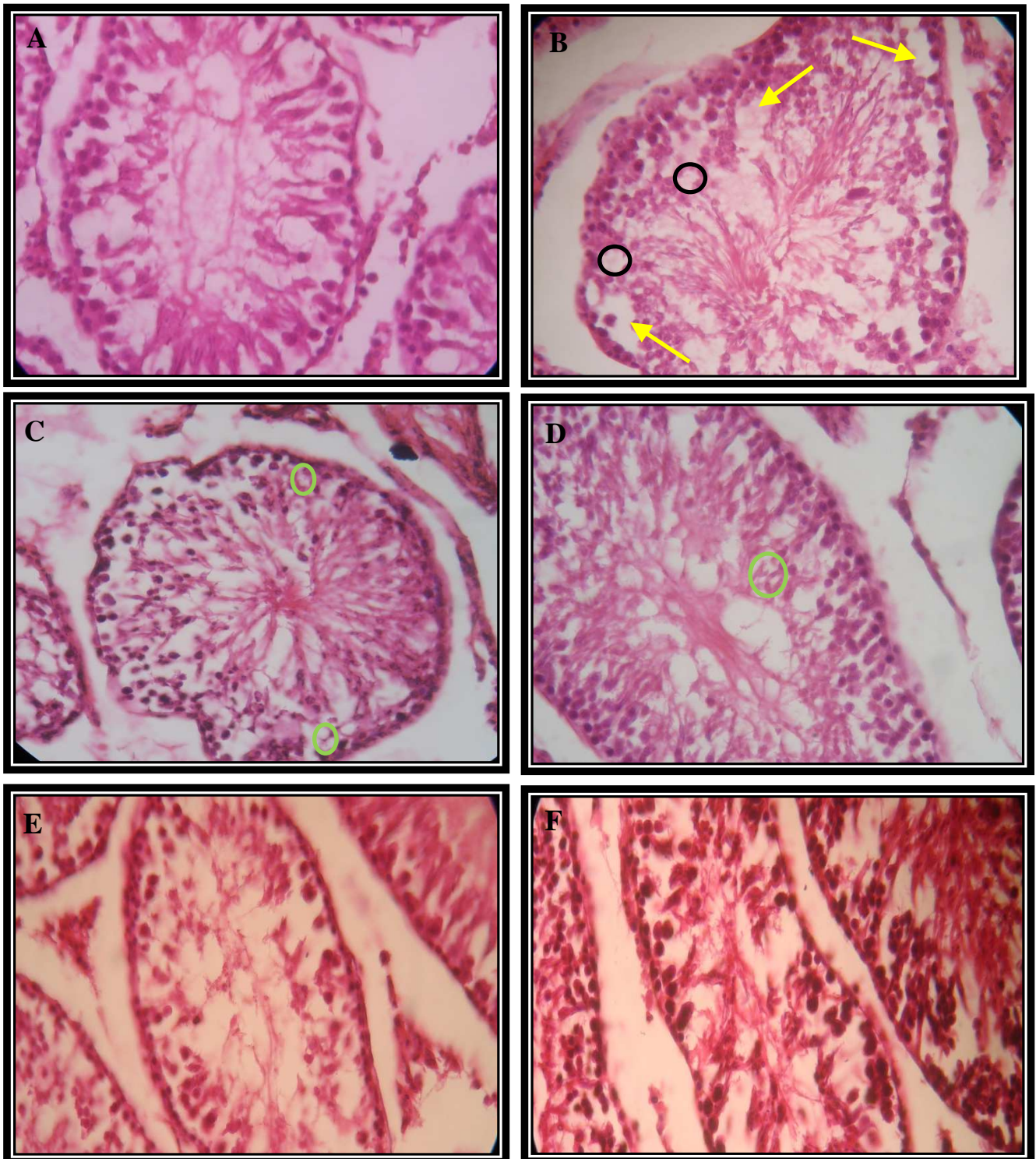





Figure 35: Coupes histologiques des testicules (H E x400): (A) rats témoins, (B) traités par $AlCl_3$, (C) traités par $AlCl_3$ +AAL, (D) traités par $AlCl_3$ +AAL+NS, (E) traités par $AlCl_3$ + NS, (F) traités par NS.

-  Œdèmes
-  Œdèmes discrètes
-  Congestion vasculaires

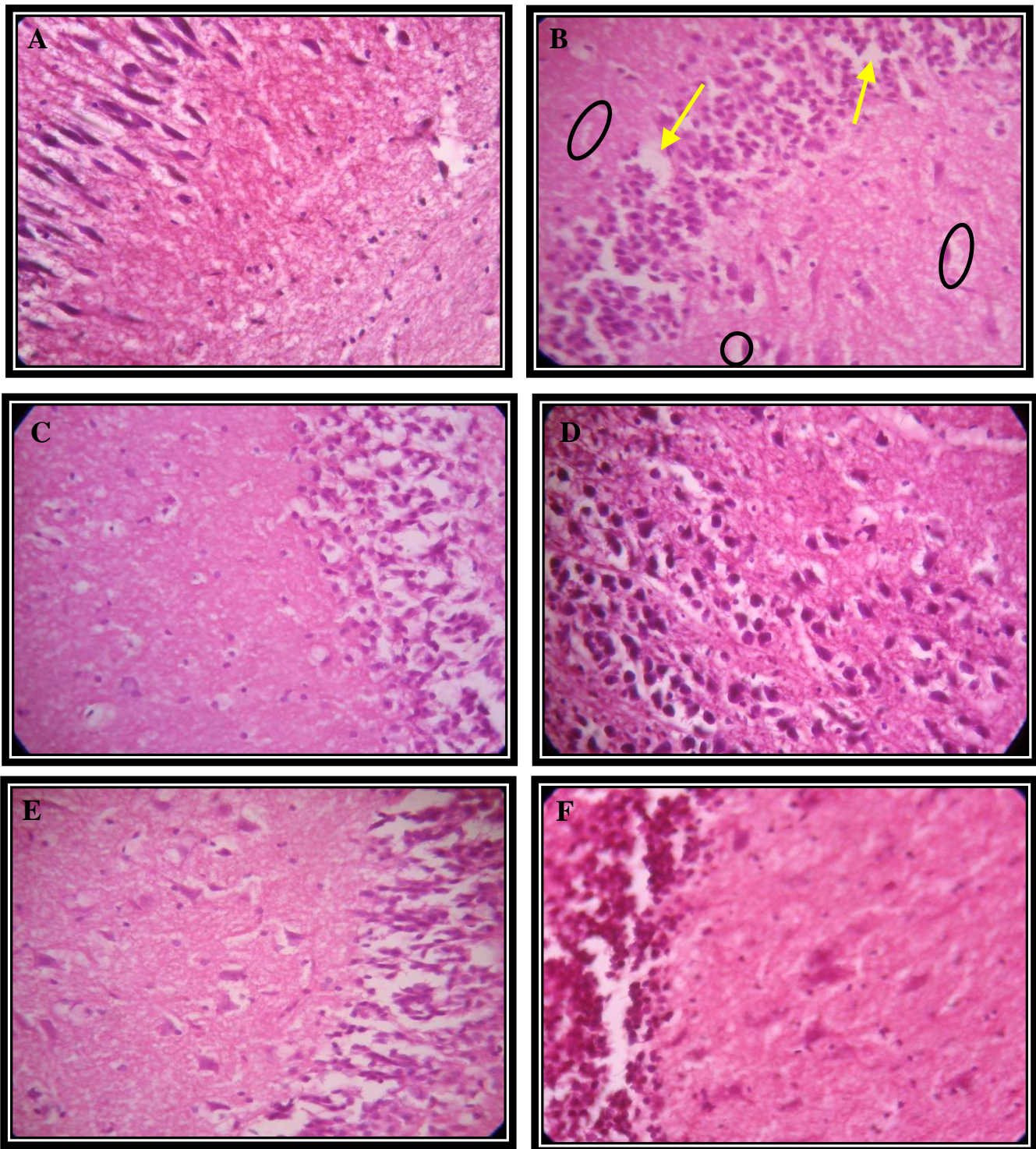


Figure 36: Coupes histologiques du cerveau (H E x400): (A) rats témoins, (B) traités par $AlCl_3$, (C) traités par $AlCl_3$ +AAL, (D) traités par $AlCl_3$ +AAL+NS, (E) traités par $AlCl_3$ + NS, (F) traités par NS.



Œdèmes



Congestion vasculaires

➤ Discussion

Les espèces réactives de l'oxygène accumulées dans le foie, les reins, le cœur, les testicules et le cerveau pourraient causer une cytotoxicité associée à une peroxydation des phospholipides membranaires. L'augmentation des taux cellulaires de la peroxydation lipidique, la déplétion du GSH et la diminution de l'activité des enzymes antioxydantes sont des facteurs responsables des lésions tissulaires importantes, ce qui confirme les observations histologiques enregistrés dans la présente étude (**Amudha et al., 2007; Li et al., 2013**). Les perturbations des paramètres biochimiques confirment aussi les données histologiques observées au niveau des organes étudiés des rats du lot AlCl₃ par rapport au lot témoin. Des études récentes, indiquent que l'exposition chronique aux métaux lourds (**Krishnan and Muthukrishnan, 2012; Messarah et al., 2012^a**) ainsi que aux polluants environnementaux notamment le chlorure d'aluminium (**Mahdy et Farrag, 2009; Shi-Liang et al., 2013**) peuvent engendrer des lésions tissulaires et des changements histologiques.

Dans notre étude, le traitement par l'aluminium à 34mg/kg de poids corporel pendant trois semaines révèle des changements histologiques caractérisés par la présence d'infiltrat inflammatoire lymphoplasmocytaire, des ectasies vasculaires, une infiltration leucocytaire et des fibroses au niveau du foie et des reins. En accord avec ces résultats, d'autres études ont montré que les xénobiotiques y'a compris l'aluminium exerce des effets hépatotoxiques (**Abdel-Zaher et al., 2008; Mahdy et Farrag, 2009**) et néphrotoxiques (**Yaman et Blikci, 2010; Shi-Liang et al., 2013**). On note aussi, la présence des œdèmes et des ectasies vasculaires au niveau du cœur ainsi que la présence des œdèmes et des congestions vasculaires au niveau des testicules et du cerveau. Des changements tissulaires similaires chez les rats ont été rapportés par des études précédentes (**Sethi et al., 2009; Yousef et Salama, 2009; Shrivastava, 2012**).

L'installation de ces changements histologiques au niveau des organes pourrait être due à l'effet toxique du chlorure d'aluminium qui touche les structures cellulaires. Les études de **Yousef et Salama, (2009); Shrivastava, (2012)**, ont rapporté que l'exposition aux sels d'aluminium génère des dommages oxydatifs au niveau cellulaire suite à l'augmentation de la peroxydation des lipides membranaires ce qui stimule l'apoptose.

En revanche, le traitement des rats par l'acide alpha lipoïque a légèrement préservé ces lésions tissulaires, ce qui peut être expliqué par son effet antioxydant cytoprotecteur au niveau des organes étudiés. L'effet protecteur de l'acide alpha lipoïque contre les lésions tissulaires a été démontré par d'autres études (**Neves *et al.*, 2004; Abdel-Zaher *et al.*, 2008; Winiarska *et al.*, 2008; Saad *et al.*, 2010**).

Du même, la nigelle a réduit le stress oxydant provoqué par le chlorure d'aluminium, permettant la diminution des altérations histologiques et la restauration de l'état physiologique normal de l'organisme. Ceci est le résultat de son effet réducteur vis-à-vis la peroxydation lipidique induite dans les organes étudiés. Il a été précédemment démontré, que l'administration orale de la nigelle restaure les dommages tissulaires chez les rats intoxiqués par le chlorure d'aluminium (**Mahdy et Farrag, 2009**), par le CCL₄ (**Keishnan et Muthukrishnan, 2012**) et par la gentamicine (**Yaman et Balikci, 2010**) ainsi que chez des rats et des souris soumise à d'autres facteurs oxydants (**Mahmoud *et al.*, 2002; Awadalla, 2012; Tayman *et al.*, 2013**).



CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Conclusions et perspectives

En conclusion, nos résultats montrent dans un premier temps que l'huile de nigelle possède des propriétés antioxydantes importantes. Ils montrent également que le traitement des rats par le chlorure d'aluminium à 34 mg/kg du poids corporel pendant trois semaines a provoqué des perturbations biochimiques et histopathologiques. En revanche, la supplémentation de l'huile de nigelle (2ml/kg de poids corporel) et/ou de l'acide alpha lipoïque (35 mg/kg de poids corporel) avec le chlorure d'aluminium améliore la plupart de ces perturbations. L'ensemble des résultats obtenus nous ont permis de tirer les conclusions suivantes:

➤ **L'administration du chlorure d'aluminium aux rats, a engendrée:**

- Des perturbations au niveau des paramètres physiologiques et hématologiques:
 - ✓ Diminution du poids corporel accompagnée d'une augmentation des poids relatifs des organes (foie, reins, cœur, testicule, cerveau) ;
 - ✓ Variation de la consommation quotidienne d'aliment et de l'eau de boisson ;
 - ✓ Diminution du nombre des globules rouges (GR), augmentation du nombre des globules blancs et diminution du taux d'hémoglobine et d'hématocrite témoignant une anémie microcytaire ;
 - ✓ Augmentation de la concentration du fer sérique ;
- Des perturbations de la concentration sérique des hormones thyroïdiennes et de la testostérone.
- Des perturbations au niveau de certains biomarqueurs de l'activité hépatique:
 - ✓ Augmentation de l'activité enzymatique ASAT, ALAT, PAL, LDH et CPK ;
 - ✓ Augmentation de la concentration plasmatique en bilirubine totale et directe ;
 - ✓ Une hyperglycémie ;
 - ✓ Diminution de la concentration plasmatique en albumine et en protéines totales ;

- Des perturbations au niveau des paramètres plasmatiques de la néphrotoxicité:
 - ✓ Augmentation de la concentration en urée, en créatinine et en acide urique ;
 - Une hypercholestérolémie accompagnée d'une hypertriglycéridémie avec diminution de la concentration plasmatique d'HDL.
 - Un état du stress oxydatif objectivé par:
 - ✓ Une forte peroxydation lipidique hépatique, rénale, cardiaque, testiculaire, cérébrale et érythrocytaire engendrant des lésions au niveau des membranes cellulaires ;
 - ✓ Diminution de la teneur en glutathion réduit et de l'activité des enzymes antioxydantes (GPx, CAT et SOD) ;
 - En ce qui concerne l'étude histologique nos résultats illustrent des atteintes remarquables au niveau des organes étudiés (foie, reins, cœur...).
- **La supplémentation en huile de nigelle et/ou en acide alpha lipoïque aux rats traités par le chlorure d'aluminium, a provoquée:**
- Une amélioration des paramètres physiologiques.
 - Une protection de l'érythropoïèse contre les perturbations hématologiques.
 - Une régulation partielle du taux sérique en hormones thyroïdiennes et en testostérone.
 - Une diminution du taux des biomarqueurs de toxicité à savoir : ASAT, ALAT, PAL, LDH et CPK.
 - Une réduction des concentrations plasmatiques en bilirubine totale et directe avec augmentation de la concentration plasmatique en albumine et en protéines totales.
 - Une diminution du taux plasmatique en urée, en créatinine et en acide urique.
 - Des effets hypoglycémiant et hypolipidémiant.
 - Une diminution considérable de la peroxydation lipidique au niveau des organes étudiés.
 - Modulation de l'activité des enzymes antioxydantes (GPx, CAT et SOD) ainsi que du taux de GSH.
 - Atténuation des effets cytotoxiques de l'aluminium sur l'histoarchitecture des organes étudiés.

En perspective, il serait intéressant de:

- Purifier et caractériser les principes actifs contenus dans l'huile de nigelle (*Nigella sativa*).
- Eclaircir le mécanisme d'action de l'huile de nigelle ainsi que de l'acide alpha lipoïque.
- Approfondir l'étude sur le système radicalaire et le statut antioxydant total (SAT) par le dosage d'autres paramètres du stress oxydatif (le rapport GSH/GSSG, les radicaux libres, les vitamines E et C, la thiorédoxine,.....).
- Dosage des hormones rénales impliquées dans l'hématopoïèse, à savoir l'érythropoïétine et la thrombopoïétine.
- Exploration des métallothionéines ainsi que les protéines du stress: les heat shock proteins (HSP).



RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Référence Bibliographique



Abbot B et al., Creatinine kinase. Kaplan A et al., 1984. Clin Chem The C.V Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton. 1, 112-116.

Abdel-Zaher A., Abdel-Hady R.H., Mahmoud M.M., Farrag M.M., 2008. The potential protective role of alpha-lipoic acid against acetaminophen-induced hepatic and renal damage. Toxicology. 243, 261-270.

Abreo K., Sella M., Hernandez X.A., Jain S., 2004. Antioxidants prevent aluminium induced toxicity in cultured hepatocytes. Inorganic Biochemistry. 98, 1129-1134.

