

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Abderrahmane Mira de Bejaia  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Physico-Chimique

## Mémoire de master

Filière : Biologie

Option : Biochimie appliquée

### *Thème*

**Etude *in vitro* de la cytotoxicité et de la stabilisation membranaire érythrocytaire des alcaloïdes de la graine de *Nigella damascena*.**

Présenté par : Makhloufi Mounia et Teghanemt Imane

Encadré par : Mr BOUGUEZZA Y. (M.A.A)

#### Devant le Jury :

Président : Dr KHETTAL B. (M.C.B)

Examineurs : M<sup>me</sup> AMROUCHE W. (M.A.A)

M<sup>r</sup> TACHERFIOUT M. (M.A.A)

Promotion 2012-2013



## Remerciements

Nous remercions tout d'abord Dieu le tout puissant pour nous avoir donné la santé, la force, le courage et l'intelligence nécessaires pour réaliser ce modeste travail.

Nous tenons à remercier notre promoteur **M<sup>r</sup> BOUGUEZZA Y.** d'avoir cru en nous dès le début et de lui exprimer notre immense gratitude pour son encadrement, ses conseils, son soutien constant, sa générosité, sa disponibilité et sa patience ... Nous avons beaucoup appris à vos côtés. Merci de nous avoir fait découvrir les plaisirs du travail rigoureux, nous espérons pouvoir travailler avec vous dans le futur.

Nous remercions également **D<sup>r</sup> KHETTAL B.** de nous avoir accueilli au sein du laboratoire pédagogique d'Enzymologie et de nous avoir fait l'honneur de présider le jury et d'évaluer ce mémoire.

Nos vifs remerciements vont également à **M<sup>me</sup> AMROUCHE W.** et **M<sup>r</sup> TACHERFIOUT M.** d'avoir accepté de juger notre travail.

Nous tenons aussi à remercier tous nos professeurs et toute l'équipe pédagogique de l'université qui ont travaillé fermement pour nous permettre de suivre ce cursus.

Nous tenons aussi à remercier les techniciennes du laboratoire : **Saida et Habiba** ainsi qu'à toute l'équipe : **Lekhder, Nassim, Nabil, Karim, Sihame, Kouka, Tiziri et Sabrina** pour leur soutien .

De même nous remercions tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail, soit avec leur support, leur amitié ou leur amour.





# *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A mes parents :*

*Papa, j'ai toujours trouvé auprès de toi, compréhension et soutien, tes conseils ne m'ont jamais fait défauts tout au long de mes études. Trouve a travers se modeste travail, la recompose de ton affection, de tes sacrifices et de ta patience.*

*Maman, les mots me manque pour t'exprimer toute ma reconnaissance. Ce travail est également le fruit de ton amour, tes bénédictions et surtout la bonne éducation. Je voudrais a travers se modeste travail, te dire que sans toi je ne serais jamais ce que je suis aujourd'hui et te dire combien je suis fière de l'éducation que tu nous a donnée.*

*A ma sœur Roza , à mes chères frères Anis et Imsis .*

*A toute ma famille : mes tantes, mes oncles, mes cousins et cousines*

*A tous mes amies pour leur soutien, leur aide et pour l'ambiance studieuse fraternelle et sympathique qui a toujours régné entre nous ainsi qu'a ma meilleure amie Aida pour sa présence à mes cotes.*

*A toute ma promotion de Master 2 biochimie appliquée 2013*

*A tous ceux qui m'ont aidé de loin ou de près durant mes études.*

Mounia





# *Dédicaces*

*Je dédie ce travail*

*A ma Mère a qui j'adresse ma plus profonde gratitude et tous mon amour, qui a su me faire confiance et me soutenir, qui n'a pas cessé de m'encourager durant toutes mes années d'études Les mots ne suffisent pas et n'exprimeront pas tout ce que j'aimerais te dire j'espère pouvoir te rendre une petite partie de ton amour, tu es la personne la plus chère au monde*

*Je dédie aussi ce travail à mon père qui sans lui je ne serai jamais ce que je suis aujourd'hui. Trouve à travers ce modeste travail mon profond respect et mon affection*

*A ma sœur unique " Sarah "*

*A mes chères tantes et mes chers oncles*

*A mes chères cousines et chers cousins*

*A tous mes amis pour leur soutien, leur aide et pour l'ambiance studieuse fraternelle et sympathique qui a toujours régné entre nous*

*A mes collègues de travail pour leur soutien moral ainsi qu'à " Hakima " pour sa compréhension.*

*A toute ma promotion de Master 2 biochimie appliquée 2013*

*Enfin à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

Imene



# SOMMAIRE

# SOMMAIRE

Liste des abréviations.....	i
Liste des figures.....	ii
Liste des tableaux.....	iii
Introduction.....	1

## Partie I : Synthèse bibliographique

### Chapitre I : Généralités sur la plante de *Nigella damascena* et ses alcaloïdes

I. Description botanique de <i>Nigella damascena</i> .....	2
I.1.1. Effet thérapeutique de <i>Nigella damascena</i> .....	3
I.2 Les alcaloïdes .....	4
I.2.1. Généralités .....	4
I.2.2. État naturel .....	4
I.2.3. Distribution .....	5
I.2.4. Classification .....	5
I. 2.4.1. Classification selon l'hétérocycle .....	5
I.2.4.2. Classification selon l'origine biosynthétique .....	6
I.2.5. Propriétés physico-chimiques des alcaloïdes .....	7
I.2.6. Rôle biologique et pharmacologique des alcaloïdes .....	7
I.2.7. Alcaloïdes de <i>Nigella damascena</i> .....	8
I.3. Toxicité de la plante .....	8

### Chapitre II : Cytotoxicité

II. 1. Généralités sur la cytotoxicité.....	9
II. 2. Mécanismes de la cytotoxicité .....	9
II. 2.1. Effets sur la membrane cellulaire et sur le transport membranaire.....	9
II. 2.2. Effets nucléaires et sur la prolifération cellulaire .....	10
II. 2.3. Effets mitochondriale et homéostatique énergétique .....	10
II. 2.4. Métabolites réactifs, stress oxydatif, et médiation immunitaire.....	11
II. 2.5. Système de régulation du calcium .....	11
II. 2.6. Effets lysosomale et autophagique .....	12
II.3. L'érythrocyte .....	13

<b>II.3. 1.</b> Structure de l'érythrocyte .....	<b>13</b>
<b>II.3. 1.1.</b> La membrane cytoplasmique .....	<b>13</b>
<b>II.3. 1.2.</b> Le cytosquelette érythrocytaire.....	<b>14</b>
<b>II.3. 1.2.</b> Les enzymes érythrocytaires .....	<b>14</b>
<b>II.3. 1.4.</b> Hémoglobine .....	<b>14</b>
<b>II.3. 1.4.1.</b> L'hème .....	<b>14</b>
<b>II.3.1.4.2.</b> La globine .....	<b>15</b>
<b>II.3.1.4.3.</b> Fonctions de l'hémoglobine .....	<b>16</b>
<b>II.3.1.4.4.</b> Propriétés spectral de l'hémoglobine .....	<b>16</b>
<b>II.3.2.</b> Vie et mort des érythrocytes .....	<b>17</b>
<b>II.4.</b> Mécanisme de l'hémolyse .....	<b>17</b>
<b>II.5.</b> Les érythrocytes comme model d'étude de la cytotoxicité .....	<b>19</b>
<b>II.5.1.</b> Limitations des méthodes de la cytotoxicité in vitro.....	<b>19</b>

<b>Partie II : Travail expérimental</b>
---

<b>III.1.</b> Matériel et méthodes.....	<b>20</b>
<b>III.1.1.</b> Collecte des graines.....	<b>20</b>
<b>III.1.2.</b> Extraction des alcaloïdes totaux.....	<b>20</b>
<b>III.2.</b> Caractérisation des alcaloïdes et de l'hémoglobine.....	<b>22</b>
<b>III.2.1.</b> Révélation chimique des alcaloïdes par le réactif Dragendroff ..	<b>22</b>
<b>III.2.2.</b> Analyse par spectrophotométrie d'absorbance UV/Visible.....	<b>22</b>
<b>III.2.2.1.</b> Alcaloïdes totaux.....	<b>22</b>
<b>III.2.2.2.</b> Hémoglobine.....	<b>22</b>
<b>III.3.</b> Etude de la cytotoxicité des alcaloïdes totaux <i>in vitro</i> .....	<b>22</b>
<b>III.3.1.</b> Teste hémolytique .....	<b>22</b>
<b>III.3.1.1.</b> Principe.....	<b>22</b>
<b>III.3.1.2.</b> Isolement des érythrocytes.....	<b>22</b>
<b>III.3.1.3.</b> Préparation des solutions standards .....	<b>23</b>