Aebi H., 1974. Catalase in vitro. Methods of Enzymatic Analysis. 105, 673-884.

Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P., Lomri A., 2007. Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases rôle dans les maladies rhumatismales. Revue du Rhumatisme. 47, 636-643.

Ahmad A., Husain A., Mujeeb M., Alankhan S., Najmi A.K., Siddique N.A., Damanhoury A.Z., Anwar F., 2013. A review on therapeutic potential of

Nigella sativa: A miracle herb. Tropical Biomed. 3, 337-352.

Ait youssef M., 2006. Plantes médicinales de Kabylie. Ibis Press. Paris. PP: 228-230.

Al-Saleh I.A., Billedo G., EL-Doush I.I., 2006. Levels of selenium, DL- α -tocopherol, all-trans-retinol, thymoquinone and thymol in different brands of *Nigella sativa* seeds. J Food Composition and Analysis. 19, 167-175.

Altan M.F., Kanter M., Donmez S., Kartal M.E., Buyukbas S., 2007. Combination therapy of *Nigella sativa* and human parathyroid hormone on bone mass, biomechanical behavior and structure in streptozotocin-induced diabetic rats. Acta Histochemica. 109, 304-314.

Amudha G., Josephine A., Sudhahar V., Varalakshmi P., 2007. Protective effect of lipoic acid on oxidative damage in cyclosporine A-inducing renal toxicity. International Immunopharmacology. 7, 1442-1449.

Asada K., Takahashi M., Nagate M., 1974. Assay and inhibitors of spinach superoxide dismutase. Agric Biol Chem. 38, 471-473.

Asgary S., Ghnnadi A., Dashti G., Helalat A., Sahebkar A., Najafi S., 2013. *Nigella sativa* L. improves lipid profile and prevents atherosclerosis: Evidence from an experimental study on hypercholesterolemic rabbits. *J of Functional Foods.* 5, 228-234.

Aurousseau B., 2002. Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage: conséquences sur la reproduction la physiologie et la qualité de leurs produits. *Unité de Recherches sur les Herbivores.* 15, 67-82.

Awadalla E.A., 2012. Ameliorative effect of the curde oil of the *Nigella sativa* on oxidative stress induced in rat testes by cisplatin treatment. *Biomedicine and Preventive Nutrition.* 2, 265-268.



Beloued A., 1998. Plantes médicinales d'Algérie. Office des publications universitaires. Alger. PP: 144.

Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L., 2008. *Biochimie. Médecine Science Flammarion.* Paris. PP: 475-489.

Berthon G., 2002. Aluminium speciation in relation to aluminium bioavailability, metabolism and toxicity. *Coordination Chemistry Reviews.* 228, 319-341.

Blois M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature.* 26,1199–1200.

Borg J., Reeber A., 2008. *Biochimie métabolique.* Ellipses. Paris. PP: 46-47, 217-234.

Bounias M., 1999. *Traité de toxicologie générale (du niveau moléculaire à l'échelle planétaire).* Springer-verlag. France. PP: 511.

Bounnefont-Rousselt D., 2007. *Stress oxydant et vieillissement.* Slectra Biologie. 157, 23-26.

Bourgeois C., 2003. *Les vitamines dans les industries agroalimentaires.* TEC et DOC. Paris. PP: 155-157, 440.

Bourgou S., Ksouri R., Bellila A., Skandrami I., Falleh H., Marzouk B., 2008. Phenolic ccomposition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *Biologies.* 331, 48-55.

Bradford M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principale of protein binding. *Analales Biochimie.* 72, 248-254.

Buccolo, G. et al., 1973. Quantitive determination of serum triglycerides by use of enzymes. *Clin Chem.* 19 (5), 476-482.

Buege J.A., Aust S.D., 1984. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 105, 302-310.

Burtis A et al., 1999. *Tietz textbook of clinical chemistry.* 3rd Ed AACC.

Bustamante J., Lodge J.K., Marcocci L., Tritschler L.P., Rihm B.H., 1997. α -lipoic acid in liver metabolism and disease. *Free radical biology and medicine.* 24, 1023-1039.



Cakatay U., 2006. Pro-oxidant actions of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Med hypotheses.* 66, 110-117.

Cakatay U., Kayali R., Sivas A., Tekeli F., 2005. Prooxidant activities of alpha-lipoic acid on oxidative protein damage in the aging rat heart muscle. *Archives of Gerontology and Geriatrics.* 40, 231-240.

Campbell P.N., Smith A.D., 2006. *Biochimie illustrée.* Maloine. Paris. PP: 171.

Caylak E., Aytekin M., Halifeoglu I., 2008. Antioxidant effects of methionine, α -lipoic acid, N-acetylcysteine and homocysteine on lead-induced oxidative stress to erythrocytes in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology.* 60, 289-294.

Chappuis P., 1991. Les oligoéléments en médecine et biologie. Lavoisier TEC et DOC. Paris. PP: 625-639.

Cherroret G., Capolaghi B., Hutin M.F., Burnel D., Desor D., Leher P.R., 1995. Effects of postnatal aluminium exposure on biological parameters in rat plasma. *Toxicology Letters.* 78, 119-125.

Chiarugi P., Fiaschi T., 2007. Redox signaling in anchorage-dependent cell growth. *Cellular Signalling.* 19, 672-682.

Cho K.J., Moini H., Shon H.K., Chung A.S., Packer L., 2003. Alpha-lipoic acid decreases thiol reactivity of the insulin receptor and protein tyrosine phosphatase 1B in 3T3-L1 adipocytes. *Biochimie Pharmacology.* 66, 849-858.



Delattre J., Durand G., Jardillier J.C., 2003. *Biochimie pathologique: aspects moléculaire et cellulaire.* Medicine Science Flammarion. Paris. PP: 59-81.

Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Vidal N., Lesgarads J.F., Stocker P., 2007. Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *Europeine Food Technol.* 244, 801-809.

Dodge J.T., Mitchell C., Hananan D.J., 1963. The preparation and chemical characteristics of haemoglobin free ghosts of human erythrocytes. *Archives of Biochemie Biophysique*. 100, 119-130.

Doumas B.T., 1971. *Clin Chim. Acta*. 31: 87-96.

Dorey S.J., 2008. Aluminium poisoning. *Chemistry Reviews*. 18, 1-4.

Durand G., Beaudeau J.L., 2008. *Biochimie médicale: Marqueurs actuels et perspectives*. Lavoisier. Paris. PP: 175-187.



El-Bahai M.N., AL-Hariri M.T., Yar T., Bamosa A.O., 2009. Cardiac inotropic and hypertrophic effects of *Nigella sativa* supplementation in rats. *International Journal of Cardiology*. 131, 115-117.

El-Beshbishy H.A., Aly H.A.A., El-Shafey M., 2012. Lipoic acid mitigates bisphenol A-induced testicular mitochondrial toxicity in rats. *Toxicology and Industrial Health*. 29, 875-887.

El-Beshbishy H.A., Mariah R.A., Al-Azhary N., Aly H.A.A., Ozbak H.A., Baghdadi H.H., 2014. Influence of lipoic acid on testicular toxicity induced by bi-n-butyl phthalate in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 71, 26-32.

El-Demerdash F.M., 2004. Antioxidant effect of vitamin E and selenium on lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters in rats exposed to aluminium. *Trace Elements in Medicine and Biology*. 18, 113-121.

Ellman G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemie Biophysique*. 82, 70-77.

Erkan N., Ayranci G., Ayranci E., 2008. Antioxydant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, black seed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*. 110, 76-82.



Farina M., Ratta L.N., Soares F.A.A., Jardim F., Jacques R., Souza D.O., Rocha JBT., 2005. Haematological changes in rats chronically exposed to oral aluminium. *Toxicology*. 209, 29-37.

Favier A., 2003. Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité Chimique*. 24, 108-115.



Fawcett J.K. et al., 1960. J Clin Path. 13, 156-169.

Ferdinand P.S., 2006. Guide des plantes médicinales, analyse, description et utilisation de 400 plantes. De Lachaux et Nestlé. Paris. PP: 245.

Flohe L., Gunzler W.A., 1984. Analysis of glutathione peroxidase. Methods Enzymol. 105, 114-121.

Flora S.J.S., Mehta A., Satsangi K., Kannan G.M., Gupta M., 2003. Aluminium induced oxidative stress in rat brain: response to combined administration of citric acid and HEDTA. Comparative Biochemistry and Physiology Part. 134, 319-328.

Fontaine E., Barnod D., Schwebel C., Leverve X., 2002. Place des anti-oxydants dans la nutrition du patient septique. Elsevier. 11, 411-420.

Fossati P. et al., 1980. Clin Chem. 26, 227-231.

Fossati P. et al., 1982. Clin Chem. 28(10), 2077-2080.

Fournier P., Pett J.M., 1999. Le livre des plantes médicinales et vénéneuses de France tome III. Connaissance et mémoires européennes. France. PP: 97-99.

Fxley C., 2003. The pro-oxidant activity of aluminium. Free Radical Biology & Medicine. 36, 380-387.

Gali-Muhtasib H., El-najjar N.,

Sechneider-stock R., 2006. The medicinal potential of black seed (*Nigella sativa*) and its components. Lead Molecules from Natural Products. 2, 133-153.

Gendler S., Uric acid. Kaplan, A., 1984. Clin Chem the C.V Mosby co. St Louis. Toronto. Princeton. 1268-1273, 425.

Gerhardt W et al., 1979. Creatine kinase B-Subunit activity in serum after immunohinhibition of M-Subunit activity. Clin Chem. (25/7). 1274-1280.

Ghibu S., Richard C., Delemasure S., Vergely C., Mogosan C., Muresan A., 2008. An endogenous dithiol with antioxidant properties: Alpha-lipoic acid, potential uses in cardiovascular diseases. Annales de Cardiologie et d'Angéiologie. 57, 161-165.

González M.A., Bernal C.A., Mahieu S., Carrillo M.C., 2009. The interaction between the cronic exposure to aluminium and liver regeneration on bile flow and organic anion transport in rats. Biological Trace Element Research. 127, 164-176.

González M.A., Roma M., Bernal C., Alvarez M.L., Carrillo M.C., 2007. Involvement of oxidative stress in the impairment in biliary secretory function induced by chronic administration of aluminium to rats. *Biological Trace Element Research*. 116, 329-348.

Gourier-fréry C., Fréry N., 2004. Aluminium. *EMC-toxicologie pathologie*. 1, 79-95.

Gradés-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z., Jore D., 2003. Espèces réactives de l'oxygène. *Actualité Chimique*. 31, 91-95.

Graille J., 2003. Lipides et corps gras alimentaires. *Lavoisier TEC et DOC*. Paris. PP: 151-164, 382-391.

Grove T.H., 1979. Effect of reagent pH on determination of HDL cholesterol by precipitation with sodium phosphotungstate-magnesium. *Clin Chem*. 25, 560.

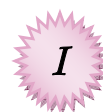
Guo C., Hsu G.W., Chuang C., Chen P., 2009. Aluminium accumulation induced testicular oxidative stress and altered selenium metabolism in mice. *Environmental Toxicology Pharmacology*. 27, 176-181.



Horn F., Lindenmeier G., Moc I., Grillhosi C., Berghald S., Schneider N., Munster B., 2005. *Biochimie humaine*. Flammarion. Paris. PP: 8-13, 206, 454-455, 481-484.

Hosseinzadeh H., Parvardeh S., Asl M.N., Sadeghnia H.R., Ziace T., 2007. Effect of thymoquinone and *Nigella sativa* seeds oil on lipid peroxidation level during global cerebral ischemia-reperfusion injury in rat hippocampus. *Phytomedicine*. 14, 621-627.

Hould R., 1984. Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. *ED Maloine*. 19-21, 225-7.



Ilhan A., Gurel A., Armutcu F., Kamisli S., Iraz M., 2005. Antiepileptogenic and antioxidant effects of *Nigella sativa* oil against pentylenetetrazol induced kindling in mice. *Neuropharmacology*. 49, 456-464.

Iserin P., 2001. La rousse des plantes médicinales, identification, préparation, soins. *Larousse*. Paris. PP: 239.

Ismail M., Al-Naqeeq G., Weichan K., 2010. *Nigella sativa* thymoquinone rich fraction greatly improves plasma antioxidant capacity and expression of antioxidant genes in hypercholesterolemic rats. *Free Radical Biology & Medicine*. 48, 664-672.

Itano M.M.D., 1978. Cap serum iron survey. 70, 516-522.



Jollow D.J., Mitchel J.R., Zamppaglione Z., Gillette J.R., 1974. Bromobenzene induced liver necrosis. Protective role of glutathione and evidence for 3,4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolites. *Pharmacology*. 11, 51-57.

Julkunen-Tiitto R., 1985. Phenolics constituents in the leaves of northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics. *J. Agric Food Chem*. 33, 213-217.



Kaplan A., 1984. Urea. Kaplan A et al. *Clin Chem*. The C.V Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton; 1257-1260.

Kaplan A. et al., 1984. Tryglycerids. *Clin Chem* the C.V Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton. 437 and lipids. 1194-1206.

Kaplan L.A., 1984. Glucose. Kaplan A et al. *Clin chem*. The C.V Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton. 1032-1036.

Kaplan A et al., 1984. Bilirubin. *Clin Chem*. The C.V Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton. 1238-1241.

Kintz P., 1998. Toxicologie et pharmacologie médicolégaes. Bio Elsevier. France. PP: 218-220.

Kocchilin-Ramonatxo C., 2006. Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition Clinique et Métabolique*. 20,165-177.

Kohen R., Nyska A., 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicology Pathology*. 30, 620-650.

Koizumi M.H., Fujii S., Ono A., Hirose A., Imai T., Ogawa K., Ema M., Nishikawa A., 2010. Two generation reproductive toxicity study of aluminium sulfate in rats. *Reproductive Toxicology*. 31, 219-230.

Koji A., Masahiko W., Toshio N., 2008. Regulation of Neuronal Glutathione Synthesis. *Pharmacology Science*. 108, 227-238.

Kokdil G., Tamer L., Ercan B., Ilcim A., Aras N., Atik U., 2005. Effects of *Nigella unguicularis* fixed oil on blood biochemistry and oxidant/antioxidant balance in rats. *Ethnopharmacology*. 99, 131-135.

Kokilavani V., Devi M.A., Sivarajan K., Panneerselvan C., 2005. Combined efficacies of DL- α -lipoic acid and meso 2,3 dimercaptosuccinic acid against arsenic induced toxicity in antioxidant systems of rats. *Toxicology Letters*. 160, 1-7.

Koller A., 1984. Total serum protein. *Clin chem the C .V Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton*. 1316-1324.

Krid A., 2008. Modélisation de nouvelles molécules biologiques actives liées au stress oxydant. Mémoire. Université Constantine. Algérie. PP: 10-15.

Krishnaiah D., Sarbatly R., Nithyanandam R., 2010. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*. 175, 1-17.

Krishnan N., Muthukrishnan S., 2012. Effect of *Nigella sativa* seed extract on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. *Acute Medicine*. 2, 107-113.

Kumar V., Bal A., Gill K., 2009. Susceptibility of mitochondrial superoxide dismutase to aluminium induced oxidative damage. *Toxicology*. 255, 117-123.

Kunt T., Forst T., Wilhem A., Tritschler H., Pfuetzner A., Harzer O., 1999. Alpha-lipoic acid reduces expression of vascular cell adhesion molecule 1 and endothelial adhesion of human monocytes after stimulation with

advanced glycation end products. *Clin Science*. 96, 75-82.



Larwerys R., Lison D., 2007. Toxicologie industrielle et intoxication professionnelles. Elsevier Mason. Belgique. PP: 127-138.

Leonard S.S., Harris G.K., Shi X., 2004. Metal induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine*. 37, 1921-1942.

Levin R.L., 2002. Carbonyl modified proteins in cellular regulation: aging and disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 82, 790-796.

Li Y., Liu Y.Z., Shi J.M., Jia S.B., 2013. Alpha lipoic acid protects lens from H₂O₂ induced cataract by inhibiting apoptosis of lens epithelial cells and inducing activation of anti-oxidative enzymes. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 6, 548-551.

Linares F.O., 2005. La nigelle une épices d'intérêt médicinal. Thèse. Université Joseph Fourier faculté de pharmacie. Grenoble. PP: 4-40.

Luis A., Del Rio F., Javier Corpas J.B., 2004. Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry*. 65, 783-792

Lukyanenko LM., Skarabhatava AS., Slobozhanina EI., Kovaliova SA., Falcioni ML., 2013. In vitro effect of AlCl₃ on human erythrocytes: changes in membrane morphology and functionality. *J Trace Elements in Medicine and Biology.* 27, 160-167.



Macardle W.D., Katch F.I., Katch V.L., 2004. Nutrition et performances sportives. De Boeck et larcier. Bruxelles. PP: 59-61, 69, 192-195.

Mahdy K.A., Farrag A.R.H., 2009. Amelioration of aluminium toxicity with black seed supplement on rats. *Toxicological and Environmental Chemistry.* 91, 567-579.