III.3.1.4. Etude de l'hémolyse .....	23
III.3.1.5. Observation microscopique.....	24
III.3.2. Etude de la fragilité osmotique.....	24
III.3.2.1. Principe .....	24
III.3.2.2. Mode opératoire .....	24
III.4. Analyse statistique.....	25
 <b>Chapitre III Résultats et discussions...</b>	
IV.1. Extraction des alcaloïdes totaux.....	26
IV.1.2. Identification des alcaloïdes totaux .....	26
VI.1.3. Spectre d'absorbance des alcaloïdes totaux.....	26
VI.1.4. Spectre d'absorbance de l'hémoglobine.....	27
IV.2. Test d'hémolyse.....	28
IV.2.1. Visualisation à l'œil nu.....	28
IV.2.2. Dosage de l'hémoglobine et pourcentage d'hémolyse.....	28
IV.2.3. Observation microscopique.....	30
IV.3. La fragilité osmotique .....	31
IV.3.1. Visualisation à l'œil nu.....	31
IV.4. Discussion générale.....	33
Conclusion.....	34
 Références bibliographiques	
Glossaire	

## Liste des figures

N°	Titre	Page
1	La fleur de <i>Nigella Damascena</i>	2
2	Structure chimique de la damascenine	8
3	Frottis de sang normal coloré au May Grunwald Giemsa (MGG) avec un grossissement $\times 1\ 000$	13
4	Schéma de la membrane érythrocytaire	14
5	Représentation de la structure tridimensionnelle de la molécule d'hémoglobine adulte (HbA)	15
6	Spectre d'absorbance de l'oxyhémoglobine, hémoglobine, carboxyhémoglobine et méthémoglobine	17
7	Graine de <i>Nigella damascena</i>	20
8	Protocole d'extraction des alcaloïdes totaux de <i>Nigella damascena</i>	21
9	Coloration orange des alcaloïdes en présence du réactif dragendroff	26
10	Spectre d'absorption des alcaloïdes de <i>Nigella damascena</i> solubilisés dans l'éthanol (200 $\mu$ g/ml)	27
11	Spectre d'absorption de l'hémoglobine	27
12	Processus hémolytique par déversions de l'hémoglobine	28
13	Pourcentage d'hémolyse érythrocytaire en présence et en absence des différentes concentrations d'alcaloïdes et du Triton X-100	29
14	Absorbance de l'hémoglobine à 415nm en présence et en absence des différentes concentrations d'alcaloïdes et du Triton X-100	29
15	Images par Microscopie optique de la morphologie érythrocytaire en absence et en présence des alcaloïdes totaux de la graine de <i>Nigella damascena</i> .	30
16	Processus hémolytique par déversions de l'hémoglobine (ici concernant le control).	31
17	Courbes et histogramme représentant d'effet des différentes concentrations d'alcaloïdes (500 et 1000 $\mu$ g) sur la fragilité membranaire en fonction des concentrations du NaCl.	32

## Liste des tableaux

N°	Titre du tableau	Page
<b>I</b>	Systématique de l'espèce de <i>Nigella damascena</i>	<b>3</b>
<b>II</b>	Les différentes classes des alcaloïdes hétérocycliques	<b>6</b>
<b>III</b>	Les différentes classes d'alcaloïdes d'origine biosynthétique	<b>6</b>
<b>IV</b>	Effets physiologiques de quelques alcaloïdes	<b>7</b>
<b>V</b>	Exemple de travaux effectué sur la cytotoxicité érythrocytaire	<b>19</b>

**Liste des abréviations**

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**MGG** : May Grunwald Giemsa

**ADN** : Acide Désoxyribo-Nucleique

**DI 50** : Dose létale 50

**GR** : Globule rouge

**Hb** : Hémoglobine

**HbO<sub>2</sub>** : Oxyhémoglobine

**ATP** : Adénosine Triphosphate

**EDTA** : Acide Ethylenediaminetetraacétique

**CE 50** : concentration effectrice 50

# INTRODUCTION

# INTRODUCTION

---

Au cours des temps l'homme a dû faire face à une impérieuse nécessité de distinguer les plantes utiles de celles qui tuent. Les plantes médicinales, remède naturel, sont bien souvent très efficaces avec moins d'effets secondaires reconnus que beaucoup de médicaments de synthèse mais peuvent néanmoins être mortels ou toxiques pour l'organisme (**Aniszewski, 2007**).

*Nigella damascena* est une plante orientale herbacée annuelle, de la famille des Renonculacée qu'on peut rencontrer dans les régions du pourtour du bassin méditerranéen (**Schmauder and Doebel, 1991**). Cette espèce est connue pour ces effets thérapeutiques utilisés en médecine traditionnelle pour le traitement des affections catarrhales comme diurétique et oestrogénique (**Fico et al, 2004**).

Plusieurs études ont été faites afin de déceler les différents constituants chimiques de la graine de *Nigella damascena*, comme les flavonoïdes, saponines, les alcaloïdes ainsi que de leurs effets biologiques. On ne dispose que de peu de données toxicologiques sur *Nigella damascena*. La quasi-totalité n'est que des informations non référencées. À l'heure actuelle seule, les travaux de **Bouguezza et al., (2013)** ont fait l'objet du profil toxicologique de la graine de cette plante.

Tôt dans la découverte de médicaments, la cytotoxicité *in vitro* est de plus en plus reconnue comme un moyen efficace indicateur du potentiel de toxicité humaine. Une des méthodes les plus directes pour étudier la cytotoxicité des molécules est d'étudier leurs propriétés hémolytiques. Le modèle de la cytotoxicité érythrocytaire a été validé par plusieurs travaux. À titre d'exemples, on peut citer les polyphénols antioxydants du thé vert et noir (**Grinberg et al., 1997**), l'epicactéchine (**Zhang et al., 1997**), les stéryles glycosides à partir de tubercules de *Momordica Cochinchinensis* (**Ng et al., 1986**), les saponines triterpénoïdes de *Solidago Vir aurea*, *Heteropappus altaicus*, *H. biennis*, et *Helianthus annuus* (**Bader et al., 1996**).

L'objectif de ce travail est d'évaluer la cytotoxicité ainsi que la stabilisation membranaire érythrocytaire des alcaloïdes totaux de la graine de *Nigella damascena in vitro*.

# *Synthèse bibliographique*

### I.1. Description botanique de *Nigella Damascena*

*Nigella damascena* est une plante annuelle sauvage, très rustique et de croissance rapide, poussant dans les régions du pourtour du bassin méditerranéen (Schmauder and Doebel, 1991). Elle appartient à la famille des Renonculacées (tableau I) et au genre *Nigella* qui inclue environ 20 espèces (Tulukcu, 2011) et comporte plusieurs nomenclatures comme Cheveux de Vénus - Barbe des Capucins - Patte d' Araignée - Barbiche - Cheveux d' Ange - Cumin Noir - Miss Jekyll - Love in a Mist... etc (Heiss and Oeggl, 2005).

*Nigella damascena* est une plante herbacée aux feuilles finement divisées en lanières filiformes. Sa hauteur atteint en moyenne 20 à 40 cm et ses fleurs élégantes de 1.5 à 3 cm de diamètre de couleur bleu, bleu clair, rose et blanche sont entourées par les minces lanières vertes, avec périanthe simple à 5 pétales étroits elliptiques, à courte tige. À l'intérieur, 5 feuilles de nectaire foncé à deux lèvres, nombreuses étamines, un ovaire et les fruits décoratifs en forme de capsule globuleuse qui renferme des petites graines de couleur noire ovoïde et aplanie à 3 faces (figure 1) (Palese and Aexmoun, 1990). Cette graine est issue d'une pseudo-capsule globuleuse très lisse contenant cinq ou six follicules entièrement soudés jusqu'au sommet des graines (Heiss and Oeggl, 2005). La graine a la saveur piquante et à odeur de fraise sert d'aromates comme les graines de sa parente la nigelle cultivée (Agradi et al., 2001).