Mahieu S., Contini M.D.C., González M., Millen N., 2009. Melatonin reduces oxidative damage induced by aluminium in rat kidney. *Toxicology Letters.* 190, 9-15.

Mahieu S., Cotini M.D.C., Gonzalez M., Millen N., Elias M.M., 2000. Aluminium toxicity hematological effects. *Toxicologie Letters.* 111, 235-242.

Mahieu S., Millen N., González M., Contini M.D.C., Elias M.M., 2005. Alteration of the renal function and oxidative stress in renal tissue from rats chronically treated with

aluminium during the initial phase of hepatic regeneration. *J of Inorganic Biochemistry.* 99, 1858-1864.

Mahmoud M.R., El-Abhar H.S., Salech S., 2002. The effect of *Nigella sativa* oil against the liver damage induced by *Schistosoma mansoni* infection in mice. *Ethnopharmacology.* 79, 1-11.

Mailloux R.J., Lemire J., Appanna V.D., 2011. Hepatic response to aluminium toxicity: dyslipidemia and liver diseases. *Experimental cell research.* 317, 2231-2238.

Malarkodi K.P., Sivaprasad R., Varalakshmi P., 2004. Effect of lipoic acid on the oxidoreductive status of red blood cells in rats subject to oxidative stress by chronic administration of adriamycin. *Human and Experimental Toxicology.* 23, 129-135.

Malarkodi K.P., Varalakshmi P., 2003. Lipoic acid as rescue agent for adriamycin-induced hyperlipidemic nephropathy in rats. *Nutrition Research.* 23, 539-548.

Malloy H.T., 1937. The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. *J. Biol Chem.* 112, 2: 481-491.

Marieb E.N., 2008. Biologie humaine: Principes d'anatomie et de physiologie. Nouveaux Horizons. Canada. PP: 25-42.

Mariod A.A., Ibrahim R.M., Ismail M., Ismail N., 2009. Antioxidant activity and phenolic content of phenolic rich fraction obtained from black cumin (*Nigella sativa*) seedcake. Food Chemistry. 116, 306-312.

Martini M.C., Seiller S., 2006. Actifs et additifs en cosmétologie. Lavoisier TEC et DOC. Paris. PP: 400-430, 830.

Masson O., 2007. Biochimie: Bases biochimique de la diététique. TEC et DOC. Paris. PP: 285-289, 101-105, 216-218.

Meddah B., Ducroc R., Faouzi M.A., Eto B., Mahraoui L., Andaloussi A.B., Maeruneau L.C., Cherrah Y., Haddad L., 2009. *Nigella sativa* inhibits intestinal glucose absorption and improves glucose tolerance in rats. J of Ethnopharmacology. 121, 419-424.

Meiattini F et al. 1978. The 4hydroxybenzoate/4aminophenazone chromogenic system. Clin Chem. 24(12), 2161-2165.

Messarrah M., Amamra W., Boumendjel A., Barket L., Bouasla I., Abdennour C., Boulakoud MS., El-Feki A., 2012^b. Ameliorating effects of curcumin and vitamin E on diazinon-induced oxidative damage in rat liver and erythrocytes. Toxicology and Industrial Health. 29: 1-12.

Messarrah M., Boumendjel A., Couabia A., Klibet F., Abdennour C., Boulakoud MS., EL Feki A., 2010. Influence of thyroïde dysfunction on liver lipid peroxydation and antioxidant status in experimental rats. Experimental and Toxicologic Pathology. 62, 301-3010.

Messarrah M., Klibet F., Boumendjel A., Abdennour C., Bouzerna N., Boulakoud MS., El Feki A., 2012^a. Hepatoprotective role and antioxidant capacity of selenium on arsenic-induced liver injury in rats. Experimental and Toxicologic Pathology.64, 167-174.

Messarrah M., Saoudi M., Boumendjel A., Boulakoud MS., El Feki A., 2011. Oxidative stress induced by thyroid dysfunction in rat erythrocytes and heart. Environmental Toxicology and Pharmacology. 31, 33-41

Meziti A., 2009. Activité antioxydante des extraits des grains de *Nigella sativa L*, étude in vitro et in vivo. Thèse. PP: 37-48.

Mohamadin A.M., Sheikh B., A.E.A., Elberry A.A., Al-Abbasi F.A., 2010. Protective effects of *Nigella sativa* oil on propoxur induced toxicity. Pesticide Biochemistry and Physiology. 98, 128-134.

Moini H., Packer L., Saris N.E., 2002. Antioxidant and prooxidant activities of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. Toxicology Pharmacology. 182, 84-90.

Moraes T.B., Zanin F., Rosa A.D., Oliveira A.D., Coelho J., Petrillo F., Wajner M., Dutrafilho C.S., 2010. Lipoic acid prevents oxidative stress in vitro and in vivo by an acute hyperphenylalaninemia chemically-induced in rat brain. *Neurological Sciences.* 292, 89-95.

Moussard C., 2006. *Biochimie structurale et métabolique.* De Boeck et Larcier. Paris. PP: 335-341.

Murray R., 1984. Alanine aminotransferase. *Clin chem.* The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton. 1088-1090.

Murray R., 1984. Aspartate aminotransferase. Kaplan A et al. *Clin chem* The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton. 1112-1116.

Murray R.L., 1984. Creatinine. Kaplan A et al. *Clin chem.* The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton. 1261-1266, 418.



Naito H.K., High-density lipoprotein (HDL) Cholesterol. Kaplan A et al., 1984. *Clin Chem* the C.V Mosby co. St Louis. Toronto. Princeton. 1207-1213, 437.

Naito H.K., Cholesterol. Kaplan A et al., 1984. *Clin Chem* the C.V Mosby co. St Louis. Toronto. Princeton. 1194-11206, 437.

Navari-Izzo F., Quartacci M.F., Sgherri C., 2002. Lipoic acid: A unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. *Plant Physiology and Biochemistry.* 40, 463-470.

Nehru B., Anand P., 2005. Oxidative damage following chronic aluminium exposure in adult and pup rat brains. *Trace Elements Medicine and Biology.* 19, 203-208.

Neves R.N., Carvalho F., Carvalho M., Rernandes E., Soares E., Bastos M.L., Perira M.L., 2004. Protective activity of hesperidin and lipoic acid against sodium arsenite acute toxicity in mice. *Toxicology Pathology.* 32, 527-535.

Newairy A.A., Salama A.F., Hussien H.M., Yousef M.I., 2009. Propolis alleviates aluminium induced lipid peroxidation and biochemical parameters in male rats. *Food and Chemical Toxicology.* 47, 1093-1098.

Norman A.W., 1997. *Thyroid hormones.* Academic Press. New York. PP: 180-181



Orihuela D., 2009. Inhibitory effect of aluminium on calcium adsorption in small intestine of rats with different thyroid hormone status. *J of Inorganic Biochemistry.* 103, 1542-1547.

Ozkan Y., Yilmaz O., Ozturk A.I., Ersan Y., 2005. Effects of triple antioxidant combination (Vitamine E, vitamin C and α -lipoic acid) with insulin on lipid and cholesterol levels and fatty acid composition of brain tissue in experimental diabetic and non-diabetic rats. *Cell Biology International*. 29, 754-760.



Perrotta G., Iron and iron-binding capacity. Kaplan A et al., 1984. *Clin Chem the C.V Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton.* 1063-1065.

Pesce A., Lactate dehydrogenase. Kaplan A et al., 1984. *Clin Chem the C.V Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton.* 1124-117, 438.

Pincemail J., Defraigne J.O., 2004. Les antioxydants: un vaste réseau de défenses pour lutter contre les effets toxiques de l'oxygène. *Université de Liège. Belgique.* 40, 1-2

Pincemail J., Lecont J., Collart E., Castiaux J.P., Defraigne J.O., 2001. Stress oxydant, antioxydants et exercice physique. *Medecine Interne.* 6, 1-3.

Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne J.O., 2002. Mécanisme physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition et métabolisme.* 16, 233-239.

Poortmans J.R., Boisseau N., 2003. *Biochimie des activités physiques.* De Boeck Université. Bruxelles. PP: 411-420.

Popovici C., Saykova I., Tylkowski B., 2009. Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel.* 4, 25-39.

Prahalathan C., Selvakumar E., Varalakshmi P., 2006. Modulatory rol of lipoic acid on adriamycin-induced testicular injury. *Chemico-Biological Interactions.* 160, 108-114.

Prakash A., Kumar A., 2009. Effect of N-acetyl cystein against aluminium induced cognitive dysfunction and oxidative damage in rats. *Basic & Clinical Pharmacology Toxicology.* 105, 98-104.



Rosalki S et al., 1993. *Clin Chem.* 39/4: 648-652.

Rodkey F.L., 1965. *Clin Chem.* 11, 478-487.



Saad E.I., El-Gowilly S.M., Sherhaa M.O., Bistawroos A.E., 2010. Role of oxidative stress and nitric oxide in the protective effects of α -lipoic acid and aminoguanidine against isoniazid-rifampicin-induced hepatotoxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 48, 1869-1875.

Sahin M., Sagdiç G., Elmas O., Akpinar D., Derin N., Aslam M., Agar A., Aliciguzel Y., Yargicoglu P., 2006. Effect of chronic restraint stress and alpha-lipoic acid on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in rat peripheral organs. *Pharmacological Research*. 54, 247-252.

Salem M.L., 2005. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *International Immunopharmacology*. 5, 1749-1770.

Schultz A. Uric acid. Kaplan, A. et al., 1984. *Clin Chem the C.V Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton*. 1261-1266, 418.

Servais S., 2004. Altération mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone: effets de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3. Thèse. Université de Lyon. France. PP: 19-35.

Sethi P., Jyoti A., Hussain E., Sharma D., 2009. Curcumin attenuates aluminium-induced functional neurotoxicity in rats.

Pharmacology, Biochemistry and Behavior. 93, 31-39.

Shabana A., El-Menyar A., Asim M., Al-Azzeh H., Al-Thani H., 2012. Cardiovascular benefits of black cumin (*Nigella sativa*). *Cardiovascular Toxicology*. 18, 3-7.

Shanmugarajan T.S., Sivaraman D., Somasundaram I., Arunsundar M., Krishnakumar E., Balaji R., Ravichandiran V., 2008. Influence of alpha lipoic acid on antioxidant status in D-galactosamine induced hepatic injury. *Toxicology and Industrial Health*. 24, 635-642.

Sharma P, Shah Z.A., Kumar A., Islam F., Mishra K.P., 2007. Role of combined administration of Tiron and glutathione against aluminium-induced oxidative stress in rat brain. *J of Trace Elements in Medicine and Biology*. 21, 63-70.

Shay K.P., Mareau R.F., Smith E.J., Smith A.R., Hagen T.M., 2009. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1790, 1149-1160.

Shila S., Kokilavani V., Subathra M., Panneerselvam C., 2005. Brain regional responses in antioxidant system to α -lipoic acid in arsenic intoxicated rat. *Toxicology*. 210, 25-36.

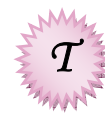
Shi-liang X., Miao L., Bing S., Chong-sheng B., Ji-hong Z., Yan-fei L., 2013. Effects of sub-chronic aluminium exposure on renal pathologic structure in rats. *J of Northeast Agricultural University*. 20, 49-52.

Shrivastava S., 2012. Combined effect of HEDTA and selenium against aluminium induced oxidative stress in rat brain. *J of trace Elements in Medicine and Biology*. 26, 210-214.

Soares A.F., 2005. Effets du stress oxydant sur le fonctionnement des adipocytes: adiponectine et prostaglandines. Thèse. Laboratoire de physiologie des lipides et des membranes de l'INSA. PP: 35-40.

Sung M.J., Kim W., Ahn S.Y., Cho C.h., Koh G.Y., Moon S.O., 2005. Protective effect of alpha lipoic acid in lipopolysaccharid induced endothelial fract alkine expression. *Cric Res*. 97, 880-890.

Sutherland J.E., Greger J.L., 1998. Kinetics of aluminium disposition after ingestion of low to moderate pharmacological doses of aluminium. *Toxicology*. 126, 115-125.



Tabacco A. et al., 1979. *Clin Chem*. 25, 336-337.

Tayman C., Cekmez F., Kafa I.M., Canpolat F.E., Cetinkaya M., Tonbul A., Uysal S., Tunc T., Sarici U., 2013. Protective effects of *Nigella sativa* Oil in hyperoxia-induced lung injury. *Archivos de Bronconeumologia*. 49, 15-21.

Townsend D.M., Tew K.D., Tapiero H., 2003. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 57, 145–155

Trinder P. 1969. *Ann. Clin. biochem*. 6, 24-33.



Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T. D., Mazur M., Telser J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Biocell*. 39, 44-84.

Vargel C., 1999. Corrossion de l'aluminium. DUNOD. Paris. PP: 14-15.

Viala A., Botta A., 2005. *Toxicologie. TEC et DOC*. Paris. PP: 624.

Wazeliene D., Jansen E., Rodovicius H., Kasauskas A., Ivanov L., 2011. Protective effect of selenium on aluminium induced oxidative stress in mouse liver in vivo. *Environmental Toxicology Pharmacology*. 31, 302-306.

Wet D., Voet J.G., 2005. *Biochimie. De boeck*. Bruxelles. PP: 463-465.



Webster D., 1974. *Clin Chem. Acta*. 53, 109-115.

Wenger C. et al., Alkalin phosphatase. Kaplan, A et al., 1984. *Clin Chem the C.V Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton*. 1094-1098.

Wichtl M., Anton R., 2003. *Plantes thérapeutiques tradition pratique officinale, science et thérapeutique. TEC et DOC EM inter. Paris*. PP: 416-417.

Winiarska K., Malinska D., Szymanski K., Dudziak M., Bryle J., 2008. Lipoic acid ameliorates oxidative stress and renal injury in alloxan diabetic rabbits. *Biochimie*. 90, 450-459.

Wolfe K., Wu X., Liu R.H., 2003. Antioxidant activity of apple peels. *J Agric Food Chem*. 51, 609–614.

Wu Z., Du Y., Xue H., Wu Y., Zhou B., 2012. Aluminium induces neurodegeneration and its toxicity arises from increased iron accumulation and reactive oxygen species (ROS) production. *Neurobiology of Aging*. 33, 1-12.



Yaman I., Balikci E., 2010. Protective effects of *Nigella sativa* against gentamicin induced nephrotoxicity in rats. *Experimental and Toxicologic Phathology*. 62, 183-190.

Yen G.C., Chen H.Y., 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J Agric Food Chem*. 43, 27–32.

Yi X., Nিকেleit V., James L.R., Maeda N., 2011. α -lipoic acid protects diabetic apolipoprotein E-deficient mice from nephropathy. *Diabetes and its Complications*. 25, 193-201.

Yousef M.I., Salama A., 2009. Propolis protection from reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats. *Food and Chemical Toxicology*. 47, 1168-1175.

Yousef M.I., 2004. Aluminium-induced changes in hemato-biochemical parameters, lipid peroxidation and enzyme activities of male rabbits: Protective role of ascorbic acid. *Toxicology*. 199, 47–57.



Zaoui A., Cherrah Y., Alaoui K., Mahassini

N., Amarouch H., Hassar M., 2002. Effects of *Nigella sativa* fixed oil on blood homeostasis in rat. *Journal of Ethnopharmacology*. 79, 23-26.

Zaoui A., Cherrah Y., Mahassini N., Alaoui K., Amarouch H., Hassar M., 2002. Acute and chronic toxicity of *Nigella sativa* fixed oil. *Phytomedicine*. 9, 69-74.

Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W., 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*. 64, 555-559.

Zhu Y., Li X., Chen C., Wang F., Li J., Hu C., Li Y., Miao L., 2012. Effects of aluminium trichloride on the trace elements and cytokines in the spleen of rats. *Food Chemical Toxicology*. 50, 2911-2915.