Figure 1 : La fleur de *Nigella Damascena* (Jabbour et al., 2009 )

Tableau I : Systématique de l'espèce de *Nigella damascena* (Guignard, 2001).

Rang	Nomenclature
Règne	Végétale
Sous règne	Cormophyte
Supra embranchement	Rhizophyte
Embranchement	Spermaphyte
Sous embranchement	Angiosperme
Classe	Eudicotylédone
Sous classe	Audicots archaïques
Ordre	Ranunculales
Famille	Renonculacées
Sous famille	Helloboroidées
Genre	<i>Nigella</i>
Espèce	<i>Nigella Damascena</i>

### I.1.1.Effets thérapeutiques de *Nigella damascena*

Les graines de *Nigella damascena* sont utilisées en phytothérapie orientale pour le traitement des affections catarrhales, comme diurétique et comme sternutatoire. Plusieurs études dans la littérature ont rapporté des propriétés pharmacologiques telles que les effets :

- Antipyrétique et analgésique (Bekemeier et al., 1967)
- Oestrogénique (Agardi et al., 2001)
- Antimicrobienne (Fico et al., 2004)
- Anti-oxydante (Javorcova et al., 2011)

## I.2. Les alcaloïdes

### I.2.1. Généralités

Les alcaloïdes sont des molécules organiques hétérocycliques azotées, plus au moins basiques, pour la plupart, ils ont des actions physiologiques et thérapeutiques à faibles doses, cependant ils deviennent très toxiques à fortes doses. On trouve des alcaloïdes, en tant que métabolites secondaires, principalement chez les végétaux, les champignons et quelques groupes d'animaux peu nombreux (Bruneton, 1999 ; Magedov and Kornienko, 2012).

On distingue (Bruneton, 1999 ; Guignard, 2000) :

- ❖ **Les vrais alcaloïdes** : qui sont des substances d'origine naturelle et de distribution restreinte, de structure souvent complexe, azotée (atome d'azote inclus dans un hétérocycle) et de caractère basique. Ils existent dans la plante sous forme de sels, ont pour origine biosynthétique un acide aminé et sont dotés d'une activité pharmacologique significative.
- ❖ **Les pseudo-alcaloïdes** : qui sont des métabolites présentant les caractéristiques des alcaloïdes vrais, excepté leur origine biosynthétique. Dans la majorité des cas connus, ce sont des dérivés d'isoprénoïdes (alcaloïdes terpéniques) et du métabolisme de l'acétate.
- ❖ **Les proto-alcaloïdes** : qui sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique, ont une réaction basique et sont élaboré *in vivo* à partir d'acides aminés.

### I.2.2 État naturel

Pendant longtemps, les alcaloïdes ont été considérés comme des produits du métabolisme des végétaux seuls. En effet, les structures alcaloïdiques existent également chez les animaux (Bruneton, 2009).

- **Règne végétal** : Parmi les 400.000 espèces d'Angiospermes recensées, 10 à 15% synthétisent des alcaloïdes.
- **Règne animal** : Dans certains cas, ce sont des produits formés à partir d'alcaloïdes contenus dans les végétaux inclus dans la ration alimentaire de l'animal.

### I.2.3. Distribution

Certains alcaloïdes existent dans plusieurs genres appartenant à des familles différentes, parfois très éloignées taxonomiquement. D'autres sont caractéristiques d'un nombre limité de genres à l'intérieur d'une famille ou d'un groupe d'espèces à l'intérieur d'un genre, certains sont étroitement spécifiques. Les plantes à alcaloïdes ne renferment que très rarement un seul alcaloïde, elles livrent, le plus souvent, un mélange complexe, éventuellement dominé par un composé majoritaire. Il n'est pas rare que plusieurs dizaines d'alcaloïdes soient présents dans une même plante (**Bruneton, 2009**).

Pour une plante donnée, la teneur en alcaloïdes peut être très inégale selon les organes, certains pouvant en être dépourvus. Ils sont le plus souvent localisés dans les tissus périphériques : assises externes des écorces de tige et de racine, téguments des graines, etc. La basicité et les actions anti-métabolites de la plupart de ces molécules imposent leur compartimentation : elles sont normalement stockées dans les vacuoles cellulaires, que ces dernières s'effectuent au niveau de sites précis (laticifères) ou non. Le plus souvent, la synthèse de ces alcaloïdes s'effectue au niveau de site précis (racine en croissance, cellules spécialisées de laticifères) ; ils sont ensuite transportés dans leur site de stockage (**Bruneton, 2009**).

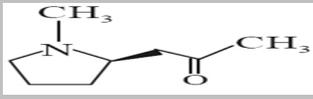
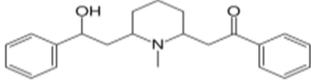
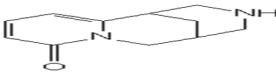
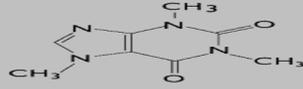
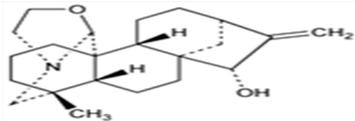
### I.2.4. Classification

Dans un premier temps, la classification a été principalement basée sur la structure du produit de départ, mais d'autres classifications sont basées sur leurs propriétés pharmacologiques, ou encore selon leurs biosynthèses et aussi sur leur squelette carboné (**Moreau, 1964**).

#### I.2.4.1. Classification selon l'hétérocycle

On les regroupe en plusieurs familles (**Tableau II**) (**Guignard, 1996**)

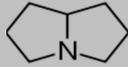
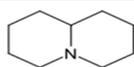
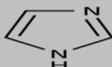
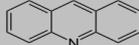
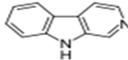
**Tableau II :** Les différentes classes des alcaloïdes hétérocycliques (Guignard, 1996)

Famille	Exemple
Alcaloïdes pyrrolidiques	Hygrine 
Alcaloïdes pyridiniques	Lobéline 
Alcaloïdes tropaniques	Tropanone 
Alcaloïdes quinolizidiniques	Cytisine 
Alcaloïdes pyrrolizidiniques	Caféine 
Alcaloïdes terpéniques	Veatchine 

**I.2.4.2. Classification selon l'origine biosynthétique**

Neuf acides aminés sont considérés comme précurseurs de diverses classes d'alcaloïdes qui sont regroupés dans le **tableau III (Bruneton, 1987)**

**Tableau III :** Les différentes classes d'alcaloïdes d'origine biosynthétique (Bruneton, 1987)

Classe	Exemple
Alcaloïdes dérivés de l'ornithine	Alcaloïdes à noyau pyrrolizidine 
Alcaloïdes dérivés de la lysine	Alcaloïdes à noyau quinolizidine 
Alcaloïdes dérivés de l'histidine et l'acide aspartique	Alcaloïdes à noyau imidazole 
Alcaloïdes dérivés du tryptophane	Alcaloïdes à noyau ergoline 
Alcaloïdes dérivés d'acide anthranilique	Alcaloïdes à noyau Acridine 
Alcaloïdes dérivés de L'arginine	Alcaloïdes à noyau β-carboline 

### I.2.5. Propriétés physico-chimiques des alcaloïdes

Leurs masses moléculaires varient entre 100 à 900 g/mol. La plupart des alcaloïdes sont doués de pouvoir rotatoire. La basicité des alcaloïdes est très variable et cette propriété étant étroitement en fonction de la disponibilité du doublet libre d'azote (exemple : chez les quinoléines, le doublet d'azote est disponible et la basicité est nette) (**Bruneton, 1987**).

La solubilité des alcaloïdes dans les différents solvants varie en fonction de plusieurs paramètres comme le pH. Sous forme de base ils sont solubles dans les solvants organiques non polaires (benzène, chloroforme) et sont solubles dans les solvants organiques polaires (alcool) et insoluble dans l'eau. Les alcaloïdes forment des sels avec les acides. Ils deviennent alors insolubles dans les solvants organiques apolaires et solubles dans les solvants organiques polaires et dans l'eau (**Hurabielle et Paris, 1980**).

### I.2.6. Rôle biologique et pharmacologique des alcaloïdes

Quoi qu'il en soit, les alcaloïdes ne se rencontrent pas dans toutes les plantes. Ceci exclut de leur attribuer un rôle général. Ils paraissent servir de moyen de dissuasion chimique contre les prédateurs (**Bruneton, 1999**). En pharmacologie, les alcaloïdes jouent un rôle important comme principes actifs des médicaments, malgré l'essor des produits de synthèses, il sont soit tels quels ou sous forme de dérivés plus actifs, où manifestant des effets différents dans des domaines plus variés (**Tableau IV**) (**Guignard, 2000; Marek et al., 2003**).

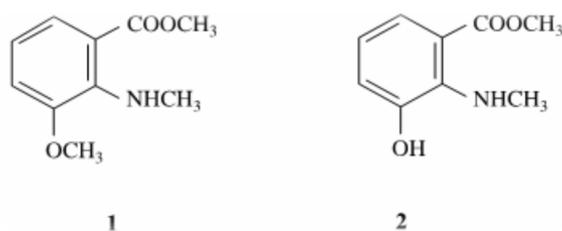
**Tableau IV:** Effets physiologiques de quelques alcaloïdes (**Marek et al., 2003**)

Alcaloïdes	Plante	Effet thérapeutique
Ajmaline	<i>Rauwolfia serpentina</i>	Antiarythmétique
Caféine	<i>Coffea arabica</i>	Stimulant du SNC
Camptothécine	<i>Camptotheca acuminata</i>	Anticancéreux
Éméline	<i>Uragoga ipecacuanha</i>	Amoebicide
Morphine	<i>P. somniferum</i>	Narcotique
Vinblastine	<i>Catharanthus roseus</i>	Antinéoplasique
Quinine	<i>Cinchona officinalis</i>	Antimalaria
Sanguinarine	<i>Eschscholzia californica</i>	Antibactérien

### I.2.7. Alcaloïdes de *Nigella damascena*

La graine de *Nigella damascena* est caractérisée par la présence d'un alcaloïde majoritaire, la damascenine qui représente une concentration de l'ordre de (0,1 – 0,7 %) du poids sec de la graine. Cet alcaloïde est synthétisé à partir du tryptophane via la voie de l'acide chikimique (Vishin et al., 1960).

La damascenine fut isolée pour la première fois par **Schneider** qui lui en donna la formule chimique moléculaire ( $C_{10}H_{15}NO_3$ ), mais la formule exacte connue aujourd'hui est ( $C_{10}H_{13}O_3N$ ) (**Figure 2**). Sa formule chimique détaillée est : [3-méthoxy-2-(méthylamino) ester méthylique de l'acide benzoïque] (Ewins, 1912). La damascenine est associée avec d'autres alcaloïdes en faible teneur tel que la damascinine (3-hydroxy-2-(méthylamino) benzoic acid methyl ester) ainsi que d'autres composés associés (Fico et al., 2004).



**Figure 2** : Structure chimique de la damascenine (1) : (3-methoxy-2-(methylamino) benzoic acid methyl ester) et damascinine (2) : (3-hydroxy-2-(methylamino) benzoic acid methyl ester) (Fico et al., 2004).

### I.3. Toxicité de la plante

Des études récentes *in vivo* concernant l'extrait méthanolique de la graine de *Nigella damascena* sur des souris Swiss Albinos au cours d'une évaluation de la toxicité aiguë et sub-chronique ont montré que la plante n'a aucun effet toxique. D'ailleurs aucune mortalité et comportement anormaux ont été observés durant la toxicité aiguë aux doses orales de 1, 2 and 5g/kg. Dans l'étude de la toxicité sub-chronique, les doses de 100 and 400 mg/kg respectivement, n'ont montré aucune différence significative concernant les paramètres biochimiques : glucose, cholestérol, bilirubine, aspartate transaminase (AST), alanine aminotransférase (ALT), urée, créatinine, protéines totales ou albumine. De même, aucune altération histopathologique n'a touché la structure du parenchyme hépatique et rénale (Bougezza et al., 2013).

## II. 1. Généralités sur la cytotoxicité

La **cytotoxicité** est la propriété qu'a un agent chimique ou biologique de provoquer des altérations cellulaires, en aboutissant éventuellement à la destruction de la cellule cible. Cela se traduit souvent par l'hémolyse cellulaire (**Dausset, 1976**).

La cytotoxicité peut être aussi le résultat de certains médicaments appelés médicaments cytotoxiques. Par « médicaments cytotoxiques », on entend tout médicament qui inhibe ou empêche les fonctions cellulaires. On les utilise surtout pour traiter le cancer, souvent dans le cadre d'une chimiothérapie (**Martin et al., 2004**). Récemment, leur utilisation s'est étendue au traitement de certaines maladies de la peau (comme le psoriasis) et ils servent parfois à traiter l'arthrite rhumatoïde et l'arthrite rhumatoïde juvénile, de même que des affections musculaires qui résistent aux stéroïdes. Les médicaments cytotoxiques les plus connus sont les antinéoplasiques (**Augry et al., 1998**).

## II. 2. Mécanismes de la cytotoxicité

### II. 2.1. Effets sur la membrane cellulaire et sur le transport membranaire

Les effets cytotoxiques les plus connus et les plus expérimentés sont les perturbations de la membrane cellulaire provoquant une fuite du contenu cellulaire dans l'espace extracellulaire ou afflux extracellulaire de colorants qui révèle des constituants cellulaires. Ces effets sont généralement non spécifiques et se produisent lorsque l'énergie et l'homéostasie ionique atteignent un point où l'intégrité de la membrane ne peut plus être maintenue. Cependant, ils pourraient se produire plus grâce à des interactions spécifiques comme avec des agents perturbateurs de la membrane tels que les détergents et les anesthésiques volatiles, les inhibiteurs de fonctions vitales comme le transport d'ions ou la transduction du signal, et avec des inhibiteurs de transporteurs spécifiques, des substances nocives telles que dans les cellules tubulaires rénales et biliaires. Cependant la rupture de la membrane cellulaire peut se produire sans nécrose si l'effet est doux.

Par exemple, l'accumulation hépatique de lipides et de glucides dans la glycogénolyse et la stéatose pourrait entraîner une libération des enzymes cellulaires sans aucune preuve de nécrose. La libération se fait par bourgeonnement, dans lequel, le cytosquelette est perturbé et la membrane plasmique s'invagine pour former des vésicules qui bourgeonnent sans perte de

la continuité de la membrane cellulaire. Ces vésicules contiennent du cytoplasme avec l'enzyme et encore des organites. Alternativement, les constituants cellulaires pourraient être libérés par la rupture de la cellule, avec des blessures plus graves. La perte de la fonction barrière de la membrane cellulaire est fréquemment utilisée dans les évaluations de la viabilité par mesure de l'afflux cellulaire de colorants, comme le Bleu Trypan, ou des colorants d'ADN. Ces colorants pourraient traduire le degré de gravité de la blessure sur la base de la taille et les propriétés de perméation de ces colorants (**Slaughter et al ., 2002 ; Sussman et al., 2002 ; Xu et al.,2004 ; Brien et al., 2006** ).

### II. 2.2. Effets nucléaires et sur la prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire est dépendante de la structure intacte et la fonction de tous les processus cellulaires vitaux. Par conséquent, elle est affectée au début de toutes toxicité, même si ce n'est que secondairement. En outre, l'un des nombreux processus spécifiques impliqués dans la réplication pourraient être affectés principalement à la cible de l'effet d'un composé. La prolifération constitue un "catch-all" écran des effets cytotoxiques. Les modifications morphologiques caractéristiques ont longtemps été noté à se produire au début de la mort cellulaire, y compris la condensation nucléaire, le retrait et la fragmentation. L'effet inverse peut se produire avec des inhibiteurs du cycle cellulaire qui causent l'enflure et l'asynchronisme nucléo-nucléaire.

La toxicité qui est basée sur l'ADN et l'hérédité, qui est génotoxicité, se produit en raison de la mutagénicité ou la perturbation de la séparation chromosomique lors de la division cellulaire (**Slaughter et al., 2002 ; Sussman et al. , 2002** ).