ACTIVITÉS DE RECHERCHES

Nigella sativa Oil Reduces Aluminium Chloride-Induced Oxidative Injury in Liver and Erythrocytes of Rats

Ihcene Bouasla, Asma Bouasla, Amel Boumendjel, Mahfoud Messarah, Cherif Abdennour, Mohamed Salah Boulakoud & Abdelfattah El Feki

Biological Trace Element Research

ISSN 0173-4994

Biological Trace Element Res.
DOI 10.1007/s12011-014-0114-5



ONLINE
FIRST

Articles

Article 1

Ihcene Bouasla., Asma Bouasla., Amel Boumendjel., Mahfoud Messarah., Cherif Abdennour., Mohamed Salah Boulakoud., Abdelfattah El Feki. (2014). *Nigella sativa* oil reduces aluminium chloride-induced oxidative injury in liver and erythrocytes of rats. Biological Trace Element Research. DOI 10.1007/s12011-014-0114-5. Impact factor: 1.6

Nigella sativa Oil Reduces Aluminium Chloride-Induced Oxidative Injury in Liver and Erythrocytes of Rats

Ihcene Bouasla · Asma Bouasla · Amel Boumendjel ·
Mahfoud Messarah · Cherif Abdennour ·
Mohamed Salah Boulakoud · Abdelfattah El Feki

Received: 2 June 2014 / Accepted: 19 August 2014
© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract The present study was planned to investigate the protective effects of *Nigella sativa* oil (NSO) supplementation against aluminium chloride (AlCl₃)-induced oxidative damage in liver and erythrocytes of rats. Simultaneously, a preliminary phytochemical study was affected in order to characterize the bioactive components containing in the NSO using chemical assays. The antioxidant capacities of NSO were evaluated by DPPH assay. The results showed that NSO was found to contain large amounts of total phenolics, flavonoids and tannins. Twenty-four rats were equally divided into two groups, in which group A received standard diet, whereas group B treated daily with an oral gavage dose of 2 ml NSO/kg body weight. After 5 weeks pretreatment, both groups were divided again into two subgroups (A and B) of six animals each and treated for other 3 weeks. Therefore, subgroup A1 was served as a control which received standard diet, but subgroup A2 received AlCl₃ (34 mg/kg bw mixed with food). Subgroup B1 received both AlCl₃ and NSO; however, subgroup B2 received NSO only. Results showed that AlCl₃ exhibited an increase in white blood cell counts and

a marked decrease in erythrocyte counts and haemoglobin content. Plasma aspartate transaminase, alanine transaminase, alkaline phosphatase and lactate dehydrogenase activities and total bilirubin concentration were higher in AlCl₃ group than those of the control, while albumin and total protein concentration were significantly lower. Compared to the control, a significant raise of hepatic and erythrocyte malondialdehyde level associated with a decrease in reduced glutathione content, glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase, activities of AlCl₃ treated rats. However, the administration of NSO alone or combined with AlCl₃ has improved the status of all parameters studied. It can be concluded that AlCl₃ has induced the oxidative stress, altered the biochemical parameters and the hepatic histological profile, but the supplementation of NSO has alleviated such toxicity.

Keywords Aluminium chloride · *Nigella sativa* oil · Rats · Liver · Erythrocytes · Oxidative stress · Biochemical parameters

I. Bouasla · A. Bouasla · A. Boumendjel · M. Messarah (✉)
Laboratory of Biochemistry and Environmental Toxicology, Faculty of Sciences, University of Badji Mokhtar, BP 12 Sidi Amar, Annaba, Algeria
e-mail: mmessarahdz@yahoo.fr

I. Bouasla
Laboratory of Applied Biochemistry and Microbiology, Faculty of Sciences, University of Badji Mokhtar, BP 12 Sidi Amar, Annaba, Algeria

C. Abdennour · M. S. Boulakoud
Laboratory of Animal Ecophysiology, Faculty of Sciences, University of Badji Mokhtar, BP 12 Sidi Amar, Annaba, Algeria

A. El Feki
Laboratory of Animal Ecophysiology, Faculty of Sciences, Sfax, Soukra Road – Km 3.5, BP 802, 3018 Sfax, Tunisia

Introduction

Aluminium (Al) is a very abundant metal in the earth's crust which constitutes 8.13 %. It is a constituent of cooking utensils, medicines such as antacids, cosmetics such as deodorants and food additives. Also, it can be found in food especially corn, yellow cheese, salt, herbs, spices and tea. In addition, Aluminium salts are widely used as flocculants in the treatment of drinking water for purification purposes which allowed its easy access into the body via gastrointestinal tract and lung tissue [1, 2]. It accumulates particularly in liver and brain than in bone, muscles, heart or lungs. Liver is the major organ responsible for metabolism, detoxification and secretory functions of the body. Hence, it regulates various important metabolic functions in mammalian systems. Some papers

indicate that Al accumulates in liver and causes harmful effect [3, 4]. Exposure of rats to Al induced oxidative stress with an increase in hepatic malondialdehyde (MDA) levels, a decrease in glutathione (GSH) concentrations and in glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities [5, 6]. In addition, Al induced changes in haemato-biochemical parameters of animal models especially rats and rabbits [8].

Several previous studies were carried out to clarify the exact mechanism of Al cytotoxicity. These data reported that Al potentiates the activity of Fe^{+2} and Fe^{+3} ions and disturb iron metabolism; in fact, it is able to be bound to transferrin because of most closely Al^{+3} ionic radii resemble those of Fe^{+3} induce Fe^{+2} accumulation in cells, which cause an excessive free radical generation, resulting in oxidative deterioration of lipids, proteins and DNA [1, 9]. These disturbances are correlated to oxidative stress which is defined as an impairment of the physiological prooxidant/antioxidant balance. Several authors [2, 10, 11] indicated that an excessive and prolonged Al exposure is directly related to a generation of many health disorders.

Liver diseases are among the most serious health problems in the world today, their prevention and treatment options still remain scarce despite tremendous advances in modern medicine. The pathogenesis of hepatic diseases as well as the role of oxidative stress and inflammation therein is well recognized [12]. Consequently, blocking or retarding the chain reactions of oxidation and inflammation development could be promising therapeutic strategies for prevention and treatment of liver injury. Recent reports indicate that there is an inverse relationship between the dietary intake of antioxidant and the incidence of oxidative stress damages [13, 14]. Diet supplementation with natural antioxidants can serve as a type of preventive medicine; for this reason, researches that deal with the determination of natural antioxidant sources are important [5, 14, 15]. Plants have been the basis of traditional medicines throughout the world for thousands of years. Therefore, the number of reports focused on identification, isolation and testing of natural antioxidants from plants has increased immensely during the last decade [16, 17].

Nigella sativa commonly known as the black seed is an annual herbaceous plant belonging to the Ranunculaceae family. It was used in the Middle and Far East as a natural remedy since ancient times. It is one of the most famous herbs known for its wide range of the healing capabilities which are well known for more than 2,000 years. Recently, the effect of *Nigella sativa* oil (NSO) has been evaluated in animal studies [16–18]. Many reports are focused to investigate the pharmacological and therapeutic effects of different parts of this plant. Studies have reported the occurrence of fats, fatty acids, essential oils, enzymes, proteins, peptides, alkaloids, saponins, phenols and polyols in seeds of *N. sativa* and its oil [19–21]. Also, the same researchers have been shown that

these compounds are thought to be responsible for multisystemic beneficial actions including hypoglycaemic, hypocholesterolemic and antioxidant effects. Bourgou et al. [21] indicate that phenolic compounds are the most important pharmacologically active constituents of *N. sativa* seeds and its oil, that have been shown to be capable of scavenging free radicals and protecting lipids from being oxidized or destroyed during oxidative damage. The role of NSO against aluminium toxicity has not so far been studied. Therefore, the present study was undertaken to investigate the preventive effect of NSO against aluminium chloride (AlCl_3)-induced oxidative stress in rats' liver and erythrocytes, and to determine the possible use of this oil in alleviating AlCl_3 damages.

Materials and Methods

Plant

Nigella sativa Oil Resource

N. sativa oil was provided from a local commercial market (it was produced by Ets Aboukacem Company, BPN°118, les sept merveilles, Algiers, Algeria). The company produces NSO by cold pressing of fresh seeds without using chemicals.

Total Phenolic Contents

Total phenolic content was determined using the Folin-Ciocalteu method of Wolfe et al. [22]. Briefly, 10 μl diluted extract solution was shaken for 5 min with 50 μl of the Folin-Ciocalteu reagent. Then 150 μl of 20 % Na_2CO_3 was added, and the mixture was shaken once again for 1 min. Finally, the solution was brought up to 790 μl by adding distilled water. After 90 min, the absorbance at 760 nm was measured. Gallic acid was used as a standard for the calibration curve. The phenolic content was expressed as milligram gallic acid equivalent/100 g of 100 of NSO using the linear equation based on the calibration curve.

Measurement of Free Radical-Scavenging Action

This assay was determined following the method of Blois [23] with some modifications. Various dilutions of NSO were mixed with ethanolic diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) solution. After an incubation period of 30 min at 25 °C in the dark, the absorbance at 515 nm was recorded as $A_{\text{sample}} \cdot A_{\text{blank}}$. Experiment was also carried out applying the same procedure to a solution without the test material. The free radical-scavenging activity of each solution was then calculated as percent inhibition according to the following equation: % inhibition = $100 (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}}$. The antioxidant activities of NSO were expressed as IC_{50} , defined as the

concentration of the test material required to cause a 50 % decrease in initial DPPH concentration.

Scavenging of Superoxide Anion

Scavenging of superoxide anion was determined by the method of Yen and Chen [24] with some modifications. The superoxide anion was assayed by the oxidation of riboflavine and the reduction of nitro blue tetrazolium (NBT), where the absorbance was read at 560 nm. All solutions were prepared in a phosphate buffer (1 M, pH 7.4). The scavenging activity was calculated as follows:

PI % = $[(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}}] \times 100$, where A_{blank} is the absorbance of the control reaction and A_{sample} is the absorbance in the presence of NSO. The IC_{50} was calculated from the plot of the inhibition percentage against the NSO concentration.

Total Flavonoid Contents

Flavonoid contents were determined according to the method of Zhishen et al. [25]. Two hundred fifty microlitres of NSO or standard solution was mixed with 1.25 ml of distilled water and 75 μ l of 5 % $NaNO_2$ solution. After 6 min, 150 μ l of 10 % $AlCl_3$ solution were added. Five minutes later, 0.5 ml of 1 M NaOH solution was added and then the total volume was made up to 2.5 ml with H_2O . Following thorough mixing of the solution, the absorbance against blank was determined at 510 nm. Quercetin was used for standard curve construction (0.05–0.5 mg/ml, $y = 4.032x + 0.004$, $r^2 = 0.99$, where y is the absorbance and x is the standard concentration). The results were expressed as milligram quercetin equivalents (QE)/g extract.

Total Tannin Contents

The method of Julkunen-Tiitto [26] was followed in this assay. An aliquot (50 μ l) of NSO or standard solution was mixed with 1.5 ml of 4 % vanillin (prepared with methanol), then 750 μ l of HCl (12 M) were added. The well-mixed solution was incubated in the dark at ambient temperature for 20 min. The absorbance against blank was read at 500 nm. Catechin was used to make the standard curve. The results were expressed as milligram catechin equivalents (CE)/g extract.

Animals and Experimental Procedure

Twenty-four Wistar albino male rats weighing 235 ± 10 g (7–9 weeks), obtained from Pasteur institute (Algiers, Algeria) were used for the experimental procedures. Animals were acclimated for 2 weeks under the same laboratory conditions of photoperiod, and an average relative humidity of 40 % and room temperature of 23 ± 2 °C. Food (standard food, supplied

by the “ONAB, El Harrouch”, Algeria) and water were available ad libitum.

Study Groups

Animals were randomized into two groups of 12 animals each. Group A comprised of rats which received standard diet, but group B received daily 2 ml/kg bw of NSO by oral gavage (force-feeding) once per day for 5 weeks.

After 5 weeks of pretreatment, rats of group A were divided again into two subgroups of six individuals each as follows:

- Subgroup A1 (control group): served as control rats.
- Subgroup A2 ($AlCl_3$ -treated group): received 34 mg $AlCl_3$ /kg bw mixed with food.

Similarly, rats of group B were divided into two subgroups of six animals each as follows:

- Subgroup B1 ($AlCl_3$ +NSO-treated group): received both $AlCl_3$ (34 mg $AlCl_3$ /kg bw) and NSO (2 ml/kg bw).
- Subgroup B2 (NSO-treated group): received NSO alone.

Though, both subgroups A and B were treated for other additional 3 weeks.

The doses of $AlCl_3$ and NSO were selected on the basis of previous works [5, 8] and [16, 27], respectively.

Samples Preparation

Blood Collection

At the end of the experimental period, animals were overnight fasted, then weighed and they sacrificed by cervical decapitation. Blood samples were immediately collected into two groups of ice-cold polypropylene tubes. The first one contained EDTA and used for determination of haematological parameters. The second group contained heparin which has been centrifuged at $2,200 \times g$ for 15 min. Plasma samples were stored at -20 °C prior to use for assaying aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), lactate dehydrogenase (LDH), total bilirubin, albumin and total proteins.

Preparation of Erythrocytes and Liver Homogenates

The sediment containing erythrocytes were twice suspended in phosphate buffer saline (0.9 % NaCl in 0.01 M phosphate buffer pH 7.4) and centrifuged at $3,000 \times g$ for 15 min. The hemolysats were then aliquoted and stored at -20 °C before use for antioxidant enzyme activities, and the determination of

malondialdehyde (MDA) and reduced glutathione (GSH) levels.

Livers were quickly removed, washed in 0.9 % NaCl solution and weighed after the careful removal of the surrounding connective tissues, and then, 1 g was homogenized in 2 ml of phosphate buffer solution (PBS: 50 mm Tris, 150 mm NaCl, pH 7.4) in ice-cold condition. Homogenates were centrifuged at $10,000\times g$ for 15 min at 4 °C; the supernatants were divided into aliquots and then stored at -20 °C.

Haematological Variables

Haematological parameters (erythrocytes, WBC, HT, PLT) were evaluated by electronic haematological counter (Selectra coulter, Germany).

Biochemical Assays and Analysis

Different biochemical parameters were assayed spectrophotometrically according to appropriate standardized procedures, using commercially available kits from Spinreact (Spain, refs: AST-1001160–1001161, ALT-1001170–1001171, ALP-1001130–1001131, LDH-1001260, Total bilirubin-1001044, Albumin-1001020–1001023 and Total proteins-1001291).

Estimation of Lipid Peroxidation Levels

The lipid peroxidation (LPO) levels of liver and erythrocyte homogenates were measured as MDA, the end product of lipid peroxidation, which react with thiobarbituric acid (TBA) as a TBA reactive substance (TBARS) to produce a red-coloured complex at 532 nm according to Buege and Aust [28]. The absorbance was read at 530 nm.

Reduced Glutathione (GSH) Levels

Reduced glutathione contents of liver and erythrocyte homogenates were estimated using a colorimetric technique, as mentioned by Jollow et al. [29] which based on the development of a yellow colour when DTNB [5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)] was added to compounds containing sulfhydryl groups. The absorbance was recorded at 412 nm.

Estimation of Antioxidant Enzymes Activities

Glutathione peroxidase (GPx) activity was measured according to the procedure of Flohe and Gunzler [30] at 420 nm.

Catalase activity (CAT) was measured according to the method of Aebi [31]. This assay is based on the ability of the enzyme to induce the disappearance of hydrogen peroxide monitored by following the decrease in the absorbance at 240 nm for 1 min.

The superoxide dismutase (SOD) activity was determined using the method of Asada et al. [32]. SOD activity was evaluated by measuring of its ability to inhibit the photoreduction of nitro blue tetrazolium (NBT). The reaction started by switching on the light, changes in absorbance was recorded at 560 nm after 20 min.

Protein Assays

Protein supernatants concentration of liver and erythrocytes was measured spectrophotometrically at 595 nm according to the method of Bradford [33], using bovine serum albumin as standard.

Histopathological Examination

Liver was dissected and immediately fixed in formol solution for 24 h, processed by using a graded ethanol series, and then embedded in paraffin. The paraffin sections were cut into 5- μ m thick slices and stained with hematoxylin and eosin (H&E) for light microscopic examination by Hould [34]. The sections were viewed and photographed.

Statistical Analysis

All data are expressed as mean \pm SD for six rats of each group. Significant differences between the group's means were determined by ANOVA followed by Student's *t* test. The statistical significance of difference was taken as $p\leq 0.05$.

Results

Antioxidant Activity of *Nigella sativa* Oil

The assessment of antioxidant activity (DPPH) showed an IC₅₀ value of 59.90 % (Table 1). However, the IC₅₀ value of NSO on superoxide radical-scavenging activity was 86.10 %.

Table 1 Amounts of antiradicalar DPPH, anion superoxide-scavenging activity, total phenols content, total flavonoids and condensed tannins in *Nigella sativa* oil

Total phenolic content (mg GAE/100 g of NSO)	0.38 \pm 0.01
50 % scavenging concentration (mg/ml) on DPPH radical	59.90 \pm 2.52
50 % scavenging concentration (mg/ml) on superoxide anion	86.10 \pm 2.23
Total flavonoid content (mg QE/g NSO)	0.50 \pm 0.01
Condensed tannins (mg CE/g NSO)	0.40 \pm 0.01

GAE gallic acid equivalents

QE quercetin equivalents

CE catechin equivalents

The total phenolic content of liophylic NSO product was 0.38 mg of CAE/100 g of extract as also shown in Table 1. The total flavonoid content was expressed as 0.50 mg of quercetin equivalents per gram of NSO. Besides, the results showed that NSO contained 0.40 mg of condensed tannins, which expressed as milligrams of catechin equivalents per gram.

Effects of Treatments on Haematological Parameters

Data of haematological parameters in control and treated groups are shown in Table 2. Compared to the control, rats treated with AlCl₃ had significantly lower erythrocyte counts and Hb content; however, a significant increase was noted in WBC counts. No statistically significant changes were observed in all haematological parameters when control group was compared with AlCl₃+NSO group.

Effects of Treatments on Plasma Biochemical Markers

AlCl₃-treated rats showed a significant increase in plasma AST, ALT, ALP, LDH and total bilirubin compared to those of controls (Table 3). Fewer perturbations were noted concerning these parameters in the AlCl₃+NSO group compared to AlCl₃ group. Albumin and total protein concentrations were decreased in AlCl₃-treated group compared to the control and also to the AlCl₃+NSO group. In contrast, treatment with NSO alone resulted in a significant amelioration of these parameters.

Effects of Treatments on Lipid Peroxidation

Figure 1 revealed that liver and erythrocyte malonaldehyde (MDA) contents were significantly increased in AlCl₃ group compared to those of control groups. NSO administered to rats of (AlCl₃+NSO) group alleviated lipid peroxidation induced by AlCl₃ treatment and modulated significantly the levels of MDA in both tissues compared to AlCl₃ group.

Effects of Treatments on GSH Contents

A significant decrease of hepatic and erythrocyte glutathione (GSH) levels was evident in rats exposed to AlCl₃ (Fig. 2). Administration of NSO ameliorated GSH levels in (AlCl₃+NSO) group compared to that of AlCl₃.

Effects of Treatments on Antioxidant Enzyme Activities

Data concerning liver antioxidant enzyme activities (GPx, SOD and CAT) are presented in Table 4. In AlCl₃ group, GPx, SOD and CAT activities were decreased significantly compared to the control. Administration of NSO improved enzyme activities in AlCl₃+NSO group compared to the AlCl₃ group.

Results of various antioxidant enzyme activities measured in erythrocytes are presented in Table 5. In AlCl₃ group, GPx, SOD and CAT activities were declined compared to the control, but the supplementation of NSO has lessened such decline.

Histopathological Results

Histopathological examination of AlCl₃-treated rats' liver (Table 6 and Fig. 3) revealed an inflammatory cell infiltration (white arrow) with degenerative changes in hepatocytes (black arrow), loss of typical hepatic cord organization and sinusoidal dilatation (star) (Fig. 3b). In contrast, combined treatment of AlCl₃+NSO revealed inflammatory cell infiltration (white arrow), a lesser degree of sinusoidal dilatation (star) and normal cells morphology compared to AlCl₃-treated group (Fig. 3c). Furthermore, no histological alterations were observed in the liver of NSO-treated group (Fig. 3d) when compared to the control (Fig. 3a).

Discussion

Preliminary phytochemical analysis showed that phenols, flavonoids and condensed tannin existed in the NSO. It was

Table 2 Changes on haematological parameters of control and treated rats

Parameters and treatments	Control	AlCl ₃	AlCl ₃ +NSO	NSO
Erythrocytes (10 ⁶ /μl)	8.96±0.31	7.26±0.32*	8.81±0.23 [#]	8.94±0.56
WBC (10 ³ /μl)	10.31±1.81	13.01±0.72*	11.31±1.10 ^{##}	12.31±1.00*
Hb (g/dl)	14.81±0.58	12.18±0.53**	14.63±0.50 ^{##}	15.56±1.17
HT (%)	44.55±1.33	43.60±1.50	43.65±0.90	47.01±1.42*
PLT (10 ³ /μl)	721.66±7.99	688.00±7.11	704.33±6.44	718.66±3.73

Values are given as mean±SD for groups of six animals each. Significant difference: all treated groups compared to the control one (*p≤0.05, **p≤0.01), AlCl₃+NSO group compared to the AlCl₃ treated one ([#]p≤0.05, ^{##}p≤0.01)

Table 3 Effects of treatments on some biochemical parameters in plasma of control and treated rats

Parameters and treatments	Control	AlCl ₃	AlCl ₃ +NSO	NSO
AST (U/L)	152.71±4.72	296.57±1.87**	221.55±4.04* [#]	160.77±4.22
ALT (U/L)	162.36±3.19	209.50±5.67*	141.33±4.31 [#]	132.61±2.28
ALP (U/L)	113.25±2.10	177.47±8.10***	111.80±8.29 ^{###}	96.00±6.67
LDH (U/L)	704.83±5.14	964.50±5.97***	879.33±2.69** [#]	660.00±4.75
Total bilirubin (mg/l)	1.60±0.17	2.05±0.28*	1.50±0.14 [#]	1.33±0.32
Albumin (g/dl)	43.09±3.20	31.19±7.14**	45.30±1.10 ^{###}	43.73±1.50
Total protein (g/dl)	92.69±4.20	82.26±5.93**	89.58±2.83 [#]	90.38±2.19

Values are given as mean±SD for groups of 6 animals each. Significant difference: all treated groups compared to the control one (* $p\leq 0.05$, ** $p\leq 0.01$, *** $p\leq 0.001$), AlCl₃+NSO group compared to the AlCl₃ treated one ([#] $p\leq 0.05$, ^{###} $p\leq 0.01$, ^{####} $p\leq 0.001$)

apparent that the total flavonoids were the dominant phenolic compounds of the NSO. The stable DPPH radical is widely used to evaluate the free radical-scavenging activity in many plant extracts. The assessment of antioxidant activity showed that the oil extracted from NS was able to scavenge this radical. Results demonstrated also that NSO exhibited significant superoxide anion-scavenging capacity [20, 21, 35].

Compared to the control, administration of AlCl₃ induced significant decrease in erythrocytes and Hb count, indicated occurrence of microcytic anemia. This anemia could be explained by the inhibition of erythropoiesis, haemoglobin synthesis reduction and/or increase in the rate of erythrocyte destruction in haematopoietic organs. Also, it could be associated to AlCl₃ toxicity which induces iron deficiency and a

reduction in heme synthesis. On the other hand, haemoglobin of erythrocytes is a major source of radical production when it interacts with redox drugs or xenobiotics giving rise to superoxide radicals, hydrogen peroxide and in certain cases peroxy radicals leading to membrane lipid peroxidation and hemolysis. Similar results were found in rat erythrocytes exposed to diazinon for 3 weeks [15].

In addition, AlCl₃ treatment induced a significant increase in WBC counts, which might be indicative of immune system activation and that may reflect the incidence of tissue oedema and inflammation [7, 8, 36]. The present results were in line with previous reports which demonstrated that heavy metal

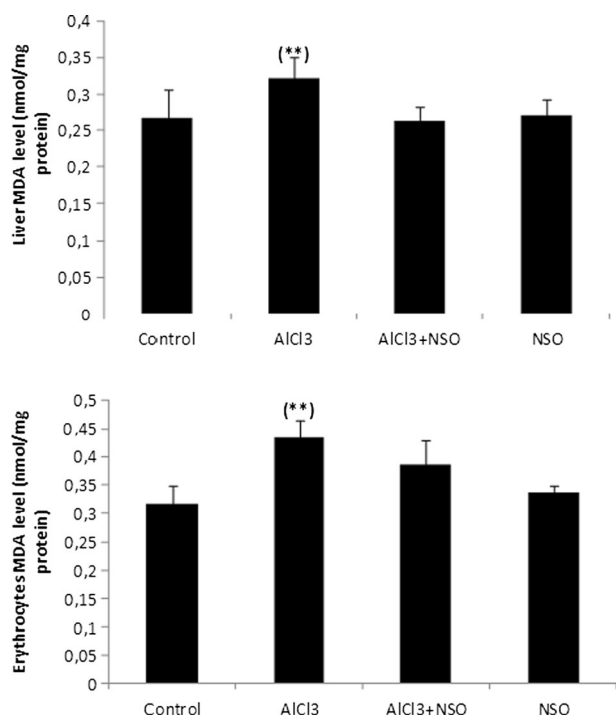


Fig. 1 Malondialdehyde (nmol/mg protein) levels in liver and erythrocytes of control and treated rats. Values are given as mean±SD for groups of six animals each. Significant difference: all treated groups compared to the controls one (** $p\leq 0.01$)

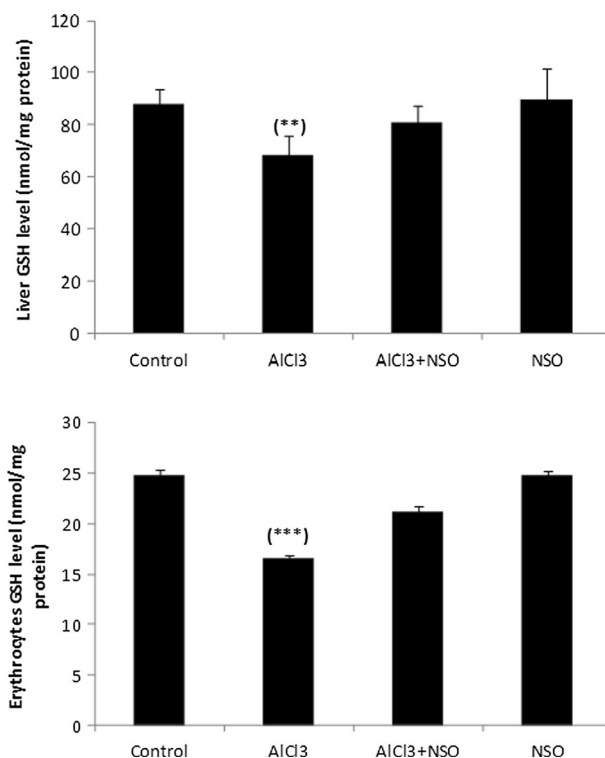


Fig. 2 Reduced glutathione (nmol/mg protein) levels in liver and erythrocyte of control and treated rats. Values are given as mean±SD for groups of six animals each. Significant difference: all treated groups compared to the controls one (** $p\leq 0.01$, *** $p\leq 0.001$)

Table 4 Antioxidant enzyme activities in liver of control and treated rats

Parameters studied	Control	AlCl ₃	AlCl ₃ +NSO	NSO
Glutathione peroxidase ^a	0.17±0.006	0.14±0.003**	0.16±0.01	0.17±0.01
Superoxide dismutase ^b	0.81±0.09	0.36±0.06***	0.87±0.03 [#]	0.91±0.03
Catalase ^c	7.05±0.09	5.66±0.20*	6.85±0.20	7.03±0.12

^a Glutathione peroxidase: μmoles of GSH/min/mg protein, ^b superoxide dismutase : units represent the amount of enzyme that inhibits the oxidation of NBT by 50 %/mg of protein. ^c Catalase: μmoles H₂O₂ degraded/min/mg protein

Values are given as mean±SD for groups of six animals each. Significant difference: all treated groups compared to the control one (**p*≤0.05, ***p*≤0.01, ****p*≤0.001), AlCl₃+NSO group compared to the AlCl₃ treated one ([#]*p*≤0.05)

exposure altered erythropoiesis in rats [37, 38]. Thus, the NSO supplementation prevents this alteration, stimulate erythropoietine production and restore the erythropoiesis mechanism. In fact, NSO beneficial effects are probably due to its antioxidant activity causing a decrease of AlCl₃ concentration in blood cells, inhibit its entry into erythrocytes and facilitating iron incorporation to the heme group. It is could be also related to the anti-inflammatory effects of NSO reported in several prior studies [18, 39, 40]. The same reports indicate that NSO inhibits eicosanoid generation as well as leukotrienes and histamine release. Though, nigellone is the exact component responsible for this effect [16, 17].

Results obtained from the present work showed a significant increase in plasma AST, ALT, ALP and LDH in AlCl₃-treated rats, these findings are in accordance with the previous studies [5, 8]. The increases in enzyme activity may be due to the liver injury or dysfunction which results in the leakage of these enzymes from the liver cytosol into the blood and/or to the disturbance in the balance between biosynthesis and degradation of these enzymes with increased permeability of hepatocyte membrane [5, 41]. Additional effects of AlCl₃ treatment revealed a decreased plasma albumin, and increased total bilirubin. Therefore, the significant decrease in albumin concentration could be attributed on the one hand to an under nutrition and on the other hand to a reduction of hepatic protein synthesis, a decreasing plasma total proteins confirm the direct damaging effect of AlCl₃. The increase in plasma bilirubin may result from decreased liver uptake, conjugation or increased bilirubin production from haemolysis [5, 8, 11]. In parallel, the present study demonstrates that the

supplementation of NSO with AlCl₃ produced an effective action against the hepatocyte damages as shown by a decrease of the elevated plasma hepatic key enzymes, total bilirubin levels and by a normalization of both albumin and total proteins. Similar observation was reported by Mahmoud et al., [16], Krishnan and Muthukrishnan [18] and Kokdil et al. [27]. This action could be explained by the ability of NSO and its bioactive constituents to prevent hepatocyte damages, such as cellular necrosis as well as the membrane function failure.

The elevated level of MDA in AlCl₃-treated rats could be linked to the peroxidation damages of biological membranes, caused by an increased reactive Fe⁺² and/or inactivation of enzymes involved in antioxidant defence, a decreased GPx, SOD and CAT activities showed in these results confirmed this theory. Similar findings are reported by Newairy et al. [8], Lukyanenko et al. [11] and Shrivastava [41] who had indicated that aluminium intake produced oxidative stress. Besides, Zhu et al. [37], Nehru and Anand [42] reported that AlCl₃ accumulation induced alteration of zinc and copper homeostasis and decreased their binding ability to the antioxidant enzymes which caused antioxidant enzyme dysfunction. Moreover, the decreasing GSH activity might be related to the inhibitor effect of AlCl₃ on glutamyl-cysteine-synthetase activity, the enzyme that controls the biosynthesis of glutathione in liver and/or the inhibition of NADPH-generating enzymes such as glucose-6-phosphate dehydrogenase and NADP-isocitrate dehydrogenase [8, 41, 43]. In fact, NSO prevents the formation of reactive oxygen species, causes reduction of lipid peroxidation and stimulates antioxidant

Table 5 Antioxidant enzyme activities in erythrocytes of control and treated rats

Parameters studied	Control	AlCl ₃	AlCl ₃ +NSO	NSO
Glutathione peroxidase ^a	0.19±0.007	0.15±0.004**	0.18±0.004 [#]	0.20±0.004
Superoxide dismutase ^b	1.36±0.02	0.40±0.06***	0.70±0.01**	1.40±0.01
Catalase ^c	1.86±0.01	1.56±0.05**	1.75±0.04	1.90±0.07

^a Glutathione peroxidase: μmoles of GSH/min/mg protein, ^b superoxide dismutase : units represent the amount of enzyme that inhibits the oxidation of NBT by 50 %/mg of protein. ^c Catalase: μmoles H₂O₂ degraded/min/mg protein

Values are given as mean±SD for groups of six animals each. Significant difference: all treated groups compared to the control one (***p*≤0.01, ****p*≤0.001), AlCl₃+NSO group compared to the AlCl₃ treated one ([#]*p*≤0.05)

Table 6 Semiquantitative scoring of architectural damage on histopathological examination of the rat livers in the different treatment groups

Treatments	Control	AlCl ₃	AlCl ₃ +NSO	NSO
Degeneration of hepatocytes	–	++	–	–
Sinusoidal dilatation	–	++	+	–
Inflammatory cells infiltration	–	+++	++	–
Loss of typical hepatic cords organization	–	+	–	–

(–) indicates normal, (+) indicates mild, (++) indicates moderate and (+++) indicates severe

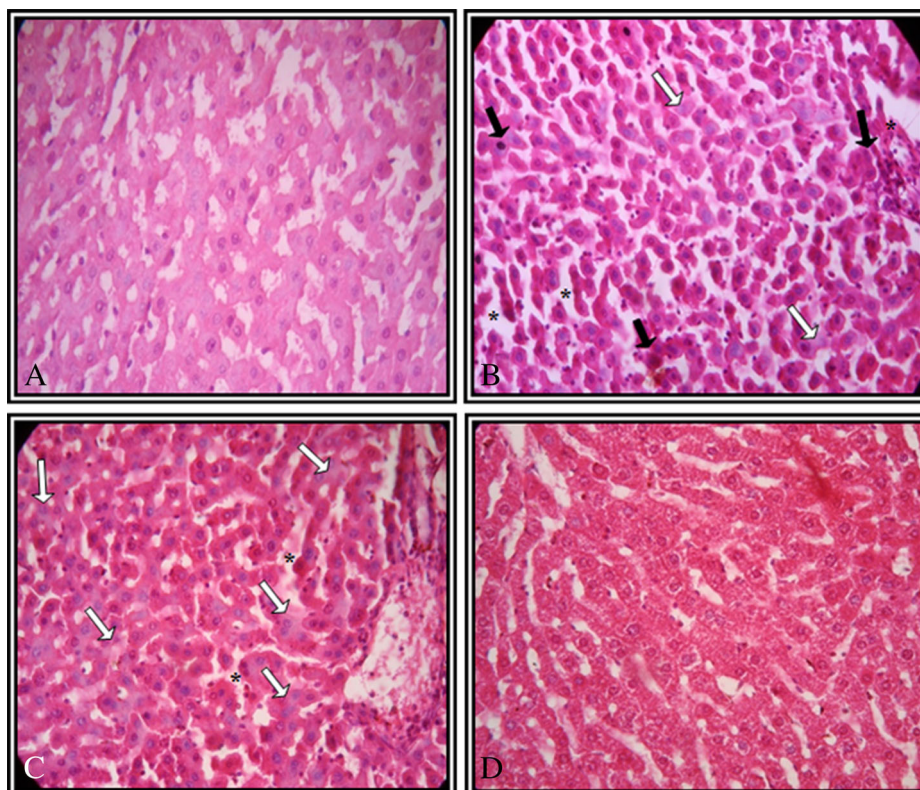
defence system [17, 18]. Moreover, several recent studies attributed the antioxidant activity of NSO to their total polyphenolic contents. It has been reported that the antioxidative activity of polyphenols is related to their ability to chelate metal ions and scavenge reactive oxygen species [21, 39].