### II. 2.3. Effets mitochondriale et homéostatique énergétique

Le troisième mécanisme le plus étudié et reconnu de la cytotoxicité est probablement la toxicité mitochondrial (**Lewis et al. , 2003 ; Fariss et al.,2005**). Les mitochondries sont ubiquitaire impliqué secondairement à pratiquement tous les autres effets cellulaires. En outre, ils sont souvent la cible principale de la toxicité du fait de leur complexité et de nombreux rôles essentiels et diversifiée dans l'énergie, l'homéostasie du calcium, la biosynthèse, le stress oxydatif et l'apoptose.

La plupart de ces dysfonctionnements mitochondriaux se manifeste par des modifications du potentiel de la membrane mitochondriale ou de l'activité réductrice des oxydoréductases. Souvent, si les cellules ne sont pas submergées par les effets toxiques, elles s'adaptent par des mécanismes compensatoires précoces, comme l'augmentation de la biogenèse mitochondriale (Lee and wei , 2005 ; klutz , 2005).

#### II. 2.4. Métabolites réactifs, stress oxydatif, et médiation immunitaire

De nombreux médicaments sont reconnus depuis longtemps pour produire la toxicité du stress oxydatif par plusieurs mécanismes (Kaplowitz , 2005 ; Park, 2005) :

- ❖ La réduction progressive de l'oxygène dans les espèces réactives de l'oxygène telles que le superoxyde, peroxydes et des espèces d'azote réactif et de radicaux hydroxyles tels que l'oxyde nitrique et de peroxyde nitrite.
- ❖ Déplétion du glutathion.
- ❖ Bioactivation d'un métabolite électrophile qui forme des adduits avec des macromolécules cellulaires.

Comme le stress oxydatif est un processus ubiquitaire connu comme activité métabolique intermédiaire normal et de détoxification des xénobiotiques, les cellules ont évolué des systèmes complexes de défenses antioxydants qui sont facilement régulés positivement, y compris les signaux de transduction par des facteurs de transcription translocation (AP-1, Nrf2), et de nombreuses enzymes de protection et de radicaux libres. La formation d'un métabolite réactif a été associée à des mécanismes de toxicité à médiation immunitaire affectant la peau, des cellules sanguines et le foie. Le mécanisme n'a pas été défini mais pourrait concerner la formation d'haptènes et du stress de la cellule, qui, en présence d'une activation du système immunitaire et d'une réaction inflammatoire déclenchent une réponse auto-immune (kaplowitz , 2005).

#### II. 2.5. Système de régulation du calcium

Le calcium joue un rôle essentiel non seulement dans la régulation des fonctions cellulaires telles que la sécrétion, la contraction, le métabolisme et la transcription des gènes, mais aussi dans l'apoptose. Le gradient du calcium ionisé est 10000 comparant le milieu extracellulaire par rapport à l'espace intracellulaire. Si ce gradient n'est pas maintenu et contrôlé, cela conduit à un dysfonctionnement et l'activation des enzymes dégénératives, et par conséquent à une perte des cellules. En conséquence, le calcium est un signal pré-létal important de lésions des cellules de toutes les causes. La Dyshoméostasie du calcium peut également résulter de

l'interaction directe des médicaments ou leurs métabolites toxiques avec les canaux et des pompes  $\text{Ca}^{++}$ , comme avec ceux des fibrates, statines, les anthraquinones telles que la doxorubicine, et thapsigargine (Slaughter et al., 2002).

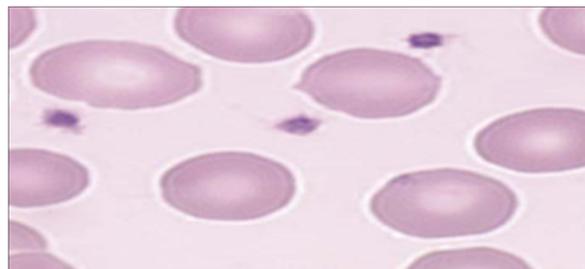
### II. 2.6. Effets lysosomale et autophagique

Une des toxicités les plus fréquemment reconnues qui est spécifiquement liées à la structure chimique implique principalement les lysosomes et les phospholipides (Xu et al., 2004). Cela se produit en raison de l'interaction des agents cationiques amphiphiles avec phospholipases ou des phospholipides tels que leur catabolisme lysosomale est inhibé et ils s'accumulent ensuite dans une mesure excessive. Les médicaments qui provoquent une phospholipidose ont un noyau hydrophobe avec une chaîne latérale hydrophile contenant un groupe amino cationique tels que l'amiodarone (antiarythmique), perhexiline (prophylactic antianginal), la chloroquine (antipaludique), la gentamicine (antibiotique), le propranolol (bêta-bloquants), le tamoxifène (antiestrogène), et quinacrine (antipaludique) qui ont un sérieux potentiel effet toxique lors de l'administration chronique. Par exemple, amiodarone est un antiarythmique qui produit une toxicité pulmonaire grave chez 10% des patients sous traitement chronique et aussi des lésions hépatiques.

Un second effet lysosomale primaire moins communément reconnue qui est liée à la structure de la drogue a été décrit comme une vacuolisation. Cela se produit également en raison du gonflement lysosomale, en particulier avec des amines tertiaires qui ont une charge neutre à un pH physiologique. In vitro, il se produit à des concentrations de 0,1 à 2,5 mM. Les bases organiques entrent dans le lysosome acide et sont piégé par protonation au pH inférieur qui les rend chargés positivement, et empêcher leur rediffusion. Ces médicaments s'accumulent et augmentent l'activité osmotique intravasculaire. Par conséquent, l'afflux de l'eau provoque l'enflure sous forme de grandes vacuoles claires. Les lysosomes sont également affectés secondairement à d'autres cytotoxicités. Leur activité et masse pourrait augmenter l'apoptose dans les cellules qui sont en cours de la mort cellulaire programmée, y compris l'autophagie développée par les cellules (O'Brien et al., 1989 ; Morissette et al., 2004).

### II.3. L'érythrocyte

L'érythrocyte ou hématie ou encore globule rouge (GR) est une cellule mature formée dans la moelle osseuse (**Figure 3**), anucléée, qui est schématiquement représenté comme un sac contenant des enzymes, de l'hémoglobine pigment respiratoire qui transporte l'oxygène des poumons vers les tissus et est responsable de la fonction de l'hématie et divers électrolytes (potassium, sodium, chlore) et du glucose. Le GR provient des érythroblastes. Il possède la forme d'une lentille biconcave dont le diamètre est de 7 à 8  $\mu\text{m}$ . Le GR est la cellule sanguine la plus abondante. C'est une cellule anucléée sur frottis et après coloration au May Grunwald Giemsa (MGG) il apparaît de couleur gris rosé avec un centre clair qui se fond graduellement à un anneau périphérique plus coloré (**Valensi, 2005**).



**Figure 3** : Frottis de sang normal coloré au May Grunwald Giemsa (MGG) avec un grossissement  $\times 1\ 000$  (**Valensi, 2005**)

Les érythrocytes sont caractérisés par l'absence d'un noyau qui implique 03 conséquences ( **Stevens et Lowe ,1997**) :

- ❖ Incapacité d'une synthèse protéique (il n'existe pas d'ADN ni d'ARN)
- ❖ Donc un stock enzymatique et énergétique limité et prédéterminé.
- ❖ L'usure progressive et la disparition des constituants non renouvelables.

#### II.3. 1. Structure de l'érythrocyte

La structure du GR se décompose schématiquement en trois éléments : la membrane, les enzymes, et l'hémoglobine. La membrane du globule rouge comporte : la membrane cytoplasmique et le cytosquelette membranaire.

##### II.3. 1.1. La membrane cytoplasmique

Sa structure est celle d'une membrane cellulaire classique, elle est constituée d'une bicouche lipidique où s'intercalent des protéines. Certaines protéines sont des transporteurs d'ions, d'autres sont des récepteurs membranaires. Une partie de ces protéines est porteuse des

fonctions antigéniques du globule rouge et des groupes sanguins érythrocytaires (ABO, Rhésus, etc...) (Sébahoun,2005).

### II.3. 1.2. Le cytosquelette érythrocytaire (ou squelette membranaire)

Responsable des propriétés mécaniques du globule rouge, il est formé d'un réseau de protéines qui tapissent la face interne de la membrane cytoplasmique du globule rouge. Le principal constituant protéique de ce réseau est la spectrine (**figure 4**) (Haest, 1982).