The biochemical parameters were correlated with the liver histological studies. In fact, the liver histoarchitecture of the AlCl₃ treated rats presented by inflammatory cells, infiltration with degenerative changes, loss of typical hepatic cords organization and sinusoidal dilatation. Accordingly, hydroperoxides accumulated in liver could cause cytotoxicity associated with membrane phospholipid peroxidation, the basis for liver cellular damage. These results are in accordance with those obtained by other studies which indicate that metals cause histopathological and enzymatic changes in rats [10, 18]. The co-treatment of NSO improved the histological alterations induced by AlCl₃, which could be related to the antioxidant

and metal-chelating efficacy of the NSO. This protective effect of black seed oil was reported by Mahdy and Farrag [10] and Krishnan and Muthukrishnan [18] who found that black seed may be successful in the protection of rat liver necrosis.

In the present study, the NSO has been demonstrated to possess excellent antioxidant activities by various in vitro and in vivo assays. The various in vitro antioxidant tests proved that NSO possesses components such as polyphenols and flavonoids with scavengers of free radicals. Also, this study clearly indicates that AlCl₃ affects both haematological and biochemical parameters as well as antioxidative system inducing oxidative stress. Co-administration of NSO reduces this disturbance particularly hepatotoxicity due to its large therapeutic properties linked to the presence of several phenolic compounds, such as flavonoids. Further biochemical investigations are needed to ascertain the precise mechanisms of its action.

Fig. 3 Photomicrograph of H&E stained sections of liver from control rat showing normal histological structure (Fig. 3a×400). AlCl₃-treated rat liver showing inflammatory cell infiltration (*white arrow*) with degenerative changes in hepatocytes (*black arrow*), loss of typical hepatic cords organization and sinusoidal dilatation (*star*) (Fig. 3b×400). NSO co-administrated with AlCl₃-treated rat liver showing inflammatory cell infiltration (*white arrow*), a lesser degree of sinusoidal dilatation (*star*) and normal cells morphology compared to AlCl₃-treated group (Fig. 3c×400). NSO-treated rat liver showing normal appearance of hepatocytes (Fig. 3d×400)



Acknowledgments The present research was supported by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research, Directorate General for Scientific Research and Technological Development through the Research Laboratory “Laboratory of Biochemical and Environmental Toxicology” Faculty of Sciences, University of Badji Mokhtar, Annaba, Algeria.

Conflict of Interest The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

1. Kumar V, Bal A, Gill K (2009) Susceptibility of mitochondrial superoxide dismutase to aluminium induced oxidative damage. *Toxicology* 255:117–123
2. Guo C, Hsu GW, Chuang C, Chen P (2009) Aluminium accumulation induced testicular oxidative stress and altered selenium metabolism in mice. *Environ Toxicol Pharmacol* 27:176–181
3. González MA, Roma M, Bernal C, Alvarez ML, Carrillo MC (2007) Involvement of oxidative stress in the impairment in biliary secretory function induced by chronic administration of aluminum to rats. *Biol Trace Elem Res* 116:329–348
4. González MA, Bernal CA, Mahieu S, Carrillo MC (2009) The interactions between the chronic exposure to aluminum and liver regeneration on bile flow and organic anion transport in rats. *Biol Trace Elem Res* 127:164–176
5. El-Demerdash FM (2004) Antioxidant effect of vitamin E and selenium on lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters in rats exposed to aluminium. *J Trace Elem Med Biol* 18: 113–121
6. Turkez H, Yousef MI, Geyikoglu F (2010) Propolis prevents aluminium-induced genetic and hepatic damages in rat liver. *Food Chem Toxicol* 48:2741–2746
7. Yousef MI (2004) Aluminium-induced changes in hemato-biochemical parameters, lipid peroxidation and enzyme activities of male rabbits: protective role of ascorbic acid. *Toxicology* 199:47–57
8. Newairy AS, Salama AF, Hussien HM, Yousef MI (2009) Propolis alleviates aluminium induced lipid peroxidation and biochemical parameters in male rats. *Food Chem Toxicol* 47:1093–1098
9. Kaneko N, Takada J, Yasui H, Sakurai H (2006) Memory deficit in mice administered aluminium–maltolate complex. *Biometals* 19:83–89
10. Mahdy KA, Farrag ARH (2009) Amelioration of aluminium toxicity with black seed supplement on rats. *Toxicol Environ Chem* 91:567–579
11. Lukyanenko LM, Skarabhatava AS, Slobozhanina EI, Kovaliova SA, Falcioni ML (2013) In vitro effect of AlCl₃ on human erythrocytes: changes in membrane morphology and functionality. *J Trace Elem Med Biol* 27:160–167
12. Tacke F, Luedde T, Trautwein C (2009) Inflammatory pathways in liver homeostasis and liver injury. *Clin Rev Allergy Immunol* 36:4–12
13. Nazıroğlu M, Karaoğlu A, Orhan Aksoy A (2004) Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin-induced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats. *Toxicology* 195:221–230
14. Nazıroğlu M, Kozlu S, Yorgancıgil E, Uğuz AC, Karakuş K (2013) Protective effects of rose oil (*Rosa damascena* Mill) vapor on depression-induced oxidative stress in rat brain. *J Nat Med* 67(1): 152–158
15. Messarah M, Amamra W, Boumendjel A, Barket L, Bouasla I, Abdenmour C, Boulakoud MS, El-Feki A (2012) Ameliorating

- effects of curcumin and vitamin E on diazinon induced oxidative damage in rat liver and erythrocytes. *Toxicol Ind Health* 29:1–12
16. Mahmoud MR, El-Abhar HS, Salech S (2002) The effect of *Nigella sativa* oil against the liver damage induced by *Schistosoma mansoni* infection in mice. *J Ethnopharmacol* 79:1–11
17. Yaman I, Balıkcı E (2010) Protective effects of *Nigella sativa* against gentamicin induced nephrotoxicity in rats. *Exp Toxicol Pathol* 62: 183–190
18. Krishnan N, Muthukrishnan S (2012) Effects of *Nigella sativa* seed extract on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. *J Acute Med* 2:107–113
19. Mohamadin AM, Sheikh B, Abd El-Aal AA, Elberry AA, Al Abbasi FA (2010) Protective effects of *Nigella sativa* oil on propoxur induced toxicity. *Pest Biochem Physiol* 98:128–134
20. Cheikh-Rouhou S, Besbes S, Blecker C, Deroanne C, Attia H (2007) *Nigella sativa* L.: chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction. *Food Chem* 101:673–681
21. Bourgou S, Ksouri R, Bellila A, Skandran I, Falleh H, Marzouk B (2008) Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L shots and roots. *C Biol* 331:48–55
22. Wolfe K, Wu X, Liu RH (2003) Antioxidant activity of apple peels. *J Agric Food Chem* 51:609–614
23. Blois MS (1958) Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature* 26:1199–1200
24. Yen GC, Chen HY (1995) Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J Agric Food Chem* 43:27–32
25. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 64:555–559
26. Julkunen-Tiitto R (1985) Phenolics constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *J Agric Food Chem* 33:213–217
27. Kokdil G, Tamer L, Ercan B, Ilcim A, Aras N, Atik U (2005) Effects of *Nigella unguicularis* fixed oil on blood biochemistry and oxidant/antioxidant balance in rats. *J Ethnopharmacol* 99:131–135
28. Buege JA, Aust SD (1984) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 105:302–310
29. Jollow DJ, Mitchel JR, Zampaglione Z, Gillette JR (1974) Bromobenzene induced liver necrosis. Protective role of glutathione and evidence for 3,4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolites. *Pharmacology* 11:51–57
30. Flohe L, Gunzler WA (1984) Analysis of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 105:114–121
31. Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Method Enzymol* 105:121–126
32. Asada K, Takahashi M, Nagate M (1974) Assay and inhibitors of spinach superoxide dismutase. *Agric Biol Chem* 38:471–473
33. Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Anal Biochem* 72:248–254
34. Hould R (1984) Techniques d’histopathologie et de cytopathologie. *Ed Maloine* 19–21:225–227
35. Mariod AA, Ibrahim RM, Ismail M, Ismail N (2009) Antioxidant activity and phenolic content of phenolic rich fraction obtained from black cumin (*Nigella sativa*) seedcake. *Food Chem* 116:306–312
36. Mahieu S, Millen N, Gonzelez M, Contini MDC, Elias MM (2005) Alteration of the renal function and oxidative stress in renal tissue from rats chronically treated with aluminium during the initial phase of hepatic regeneration. *J Inorg Biochem* 99:1858–1864
37. Zhu Y, Li X, Chen C, Wang F, Li J, Hu C, Li Y, Miao L (2012) Effects of aluminium trichloride on the trace elements and cytokines in the spleen of rats. *Food Chem Toxicol* 50:2911–2915
38. Farina M, Ratta LN, Soares FAA, Jardim F, Jacques R, Souza DO, Rocha JBT (2005) Haematological changes in rats chronically exposed to oral aluminium. *Toxicology* 209:29–37
39. Salem ML (2005) Review: Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *Int Immunopharmacol* 5:1749–1770

40. Meral I, Kanter M (2003) Effects of *Nigella sativa* L and *Urtica sioica* L on selected mineral status and haematological values in CCl₄-treated rats. *Biol Trace Elem Res* 96:263–270
41. Shrivastava S (2012) Combined effect of HEDTA and selenium against aluminium induced oxidative stress in rat brain. *J Trace Elem Med Biol* 26:210–214
42. Nehru B, Anand P (2005) Oxidative damage following chronic aluminium exposure in adult and pup rat brains. *J Trace Elem Med Biol* 19:203–208
43. Wu Z, Du Y, Xue H, Wu Y, Zhou B (2012) Aluminium induces neurodegeneration and its toxicity arises from increased iron accumulation and reactive oxygen species (ROS) production. *Neurobiol Aging* 33:1–12

Article 2

Ihcene Bouasla., Asma Bouasla., Amel Boumendjel., Abdelfattah El Feki., Mahfoud Messarah. (2014). Antioxidant Effect of Alpha Lipoic Acid on Hepatotoxicity Induced by Aluminium Chloride in Rats. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research.* 5, 19-25.



Antioxidant Effect of Alpha Lipoic Acid on Hepatotoxicity Induced by Aluminium Chloride in Rats

Ihcène Bouasla^{1,2}, Asma Bouasla¹, Amel Boumendjel¹, Abdelfattah El Feki³, Mahfoud Messarah^{1*}

¹Laboratory of Biochemistry and Environmental Toxicology, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University, BP 12 Sidi Amar, Annaba, Algeria.

²Laboratory of Applied Biochemistry and Microbiology, Faculty of Sciences, University of Badji Mokhtar, BP 12 Sidi Amar, Annaba, Algeria.

³Laboratory of Animal Ecophysiology, Sfax, Soukra road – Km 3.5, BP 802, 3018 Sfax, Tunisia.

*Corresponding author's E-mail: mahfoud.messarah@univ-annaba.dz

Accepted on: 12-08-2014; Finalized on: 30-11-2014.

ABSTRACT

The present study was planned to investigate the ameliorative effects of α -lipoic acid (α -LA) supplementation against aluminium chloride ($AlCl_3$) induced hepatotoxicity in rats. The results showed that rats consuming diets with $AlCl_3$ added had poor growth performance, and most serum hematological indexes were significantly altered compared to the control. Biochemical results showed that lipid peroxidation increased significantly in Al -treated rats, as evidenced by high liver malondialdehyde (MDA) levels. Alteration of the antioxidant system in treated group was confirmed by the significant decline of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) activities and reduced glutathione (GSH) content in liver. Moreover, $AlCl_3$ exposure induced an increase in the activities of the aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), lactate dehydrogenase (LDH) and bilirubin levels, while albumin and total protein were significantly decreased. These results strongly suggest that aluminium affected antioxidant defence system and both haematological and biochemical parameters, co-administration of α -lipoic acid exerted a protective effect against aluminium induced oxidative stress.

Keywords: Aluminium chloride, Alpha-lipoic acid, Biochemical studies, Liver, Oxidative stress, Rat.

INTRODUCTION

Aluminium is very abundant metal in the earth's crust which constitutes 8.13%. It is a constituent of cooking utensils, medicines such as antacids, cosmetics such as deodorants, and food additives. Also it can be found in food especially corn, yellow cheese, salt, herbs, spices and tea. In addition, aluminium salts are widely used as flocculants in the treatment of drinking water for purification purposes.^{1,2} Considering the large utilisation of aluminium in different fields, many available data reported that aluminium exposure increased recently, which have allowed its easy access into the body via gastrointestinal tract and lung tissue.³ A several authors indicate that an excessive and prolonged aluminium exposure affects directly haematological and biochemical parameters, disturbs lipid peroxidation and attenuate the activities of the antioxidant enzymes in plasma and tissues of animals models especially rats and rabbits.^{2,4,5} This impairment of the physiological prooxidant/antioxidant balance causes oxidative stress.

Lipoic acid (1, 2-dithiolane-3-pentanoic acid, LA) has been known for a long time as a cofactor of α -ketoacid dehydrogenases.^{6,7} This compound is found naturally in our diets but it is synthesized in human cells. In vivo lipoic acid is rapidly converted into its reduced form, dihydrolipoic acid (DHLA).^{8,10} Recent studies demonstrated that LA and dihydrolipoic acid can act as potent antioxidants. They can scavenge a number of free radicals both in hydrophilic and lipophilic phases of cell.^{11,12} In addition, they were found to be capable of regenerating endogenous antioxidants in the body including Vitamin C, Vitamin E and intracellular reduced

glutathione, therefore it has been proposed that both LA and dihydrolipoic acid are a therapeutic agents in the prevention or treatment of pathological conditions mediated via oxidative stress.^{13,14} Because of the health problems induced by many environmental pollutants, much effort has been expended in evaluating the relative antioxidant potency of α -LA. Consequently, this study aimed to evaluate (i) the influence whether $AlCl_3$ induced hematological and biochemical perturbations in rats and (ii) the protective role of α -LA in alleviating the detrimental effect of $AlCl_3$ induced toxicity.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

All chemicals used in this study were purchased from Sigma chemical co. (USA).

Animals and experimental procedure

12 rats weighing around 235 ± 10 g were obtained from Pasteur institute (Algiers, Algeria). Animals were acclimated for 2 weeks under the same laboratory conditions of photoperiod (12-h light: 12-h dark cycle), a minimum relative humidity of 40% and room temperature $23 \pm 2^\circ C$. Food (standard diet, supplied by the "ONAB, El-Harrouch", Algeria) and water were available *ad libitum*. The animals were randomized into three groups of 6 animals each.

- Group (A, **Control group**): served as control rats which received standard diet.
- Group (B, **$AlCl_3$ -treated group**): received only $AlCl_3$ (34 mg/kg bw administered in the diet).



- Group (**C, AlCl₃+ α -LA group**): received both AlCl₃ and α -LA (35mg/kg bw) by oral gavage once per day.

During all period of treatment (three weeks), food consumption was measured daily, while the body weights were recorded weekly. The amount of ingested diet was calculated as the difference between the weight of feed that remained in the food bin (D1) and the amount placed 1 day before (D2). These data were then used to calculate the daily average feed intake, according to the formula:

Average feed intake: $D_2 - D_1$

Quantities of AlCl₃ ingested by each rat were calculated from daily food consumption. The doses of AlCl₃ and α -LA were selected on the basis of previous works^{1,15-17} respectively.

Samples preparation

Blood collection

At the end of the experimental period, animals were weighed, overnight fasted and they sacrificed by cervical decapitation. The blood samples were immediately collected into tow ice –cold polypropylene tubes. The first one containing EDTA as anticoagulant and used for determination of haematological parameters. The second tube containing heparin as anticoagulant, which the plasma samples obtained from, by centrifugation (2200g for 15 min) after that the result supernatants were aliquoted and stored at -20°C prior to use for biochemical assay of aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), lactate dehydrogenase (LDH), total bilirubin, albumin and total protein.

Preparation of liver homogenate

The liver were quickly removed washed in 0.9% NaCl solution and weighed after the removal of the surrounding-connective tissues carefully, and then, one gram of liver was homogenised in 2 ml of phosphate buffer solution (PBS: 50mm Tris, 150 mm NaCl, pH 7.4) in ice cold condition. Homogenates were centrifuged at 10.000g for 15 min at 4°C, the supernatants were divided into aliquots to use each one for one time and stored at -20°C before being used.