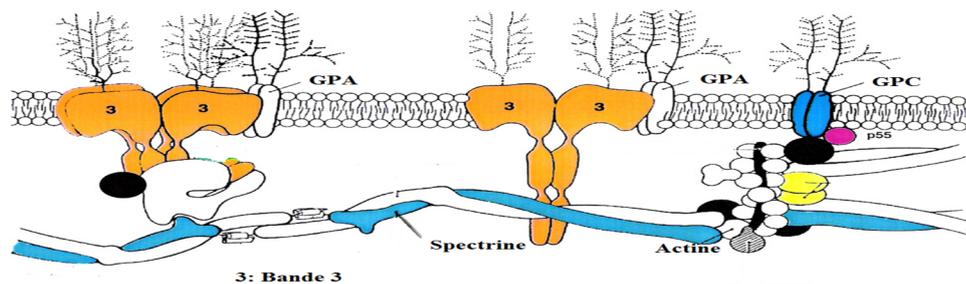


Figure 4: Schéma de la membrane érythrocytaire (Delaunay, 2007).

### II.3. 1.3. Les enzymes érythrocytaires

Le globule rouge est une cellule dont les besoins énergétiques sont faibles. Le rôle des enzymes est d'assurer les fonctions vitales du globule rouge (Prchal and Gregg, 2005) :

1. Apport d'énergie qui est destiné à maintenir la forme biconcave du globule rouge, ainsi que les échanges transmembranaires
2. Lutte contre les agents oxydants.

### II.3. 1.4. Hémoglobine

Principal constituant du globule rouge, l'hémoglobine (Hb) est une chromoprotéine assurant l'oxygénation tissulaire. Elle est maintenue à l'état fonctionnel grâce aux enzymes érythrocytaires. L'hémoglobine est une protéine, hétéro-tétramère formée de 4 chaînes de globine et de 4 molécules d'hème.

#### II.3. 1.4.1. L'hème

L'hème est une protoporphyrine responsable de la couleur rouge du globule rouge. Il comporte un atome de fer divalent  $Fe^{2+}$  (un atome de fer à l'état ferreux). La protoporphyrine est constituée par quatre noyaux pyrroles unis par les ponts méthényles.

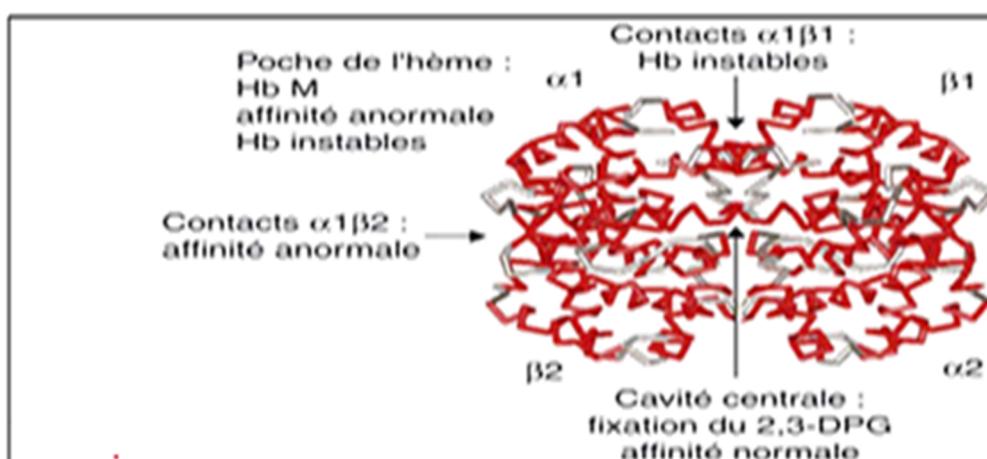
Le fer en position centrale de l'hème se lie aux quatre atomes d'azote du noyau protoporphyrinique et forme deux autres liaisons de part et d'autre du plan de l'hème: L'une avec l'O<sub>2</sub>, qui ne peut se lier que si le fer est à l'état ferreux [lorsque le fer est à l'état ferrique = méthémoglobine qui est incapable de fixer l'O<sub>2</sub>]. L'autre avec une chaîne polypeptidique de globine. Chaque complexe hème + globine forme une sous unité (monomère): les quatre sous-unités s'adaptent les unes aux autres pour former un tétraèdre (la molécule d'hémoglobine) (Voet and Voet , 2005 ; Wajcman, 2005).

#### II.3.1.4.2. La globine

La globine est la partie protéique de l'Hb. Chaque molécule d'Hb est formée de 4 chaînes de globine : 2 chaînes de type  $\alpha$ , et 2 chaînes de type  $\beta$ . La structure des chaînes de globine  $\alpha$  ou  $\beta$  est très similaire (Wajcman, 2005). Par exemple, la structure de la chaîne bêta-globine qui entre dans la composition de l'Hb adulte majoritaire, l'HbA (figure 5) est la suivante (Lapie et Elion, 2005) :

1. **structure primaire** de la chaîne de  $\beta$ -globine : succession de 146 acides aminés
1. **structure secondaire** hélicoïdale (la chaîne forme une hélice)
2. **structure tertiaire** : l'hélice se compacte, prend une forme globulaire, ménageant en son centre une cavité, la poche de l'hème (lieu de fixation de l'hème et du fer).
3. **structure quaternaire** de l'HbA.

On notera : HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ), ce qui indique que l'HbA comporte 2 chaînes  $\alpha$  et 2 chaînes  $\beta$ .



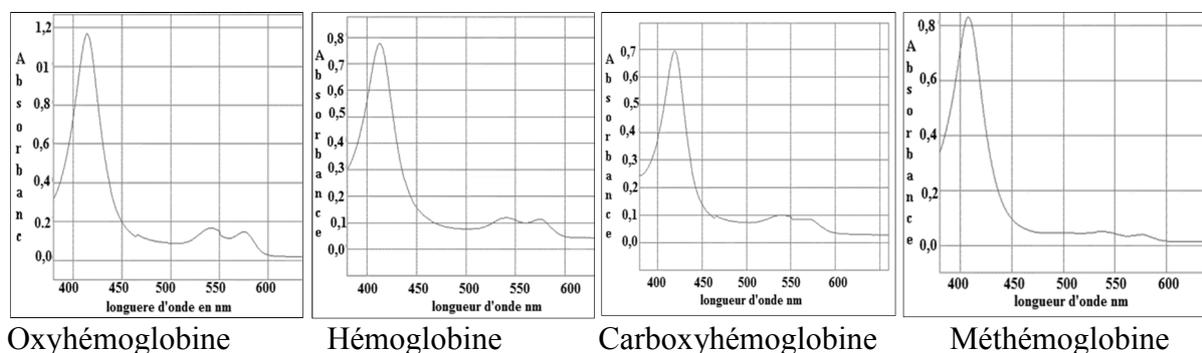
**Figure 5:** Représentation de la structure tridimensionnelle de la molécule d'hémoglobine adulte (HbA) (Lapie et Elion, 2005).

### II.3.1.4.3. Fonctions de l'hémoglobine

L'Hb a pour fonction le transport de l'oxygène aux tissus. Il existe deux conformations de l'hémoglobine, l'une à forte affinité pour l'oxygène que l'on appelle l'état relâché (R), l'autre à faible affinité pour l'oxygène, que l'on appelle l'état tendu (T). Plusieurs autres facteurs influencent l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène, le principal étant la pression partielle en oxygène (plus la pression en oxygène est élevée et plus l'affinité de l'Hb pour l'oxygène baisse), mais également divers autres : baisse du pH, augmentation de la température (**Garrett et Grisham, 2005**).

### II.3.1.4.4. Propriétés spectral de l'hémoglobine

C'est le caractère aromatique de l'hème qui est responsable des propriétés spectrales de l'hémoglobine. La fixation de l'O<sub>2</sub> sur l'hème modifie l'état électronique du complexe Fe(II)-hème, ce qui modifie les propriétés d'absorption de la molécule. L'hémoglobine désoxygénée présente deux maxima d'absorption à 555 et 430 nm. Le passage de la forme désoxyhémoglobine à la forme oxyhémoglobine (HbO<sub>2</sub>) se traduit par l'apparition de deux bandes (577 et 514nm). Le passage de HbO<sub>2</sub> en Hb les fait disparaître. La carboxyhémoglobine (dans laquelle le CO prend la place du dioxygène) présente trois maxima à 570, 535 et 418 nm. La méthémoglobine (dans laquelle le fer ferreux de l'hémoglobine est oxydé en fer ferrique par le ferricyanure de potassium) présente également trois maxima aussi à 630, 500 et 406 nm. Les différents états de l'hémoglobine ont été obtenus selon les indications données à partir d'hémoglobine extraite de globules rouges de cheval par hémolyse dans l'eau distillée (**Viès, 1923**).



**Figure 6** : Spectre d'absorbance de l'oxyhémoglobine, hémoglobine, carboxyhémoglobine et méthémoglobine (**Perrier et al., 1997**).

### II.3.2. Vie et mort des érythrocytes

L'érythrocyte mature circule dans les vaisseaux sanguins. Il traverse les poumons où il fixe l'oxygène sur l'Hb qui devient sous forme oxyhémoglobine, et libère le CO<sub>2</sub>. Il traverse les capillaires des différents organes où l'Hb libère l'oxygène (désoxyhémoglobine) et se charge en CO<sub>2</sub> (carboxyhémoglobine). Le globule rouge naît et vit son "enfance" dans la moelle osseuse : c'est l'**érythropoïèse**. Après une durée de vie moyenne de 120 jours dans la circulation sanguine, le globule rouge vieillit et se détruit, c'est l'hémolyse physiologique (**Ameisen et al ., 2005 ; Combier, 2007**).

Le vieillissement des GR survient progressivement au cours de la vie des hématies par destruction des GR plus précisément de la membrane de celle-ci arrivés au terme de leur vie circulatoire, aboutissant à la libération puis du catabolisme de l'hémoglobine. (**Samuel and Sowemimo, 2002**).

### II.4. Mécanisme de l'hémolyse

L'hémolyse est liée au vieillissement du globule rouge. Cette sénescence est liée à une diminution du stock enzymatique qui a pour conséquence (**Levy, 1923**):

- Diminution du volume globulaire
- Diminution de l'ATP et glutathion réduit
- Augmentation du Na<sup>+</sup> et diminution du K<sup>+</sup> intracellulaire
- La formation de méthémoglobine

#### a) L'hémolyse normale (physiologique)

C'est une hémolyse extra-vasculaire, ce qui signifie que l'hémoglobine n'est pas libérée dans les vaisseaux. Les globules rouges sont phagocytés par les macrophages. Les hématies sont détruites dans la rate ou dans le foie (**Stellman, 2000**).

#### b) L'hémolyse en pathologie

L'hémolyse physiologique peut être augmentée par des processus pathologiques. On parle d'hyper-hémolyse. Il y a deux éventualités selon que l'hémolyse est extra-vasculaire, comme l'hémolyse physiologique, ou bien intra-vasculaire.

- **L'hémolyse est extra-vasculaire** ; Le catabolisme de l'hémoglobine suit les voies normales, mais il est exagéré. Ceci entraîne une augmentation de la bilirubine libre responsable d'un ictère hémolytique. La bilirubine conjuguée sérique reste habituellement normale. Le stercobilinogène fécal augmente. Il n'y a pas de bilirubine libre dans les urines (Sébahoun, 2005 ; Lipka *et al.* , 2012).
- **L'hémolyse est intra-vasculaire** ; Ce mécanisme est plus rare. Il se produit lorsque les globules rouges sont lysés directement dans les vaisseaux en particulier :
  - par des produits toxiques (médicaments).
  - par cause infectieuse (paludisme).
  - par des anticorps, par exemple en cas d'incompatibilité dans les groupes sanguins (transfusion) (Ruffié , 1993).

On retrouve les mêmes anomalies que dans l'hémolyse extra-vasculaire puisque le catabolisme de l'hémoglobine est augmenté, avec en plus :

- une hémoglobininémie plasmatique (le plasma est rosé après centrifugation)
- une hémoglobininurie (présence d'hémoglobine dans les urines)
- un effondrement du taux de l'haptoglobine sérique.

En effet l'hémoglobine libérée se fixe sur l'haptoglobine, protéine sérique, formant un complexe qui ne peut en raison de sa taille passer dans les urines. Si l'hémolyse est importante toute l'haptoglobine est saturée. Il reste alors de l'hémoglobine libre dans le plasma et celle-ci passe dans les urines (hémoglobininurie). Le seuil à partir duquel l'hémoglobine passe la barrière rénale est ainsi directement fonction de la capacité de fixation de l'hémoglobine sur l'haptoglobine. Par ailleurs, il y a effondrement de l'haptoglobininémie parce que l'haptoglobine est catabolisée avec l'hémoglobine qu'elle a fixée, et aussi Une diminution de l'haptoglobine peut également se voir dans les hémolyses extra-vasculaires importantes, mais elle est moins constante (Brooker, 2000) .

## II.5. Les érythrocytes comme model d'étude de la cytotoxicité

Les cellules sanguines humaine plus précisément les érythrocytes sont souvent utilisés comme model pour étudier la cytotoxicité et cela grâce à leur accessibilité, l'absence d'organite cellulaire ainsi que les similitudes de certains constituants de la membrane avec

ceux des autres types de cellules (**Brito et al., 2006**) . Plusieurs travaux ont fait l'objet d'une telle étude et le tableau V donne quelques uns de ces derniers.

**Tableau V** : Exemple de travaux effectués sur la cytotoxicité

Molécules	Auteur et année
Complexe melamine–cyanurate	Cui et al. (2010)
Tamoxifen	Cruz et al. (1999)
Dérivé du carbazole III	Letois et al. (1990)
Acide trichloracétique	Richard et al. (1980)
La tetrodotoxine	Cheymol et al. (1967)

### II.5.1. Limitations des méthodes de la cytotoxicité *in vitro*

Plusieurs limitations de l'évaluation des méthodes de la cytotoxicité *in vitro* ont abouti dans leur utilisation sensiblement limitée. Probablement les tests les plus inefficaces sont ceux qui n'ont pas permis une durée suffisante d'exposition pour la cytotoxicité à exprimer (**Slaughter et al., 2002 ; O'Brien et al., 2006**).

Près des trois quarts des médicaments n'expriment pas leur toxicité avec exposition aiguë, mais seulement après quelques jours d'exposition. Certains médicaments, tels que l'ADN mitochondrial et les inhibiteurs de la synthèse des protéines pourraient prendre jusqu'à une semaine pour montrer les effets cytotoxiques dans de nombreux tests. Les courbes dose-réponse sont généralement décalées vers la gauche, vers une sensibilité accrue, avec augmentation de la durée d'exposition de quelques heures à quelques jours.

Une autre cause fréquente d'échec de certains tests pour détecter le potentiel de toxicité *in vitro* est leur dépendance à mesure des événements qui se produisent qu'à la fin de la vie de la cellule lorsque une blessure sévère s'est produite, telles que la rupture de la cellule avec libération des constituants cellulaires et l'absorption de substances extra-cellulaires. De tels tests manquent de sensibilité pour prédire la toxicité *in vivo* principalement parce que la mort cellulaire n'est pas nécessaire pour une toxicité importante. En outre, la solubilité limitée de médicaments pourrait limiter essais sur les médicaments à une concentration suffisamment élevée (**Nerurkar et al., 2003 ; Leandri, 2003**).