Haematological variables

Haematological parameters were evaluated by electronic haematological counter (selectra coulter, Germany).

Plasma biochemical markers

Transaminases activities, total bilirubin, albumin and total protein levels were determined spectrophotometrically according to appropriate standardised procedures, using commercially available kits from Spinreact (Spain, refs: AST-1001 160-1001161, ALT-1001170-1001171, ALP-1001130-1001131, LDH-1001260, total bilirubin - 1001044, albumin -1001020-1001023, total protein - 1001291).

Estimation of lipid peroxidation level

The lipid peroxidation (LPO) level in the liver homogenates was measured as malondialdehyde (MDA), which is the end product of lipid peroxidation, and react with TBA as a TBA reactive substance (TBARS) to produce a red colored complex which has peak absorbance at 530nm according to Buege and Aust.¹⁸ 375 μ l of supernatant were homogenized by sonication with 150 μ l of PBS, 375 μ l of TCA-BHT (trichloroacetic acid-butylhydroxytoluene) in order to precipitate proteins and then centrifuged (1000g, 10min, 4°C). 400 μ l of obtained supernatant were mixed with 80 μ l of HCl (0.6M) and 320 μ l of TBA dissolved in Tris solution and the mixture was incubated at 80°C for 10 min. The absorbance of the resultant supernatant was red at 530nm. The amount of MDA was calculated by using an extinction coefficient of $1.56 \times 10^5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Reduced Glutathione level

Reduced glutathione (GSH) contents in liver and erythrocyte homogenates was estimated using a colorimetric technique, as mentioned by Ellman¹⁹, modified by Jollow et al.²⁰, based on the development of a yellow colour when DTNB [(5, 5 dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)] was added to compounds containing sulfhydryl groups. In brief, 0.8 ml of liver supernatant was added to 0.2ml of 0.25% sulphosalicylic acid and tubes were centrifuged at 2500xg for 15min. The resulting supernatant (0.5 ml) was mixed with 0.025 ml of 0.01M DTNB and 1ml phosphate buffer (0.1M, pH 7.4). The absorbance at 412 nm was recorded. The amount of GSH was expressed as nmoles of GSH/mg protein.

Antioxidant enzymes activities

Glutathione peroxidase activity

Gutathione peroxidase (GPx) (E.C.1.11.1.9) activity was measured according to the procedure of Flohe and Gunzler.²¹ Supernatant obtained after centrifuging 5% liver homogenate at 1500 x g for 10 min followed by 10000 x g for 30 min at 4°C was used for GPx assay. One ml of reaction mixture was prepared which contained 0.3ml of phosphate buffer (0.1M, pH7.4), 0.2ml of GSH (2mM), 0.1ml of sodium azide (10mM), 0.1ml of H₂O₂ (1mM) and 0.3ml of liver supernatants. After incubation at 37°C for 15min, reaction was determined by addition of 0.5ml 5% TCA. Tubes were centrifuged at 1500 x g for 5 min and the supernatant was collected. 0.2ml of phosphate buffer (0.1M pH7.4) and 0.7ml of DTNB (0.4mg/ml) were added to 0.1ml of reaction supernatant. After mixing, absorbance was recorded at 420 nm.

Catalase activity

The activity of catalase (CAT) (E.C.1.11.1.6) was measured according to the method of Aebi.²² The reaction mixture 1ml contained a 100mM phosphate buffer (pH 7), 500mM H₂O₂ and liver supernatants. The reaction started by adding H₂O₂ and its decomposition was monitored by following the decreased in absorbance at 240nm for 1



min. The enzyme activity was calculated by using an extinction coefficient of $0.043\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Superoxide dismutase activity

The superoxide dismutase (SOD) (E.C.1.15.1.1) activity was determined using a method of Asada et al.,²³ SOD activity was evaluated by measuring of its ability to inhibit the photo reduction of nitro-blue tetrazolium (NBT). One millilitre of homogenate's supernatant was combined 50mM phosphate buffer (pH 7.8), 39 mM methionine, 2.6 mM NBT and 2.7 mM EDTA-Riboflavin, as to obtain a final concentration of 0.26 mM, was added as the last and switching on the light started the reaction, changes in absorbance at 560nm were recorded after 20min. In this assay, one unit of SOD is defined as the amount that inhibits the NBT reaction by 50%. Specific activity was defined as units/mg of protein.

Protein content

Protein supernatants concentration in liver was measured spectrophotometrically at 595 nm according to the method of Bradford²⁴, using bovine serum albumin as standard.

Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm SD for six rats in each group. Significant differences between the group's means were determined by paired student's test. The statistical signification of difference was taken as $p \leq 0.05$.

RESULTS

Effects of treatments on body and relative liver weights

Changes in total body weight and liver relative's weights are shown in Table 1. The total body weight showed a pronounced reduction by 20.09% and 16.068% in rats of AlCl_3 treated group compared to the $\text{AlCl}_3 + \alpha\text{-LA}$ treated group and to the controls respectively. Besides, a highly significant increase in liver relative weights of AlCl_3 treated rats (a hypertrophy of the liver) was noted compared to the $\text{AlCl}_3 + \alpha\text{-LA}$ treated rats and to the controls ones.

Table 1: Changes in body weight (g) and liver relative weights (g/100g bw) of control and treated rats

Parameters studied	Control	AlCl_3	$\text{AlCl}_3 + \alpha\text{-LA}$
Initial body weight (g)	236.33 \pm 51.34	242.67 \pm 41.63	243.17 \pm 29.74
Final body weight (g)	311.17 \pm 54.61	261.17 \pm 38.20*	326.5 \pm 46.85 [#]
Relative liver weight (g/100g bw)	2.63 \pm 0.16	3.423 \pm 0.48**	2.68 \pm 0.22 [#]

Values are given as mean \pm SD for groups of 6 animals each. Significant difference; All treated groups compared to the controls one (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$); $\text{AlCl}_3 + \alpha\text{-LA}$ group compared to the AlCl_3 treated one ([#] $p \leq 0.05$).

Effects of treatments on food intake

The decrease in body weight was associated with a reduction in food intake by 10.867% and 12.010% in AlCl_3 treated group compared to $\text{AlCl}_3 + \alpha\text{-LA}$ group and to the control respectively (Table 2).

Table 2: Daily food intake and AlCl_3 ingested of control and treated rats

Parameters and treatments	Control	AlCl_3	$\text{AlCl}_3 + \alpha\text{-LA}$
Food intake (g/day/rat)	21.14 \pm 2.26	18.601 \pm 4***	20.87 \pm 2.31 ^{##}
Quantities of AlCl_3 ingested (mg/day/rat)	-	6.324 \pm 1.35	7.1 \pm 1.35

Values are given as mean \pm SD for groups of 6 animals each. Significant difference; All treated groups compared to the controls one (** $p \leq 0.001$); $\text{AlCl}_3 + \alpha\text{-LA}$ group compared to the AlCl_3 treated one (^{##} $p \leq 0.001$).

Effects of treatments on haematological parameters

As shown in Table 3, hematological parameters in control and treated groups. Red blood cell (RBC), haemoglobin (Hb) content and mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC) in AlCl_3 treated group were significantly decreased compared to those in the controls. While, white blood cell number (WBC) were significantly increased than those of the controls. There was no significant effect of adding 34 mg/kg AlCl_3 on all haematological indexes in rats treated with $\text{AlCl}_3 + \alpha\text{-LA}$ compared control rats.

Table 3: Changes on haematological parameters of control and treated rats

Parameters and treatments	Control	AlCl_3	$\text{AlCl}_3 + \alpha\text{-LA}$
RBC ($10^6/\mu\text{l}$)	8.96 \pm 0.31	7.26 \pm 0.32*	8.80 \pm 0.50 [#]
WBC ($10^3/\mu\text{l}$)	10.31 \pm 1.81	13.01 \pm 0.72*	11.58 \pm 1.12 [#]
Hb (g/dl)	14.81 \pm 0.58	12.18 \pm 0.53**	14.28 \pm 0.57 ^{##}
HT (%)	44.55 \pm 1.33	43.6 \pm 1.50	43.85 \pm 1.78
MCV (mm^3/RBC)	49.66 \pm 1.75	49.33 \pm 2.16	49.16 \pm 1.47
TCMH (pg/RBC)	16.55 \pm 0.69	16.30 \pm 0.62	16.58 \pm 0.39
MCHC (g/dl)	33.26 \pm 0.46	31.56 \pm 0.60**	33.21 \pm 0.62 [#]
PLT ($10^3/\mu\text{l}$)	721.66 \pm 7.99	688.00 \pm 7.11	701.83 \pm 2.19
VMP	9.50 \pm 0.43	9.40 \pm 0.42	9.73 \pm 0.46

Values are given as mean \pm SD for groups of 6 animals each. Significant difference; All treated groups compared to the controls one (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$); $\text{AlCl}_3 + \alpha\text{-LA}$ group compared to the AlCl_3 treated one ([#] $p \leq 0.05$, ^{##} $p \leq 0.05$).

Effects of treatments on plasma biochemical markers

Table 4 showed some biochemical indexes which indicated liver injury in rats. AlCl_3 treated rats data



showed a significant increase in plasma AST, ALT, ALP, LDH and total bilirubin by 94%, 29%, 56%, 37%, and 28% respectively compared with control group and then by 50%, 45%, 50% and 22% compared to those of AlCl_3 + α -LA treated group, while albumin and total protein were decreased in AlCl_3 treated group by 27% and 11% compared to the control one and by 28.734% and 3.28% compared to the AlCl_3 + α -LA group.

Table 4: Effects of treatments on some biochemical parameters in plasma of control and treated rats

Parameters and treatments	Control	AlCl_3	AlCl_3 + α -LA
AST (U/L)	152.71 \pm 4.72	296.571 \pm 1.88**	197.32 \pm 7.32###
ALT (U/L)	162.368 \pm 3.94	209.506 \pm 5.67*	144.49 \pm 10.24###
ALP (U/L)	113.253 \pm 2.14	177.478 \pm 8.09***	117.68 \pm 1.17###
LDH (U/L)	704.833 \pm 5.44	964.5 \pm 5.97***	882.66 \pm 4.62**
Total bilirubin (mg/l)	1.6 \pm 0.01	2.05 \pm 0.28*	1.683 \pm 0.01##
Albumin (g/dl)	43.09 \pm 3.20	31.195 \pm 7.14**	43.77 \pm 2.02##
Total protein (g/dl)	92.69 \pm 4.12	82.266 \pm 5.93**	85.06 \pm 5.55

Values are given as mean \pm SD for groups of 6 animals each. Significant difference; All treated groups compared to the controls one (* p \leq 0.05, ** p \leq 0.01, *** p \leq 0.001); AlCl_3 + α -LA group compared to the AlCl_3 treated one (## p \leq 0.05, ### p \leq 0.001).

Effects of treatments on lipid peroxidation

MDA levels in liver tissue (Figure 1) were increased in AlCl_3 -treated group compared to those of AlCl_3 + α -LA-treated group (12%) and the control (21%) ones. AlCl_3 + α -LA-treated rats did not show any significant changes in liver MDA level compared to the control.

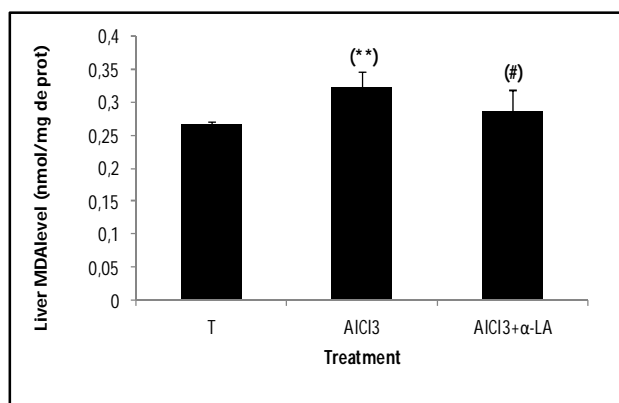


Figure 1: Liver homogenate malondialdehyde (nmol/mg protein) levels of control and treated rats. Values are given as mean \pm SD for groups of 6 animals each. Significant difference: All treated groups compared to the controls one (** p \leq 0.01). AlCl_3 + α -LA group compared to the AlCl_3 treated one (# p \leq 0.05).

Effects of treatments on GSH content

Results in Figure 2 Showed changes of GSH levels in liver tissue which indicated liver oxidative injury. Exposure rats to AlCl_3 produced a significant decline in GSH levels

compared to those of AlCl_3 + α -LA-treated group (14%) and the control (22%) ones.

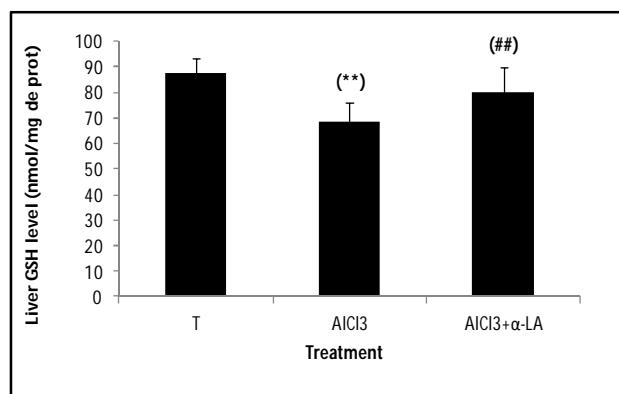
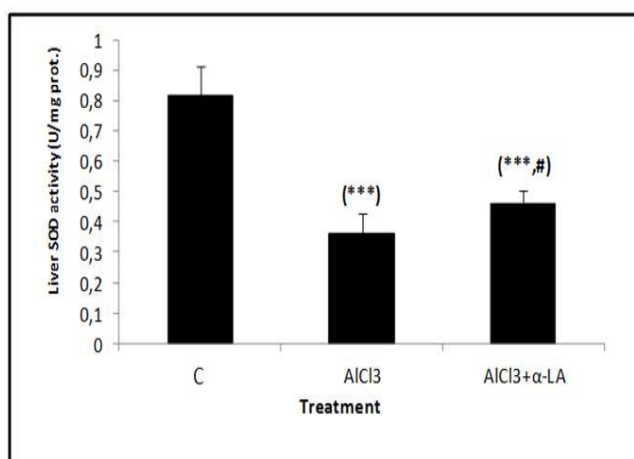
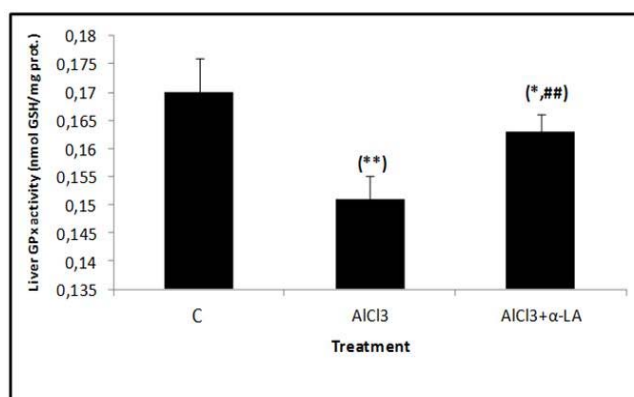


Figure 2: Liver homogenate reduced glutathione (nmol/mg protein) levels of control and treated rats. Values are given as mean \pm SD for groups of 6 animals each. Significant difference: All treated groups compared to the controls one (** p \leq 0.01). AlCl_3 + α -LA group compared to the AlCl_3 treated one (## p \leq 0.01).

Effects of treatments on antioxidant enzyme activities

Results in Figure 3 showed Changes of GPx, SOD and CAT activities in liver tissue which indicated liver oxidative damage. Exposure rats to AlCl_3 produced a significant decline in GPx, SOD and CAT enzyme activities compared to those of control group. In contrast, treatment with 35 mg/kg of α -lipoic acid resulted in a significant amelioration of 4-43% in the enzyme activities (GPx, SOD and CAT).



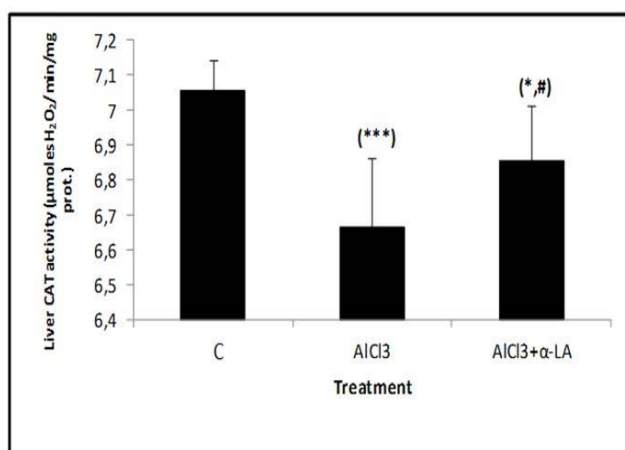


Figure 3: Liver homogenate glutathione peroxidase (nmoles of GSH/min/mg protein), superoxide dismutase (U/mg de protein) and catalase (μ moles H_2O_2 /min/mg protein) activities of control and treated rats. Values are given as mean \pm SD for groups of 6 animals each. Significant difference: All treated groups compared to the controls one ($p \leq 0.05$), ($**p \leq 0.01$), ($***p \leq 0.001$). $AlCl_3 + \alpha$ -LA group compared to the $AlCl_3$ treated one ($^{\#}p \leq 0.05$), ($^{\#\#}p \leq 0.01$).

DISCUSSION

In our experimental study, reduction in body weight is used as an indicator for the deterioration of rat general health status. It has been reported that $AlCl_3$ could induce toxicological effects and biochemical dysfunctions representing serious health hazards.^{2,25,26} The findings from the present work indicate that excessive $AlCl_3$ exposure has changed body weight, absolute and relative liver weights, leading however to significant decrease in animal growth and production performances. This could be probably attributed to the reduction of feed consumption and/or malabsorption of nutrients induced by $AlCl_3$ effects on the gastro-intestinal tract and/or inhibition of protein synthesis.^{2,25,26} $AlCl_3$ exposure may account to reduced food intake seen in the $AlCl_3$ -treated group. Hence, these findings were similar to the results published by El-Demerdash, and Zhu et al.^{1,26} who reported that high Al exposure have significantly induced disturbances of the total body weight, absolute and relative liver weights of rats. Accordingly, among the main approaches used to ameliorate Al-induced hepatotoxicity is the use of agents with powerful antioxidant properties. However, recent studies have reported that lipoic acid showed significant protective effects against tissue damage induced by some xenobiotics like arsenic^{8,27}, Bisphenol A²⁸ and adriamycin.¹⁷

The co-administration of lipoic acid attenuated the in vivo effects of $AlCl_3$ by scavenging or neutralizing ROS. These results indicated that α -LA might have a beneficial role in lowering $AlCl_3$ toxicity probably due to its radical scavenging property. Thus, α -LA treatment corrects the body weight slow-down and the relative liver weight increases. This may be attributed to an increases food intake and /or lipoic acid capability to interfere with the

absorption of $AlCl_3$ in the intestine. It can also be suggested that both α -LA and DHLA chelate heavy metals, restricts the molecular damage and reduce hepatic injury.

Exposure rats to $AlCl_3$ decreased hematological parameters (RBCs and Hb) and developed anemia in rats. Our experimental were in line with previous reports which demonstrated that heavy metals exposure altered hematological parameters in rats^{29,30} In fact, according to the earlier reports^{29,31,32} this anaemia could be explained by the inhibition of erythropoiesis and/or haemoglobin synthesis reduction, the same reports indicate that $AlCl_3$ could be interfering with Fe incorporation to the heme group witch induce Fe deficiency and reduce heme synthesis. Also the observed microcytic anaemia it might be due to an increase in the rate of erythrocytes destruction in haematopoietic organs. So, $AlCl_3$ might be crossing the erythrocyte membrane which is a result of its ability to initiate a lipid peroxidation.^{2,5,30} In our study, $AlCl_3$ -treated rats also exhibited significantly higher WBC compared with controls rats. This increase might be indicative of the activation of defence and immune system showed that there were oedema and inflammation in the tissues.⁵

The results of the present study showed that α -LA supplementation has potentially beneficial effects on haematological system. Our results are similar to a previous studies reported by Caylak et al.³³ In fact, this beneficial effect are probably due to the direct chelating activity of α -LA which have possibility to decrease the $AlCl_3$ concentration in blood cells and inhibit its entry into erythrocytes, resulting an increase of Fe and facilitate its incorporation to the hem group. It could be also related to the anti-inflammatory effects of α -LA reported in several prior studies.^{11,34}

The disturbance in the transport function of the hepatocytes as a result of hepatic injury causes the leakage of enzymes from the liver cytosol into the blood due to altered permeability of membrane. In this work, $AlCl_3$ -treated rats showed a significant increase in plasma levels AST, ALT, ALP and LDH, which confirmed the liver injury or dysfunction these results are in line with that reported by El-Demerdash¹ and Gaskill et al.¹⁵ Also, increases enzymes plasma levels may be due to the disturbance in the balance between biosynthesis and degradation of these enzymes.^{35,36} Additional effects of $AlCl_3$ treatment revealed decreased plasma total protein, albumin and increased total bilirubin as compared to control. This data are in agreement with previous studies.^{15,36} So, the significant decrease in the concentration of the albumin could be attributed on the one hand to an under nutrition and on the other hand to a reduction of the protein synthesis in the liver results a decreasing plasma total protein which confirmed the direct damaging effect of $AlCl_3$ on liver cells.^{2,36} The increase in plasma total bilirubin may result from decreased liver uptake, conjugation or increased bilirubin production from haemolysed. El-Sharaky et al.³⁷ found that

the induction rat in bilirubin was associated with free radical production.

On the other hand, lipoic acid prevent the increase in the activities of these enzymes is the primary evidence of their hepatoprotective activity.⁷ In the present finding, lipoic acid co-administration produced an effective action against the hepatocytes damaging effects, as shown by a decrease of the elevated plasma hepatic key enzymes (AST, ALT, ALP and LDH) and by a normalisation of albumin, total protein and total bilirubin. The mechanism proposed to explain these results could be attributed to α -LA preventive effects against $AlCl_3$ induced damages in rats hepatocytes.^{7,14} So, the α -LA prevents cellular necrosis as well as the membrane failure, this hepatoprotective effects might be related to both its radical scavenging proprieties and indirect effect as a regulator of antioxidative systems.^{16, 17, 25}

The increased level of MDA in $AlCl_3$ treated rats could be linked to the peroxidation damages of biological membranes, caused by an increased reactive Fe^{+2} .^{2, 38, 39} According to Newairy et al.,¹⁵ and Wu et al.³⁹ study's, aluminium is able to be bound by the Fe^{+3} carrying transferrin protein because of most closely Al^{+3} ionic radical resemble those of Fe^{+3} , results an accumulation of Fe^{+2} in cells. Besides^{1, 38} reported that an increased MDA concentration could be caused by inactivation of enzymes involved in antioxidant system such as GPx, SOD and CAT activities. In fact, $AlCl_3$ accumulation induced alteration of zinc and copper homeostasis and decreasing its binding ability to the antioxidant enzymes which caused antioxidant enzymes dysfunction. The decreasing GSH activity might be related to the inhibitor $AlCl_3$ effect on Glutamyl-cysteine-synthetase activity, the enzyme that controls the biosynthesis of glutathione in liver, thus resulting a reduction in GSH synthesis. This might be coupled to the aluminium inhibiting ability of NADPH-generating enzymes such as glucose 6-phosphate dehydrogenase and NADP-isocitrate dehydrogenase, resulting a slowing down in the GSH regeneration.¹⁵ Oxidative stress occurred as a consequence of imbalance between the production of reactive oxygen species and the antioxidative process in favor of radical production. In the current study, the significant decrease in the antioxidant enzyme activities (GPx, SOD and CAT) in liver proved the failure of antioxidant defense system to overcome the influx of reactive oxygen species generated by Al exposure. α -LA supplementation produced protective effect against antioxidant defense system failure our result is in agreement with data reported from similar studies on rats.^{8, 28} This study suggested that α -LA antioxidants capacity may be due to its ability to chelate both heavy and transition metals, to scavenge reactive oxygen species by the sulphhydryl group to regenerate endogenous antioxidants (such as vitamin C, vitamin E, and GSH) and to repair oxidative damage of cellular macromolecules which prevent the increase in lipid peroxidation level and increasing the antioxidants enzymes activities. Several reports^{8, 9, 14} evidenced that a

combination of α -LA could prevent GSH depletion by scavenging reactive oxygen species and /or increasing cysteine uptake, which is a rate limiting step for GSH biosynthesis.

CONCLUSION

This study clearly indicates that $AlCl_3$ affects both haematological and biochemical parameters as well as antioxidative system inducing oxidative stress. Co-administration of α -LA ameliorates this disturbance. In fact, the ameliorative effect of α -LA against oxidative stress in $AlCl_3$ treated rats due to its antioxidant propriety by scavenging free radical and chelating metals as well as regeneration of endogenous antioxidant. Nevertheless, further studies are needed to investigate the precise mechanism(s) of action of α -LA on oxidative stress biomarkers in rat under $AlCl_3$ intoxication.

Acknowledgments: The present research was supported by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research, Directorate General for Scientific Research and Technological Development through the Research Laboratory of "Laboratory of Biochemical and Environmental Toxicology" Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria

REFERENCES

1. El-Demerdash FM, Antioxidant effect of vitamin E and selenium on lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters in rats exposed to aluminium, Trace elements in medicine, 18, 2004, 113-121.
2. Lukyanenko LM, Skarabahaatava AS, Slobozhanina EI, Kovaliova SA, Falcioni ML, *In vitro* effect of $AlCl_3$ on human erythrocytes: changes in membrane morphology and functionality, J Trace Elem Med Biol, 27, 2013, 160-167.
3. Prakash A, Kumar A, Effect of N-acetyl cystein against aluminium induced cognitive dysfunction and oxidative damage in rats, Basic Clin Pharmacol Toxicol, 105, 2009, 98-104.
4. Guo C, Hsu GW, Chuang C, Chen P, Aluminium accumulation induced testicular oxidative stress and altered selenium metabolism in mice, Environl Toxicol Pharmacol, 27, 2009, 176-181.
5. Mahdy KA, Farrag ARH, Amelioration of aluminium toxicity with black seed supplement on rats, Toxicol Environ Chem, 91, 2009, 567-579.
6. Ghibu S, Richard C, Delemasure S, Vergely C, Mogosan C, Muresan A, An endogenous dithiol with antioxidant properties: Alpha-lipoic acid, potential uses in cardiovascular diseases, Anal Card Angéiol, 57, 2008, 161-165.
7. Saad EI, El-Gowilly SM, Sherhaa MO, Bistawroos AE, Role of oxidative stress and nitric oxide in the protective effects of α -lipoic acid and aminoguanidine against isoniazid-rifampicin-induced hepatotoxicity in rats, Food Chem Toxicol, 48, 2010, 1869-1875.
8. Kokilavani V, Devi Ma, Sivarajan K, Panneerselvan C, Combined efficacies of DL- α -lipoic acid and meso-2,3 dimercaptosuccinic acid against arsenic induced toxicity in antioxidant systems of rats, Toxicol Lett, 160, 2005, 1-7.



9. Winiarska K, Malinska D, Szymanski K, Dudziak M, Bryle J, Lipoic acid ameliorates oxidative stress and renal injury in alloxan diabetic rabbits, *Biochim*, 90, 2008, 450-459.
10. Moraes TB, Zanin F, Rosa AD, Oliveira AD, Coelho J, Petrillo F, Wajner M, Dutrafilho CS, Lipoic acid prevents oxidative stress in vitro and in vivo by an acute hyper phenylalaninemia chemically-induced in rat brain. *Neur Sci*, 292, 2010, 89-95.
11. Navari-Izzo F, Quartacci MF, Sgherri C, Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species, *Plant Physio Biochem*, 40, 2002, 463-470.
12. Yi X, Nickleit V, James LR, Maeda N, α -lipoic acid protects diabetic apolipoprotein E-deficient mice from nephropathy, *Diab Compl*, 25, 2011, 193-201.
13. Ganapthay A, Anthony J, Vartharjan S, Protective effect of lipoic acid on oxidative damage in cyclosporine A-inducing renal toxicity, *Int Immunopharmacol*, 7, 2007, 1442-1449.
14. Abdel-Zaher A, Abdel-Hady RH, Mahmoud MM, Farrag MMY, The potential role of alpha-lipoic acid against acetaminophen-induced hepatic and renal damage, *Toxicology*, 243, 2008, 261-270.
15. Newairy AL-SA, Salama AF, Hussien Hm, Yousef MI, Propolis alleviates aluminium induced lipid peroxidation and biochemical parameters in male rats, *Food Chem Toxicol*, 47, 2009, 1093-1098.
16. Malarkodi KP, Varalakshmi P, Lipoic acid as rescue agent for adriamycin-induced hyperlipidemic nephropathy in rats, *Nut Res*, 23, 2003, 539-548.
17. Prahalathan C, Selvakumar E, Varalakshmi P, Role of lipoic acid on adriamycin-induced testicular injury, *Chem Biol Int* 160, 2006, 108-114.
18. Buege JA, Aust SD, Microsomal lipid peroxidation, *Methods enzymol*, 105, 1984, 302-310.
19. Ellman GL, Tissue sulphhydryl groups, *Arch Biochem Biophys*, 82, 1959, 70-77.
20. Jollow DJ, Mitchel JR, Zampaglione Z, Gillette JR, Bromobenzene induced liver necrosis. Protective role of glutathione and evidence for 3,4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolites, *Pharmacology*, 11, 1974, 51-57.
21. Flohe L, Gunzler WA, Analysis of glutathione peroxidase, *Methods Enzymol*, 105, 1984, 114-121.
22. Aebi H, Catalase in vitro, *Method Enzymol*, 105, 1984, 121-126.
23. Asada K, Takahashi M, Nagate M, Assay and inhibitors of spinach superoxide dismutase, *Agric Biol Chem*, 38, 1974, 471-473.
24. Bradford M, A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding, *Anal Biochem*, 72, 1976, 248-254.
25. Koizumi MH, Fujii S, Ono A, Hirose A, Imai T, Ogawa K, Ema M, Nishikawa A, Two generation reproductive toxicity study of aluminium sulphate in rats, *Reprod Toxicol*, 31, 2010, 219-230.
26. Zhu Y, Li X, Chen C, Wang F, Li J, Hu C, Li Y, Miao L, Effects of aluminium trichloride on the trace elements and cytokines in the spleen of rats, *Food Chem Toxicol*, 50, 2012, 2911-2915.
27. Shila S, Kokilavani V, Subathra M, Panneerselvam C, Brain regional responses in antioxidant system to α -lipoic acid in arsenic intoxicated rat, *Toxicology*, 210, 2005, 25-36.
28. El-Beshbishy HA, Aly HAA, El-Shafey M, Lipoic acid mitigates bisphenol A-induced testicular mitochondrial toxicity in rats, *Toxicol Ind health*, 29, 2012, 875-887.
29. Flora SJS, Mehta A, Satsangi K, Kannan GM, Gupta M, Aluminium induced oxidative stress in rat brain response to combined administration of citric acid and HEDTA, *Comp Biochem Physiol*, 134, 2003, 319-328.
30. Farina M, Ratta LN, Soares FAA, Jardim F, Jacques R, Souza DO, Rocha JBT, Haematological changes in rats chronically exposed to oral aluminium, *Toxicology*, 209, 2005, 29-37.
31. Mahieu S, Millen N, Gonzelez M, Contini MDC, Elias MM, Alteration of the renal function and oxidative stress in renal tissue from rats chronically treated with aluminium during the initial phase of hepatic regeneration, *J Inorg Biochem*, 99, 2005, 1858-1864.
32. Shrivastava S, Combined effect of HEDTA and selenium against aluminium induced oxidative stress in rat brain, *J Trace Elem Med Biol*, 26, 2012, 210-214.
33. Caylak E, Aytakin M, Halifeoglu I, Antioxidant effects of methionine, α -lipoic acid, N-acetylcysteine and homocysteine on lead-induced oxidative stress to erythrocytes in rats, *Exp Toxicol Path*, 60, 2007, 289-294.
34. Shay KP, Mareau RF, Smith EJ, Smith AR, Hagen TM, Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential, *Biochim Biophys Acta*, 1790, 2009, 1149-1160.
35. Gaskill CL, Miller LM, Mattoon JS, Hoffman WE, Burton SA, Gelens HCJ, Ihle SL, Miller JB, Shaw DH, Cribb AE, Liver histopathology and liver serum alanine aminotransferase and alkaline phosphatase activities in epileptic dogs receiving phenobarbital, *Vet Pathol*, 42, 2005, 147-160.
36. Yousef MI, Kamel IK, Esmail AM, Baghdadi HH, Activities and lipid lowering effects of isoflavone in mal rabbits, *Food Chem Toxicol*, 42, 2004, 1497-1503.
37. El-Sharaky AS, Newairy AA, Badreldeen MM, Eweda SM, Sheweita SA, Protective role of selenium against renal toxicity induced by cadmium in rats, *Toxicology*, 235, 2007, 185-193.
38. Nehru B, Anand P, Oxidative damage following chronic aluminium exposure in adult and pup rat brains, *Trace Elem Med and Biol*, 19, 2005, 203-208.
39. Wu Z, Du Y, Xue H, Wu Y, Zhou B, Aluminium induces neuro degeneration and its toxicity arises from increased iron accumulation and reactive oxygen species (ROS) production, *Neurobiol Aging*, 33, 2012, 1-12.

Source of Support: Nil, Conflict of Interest: None.