*Travail expérimental*

### III.1. Matériel végétal

#### III.1.1. Collecte des graines

Les graines de *Nigella damascena* utilisées durant notre partie expérimentale sont issues d'un même lot de graine d'une source commerciale (Importé de France). Ces graines ont été nettoyées afin d'éliminer les débris et conservées à l'abri de la lumière dans un endroit sec. Après avoir séché à l'étuve à 30°C pendant 72 heures, ces graines sont finement broyées à l'aide d'un broyeur électrique. (Figure 7)



**Figure 7 :** Graines de *Nigella damascena*.

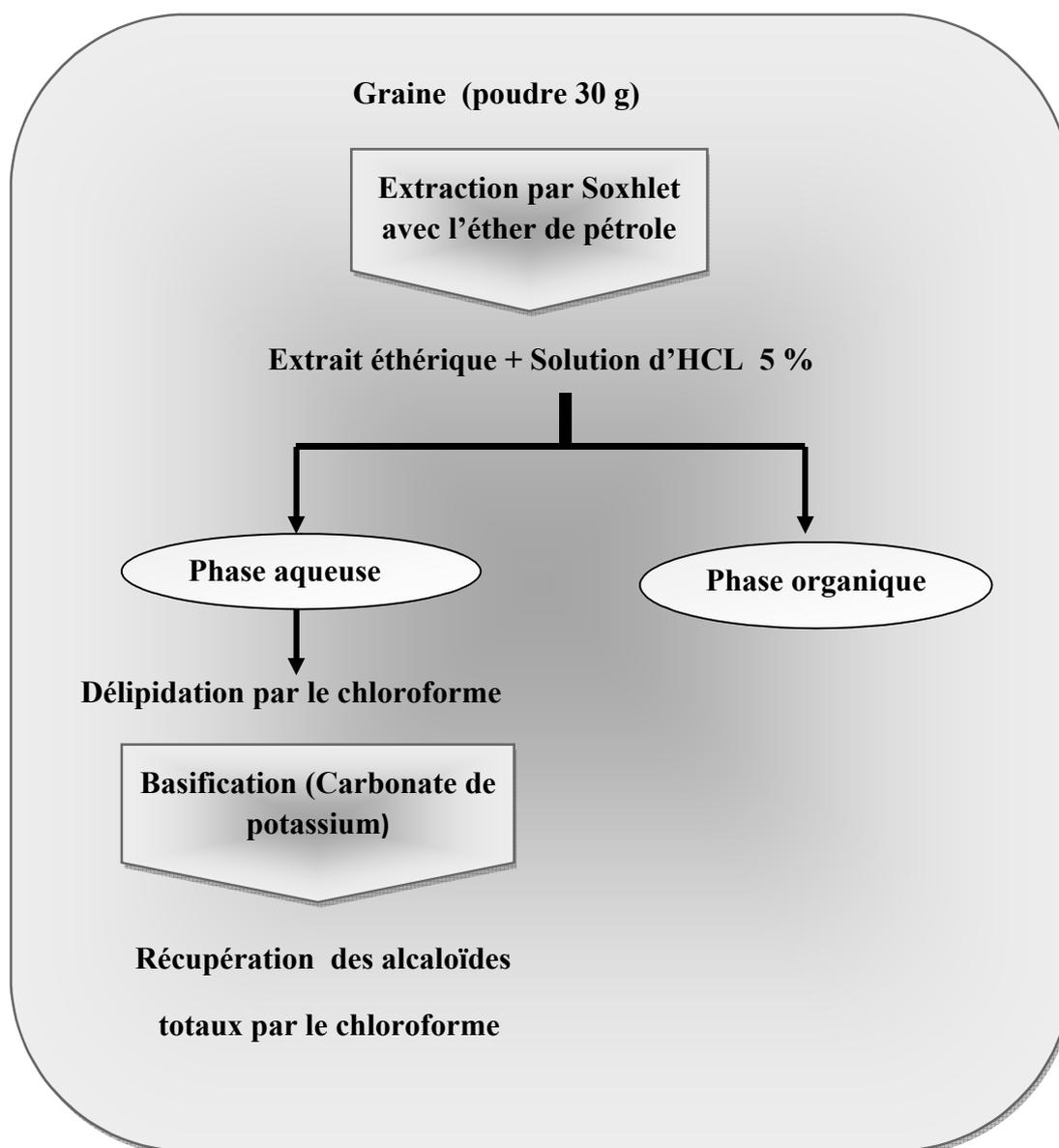
#### III.1.2. Extraction des alcaloïdes totaux

L'extraction a été effectuée à partir de la poudre de graine selon le protocole décrit par **Ewin (1912)**. 30 grammes de la poudre fine de la graine est extraite par 250ml d'éther de pétrole par soxhlet pendant 8h. L'extrait éthérique subit une évaporation puis mélangé à une solution HCl (5%). Ce mélange subit une délipidation par le chloroforme puis basification par le carbonate de potassium. Le précipité formé est finalement extrait par le chloroforme. Après évaporation du chloroforme, on récupère sur des boîtes de Pétri (pesées avant et après) ; les alcaloïdes totaux (Figure 8).

Le rendement de l'extrait a été calculé par rapport à la masse initiale de la matière sèche.

$$\text{Rendement (R}_d\text{)} = (m / m_i) \times 100$$

- m : masse de l'extrait brut
- m<sub>i</sub> : masse de la matière sèche initiale
- R<sub>d</sub> : rendement massique



**Figure 8:** Protocol d'extraction des alcaloïdes totaux de *Nigella damascena* (Ewin, 1912).

## III.2. Caractérisation des alcaloïdes et de l'hémoglobine

### III.2.1. Révélation chimique des alcaloïdes par le réactif Dragendorff

La mise en évidence consiste à précipiter les alcaloïdes à l'aide du réactif de Dragendorff. Cette dernière est basée sur la formation d'un précipité donnant un complexe insoluble qui génère une coloration orangée révélant la présence d'alcaloïdes.

### III.2.2. Analyse par spectrophotométrie d'absorbance UV/Visible

#### III.2.2.1. Alcaloïdes totaux

Le spectre d'absorption des alcaloïdes de *Nigella damascena* solubilisés dans l'éthanol (1mg/ml) a été mesuré entre 200 et 700nm à l'aide d'un spectrophotomètre *analytikjena Specord 50* couplé au logiciel Aspect-plus.

#### III.2.2.2. Hémoglobine

Le spectre d'absorption de l'hémoglobine solubilisé dans l'eau physiologique (NaCl 150 mM, pH 7,4) a été mesuré entre 400 et 700nm à l'aide d'un spectrophotomètre *analytikjena Specord 50* couplé au logiciel Aspect-plus.

## III.3. Étude de la cytotoxicité des alcaloïdes totaux *in vitro*

### III.3.1. Test hémolytique

#### III.3.1.1. Principe

En présence d'une substance hémolytique, les hématies sont lysées, libérant ainsi l'hémoglobine, et rendant le surnageant rouge. Les hématies qui restent intactes sédimentent.

#### III.3.1.2. Isolement des érythrocytes

Le sang frais a été prélevé de la veine du pli du coude chez des volontaires humains sains (qui n'ont effectué aucun traitement, étudiant ou qui travaillent dans notre laboratoire) à l'aide d'une seringue stérile, ou le sang est directement transféré dans des tubes EDTA comme anticoagulant. Les érythrocytes récupérés ont été lavés trois fois un même volume d'eau physiologique froide (NaCl 150 mM, pH 7,4). Le surnageant a été soigneusement retiré à chaque lavage. Le culot obtenu au troisième lavage constitue les hématies à 100%.

### III.3.1.3. Préparation des solutions standards

#### a) Préparation de la solution Triton X-100

Pour évaluer le 100% d'hémolyse, on a utilisé le perturbateur de la bicouche phospholipidique des cellules des globules rouges qui est le détergent Triton X-100 de 1% (V/V). Dans un tube on a prélevé un volume de 0,1 ml de triton x-100 et complété jusqu'à 10ml de l'eau physiologique, puis conservé à 4°C.

#### b) Préparation de la solution mère d'alcaloïdes

L'extrait sec d'alcaloïdes obtenu après évaporation du solvant d'isolement a été solubilisé dans le DMSO à température ambiante et sous agitation énergétique à raison de 5mg/ml. La solution obtenue fut ensuite filtrée sur papier wattman n°3 pour éliminer toute impureté. La solution d'alcaloïdes ainsi préparée est mise dans un tube bien scellé et est gardée à température basse (4°C).

### III.3.1.4. Étude de l'hémolyse

Le test de l'hémolyse a été réalisé suivant le Protocole de tramer et al. (2012). Afin d'évaluer la cytotoxicité des extraits d'alcaloïdes totaux de *Nigella damascena*, in vitro, brièvement, sept dilutions d'extrait sont préparées. Un volume d'extrait est mélangé avec 200 µl de la suspension érythrocytaire. La solution d'alcaloïdes (5mg/ml) a été mélangée à l'aide d'un vortex avant chaque utilisation et l'eau physiologique doit être conservée au réfrigérateur. Il est à noter que chaque test est répété au moins 03 fois pour avoir des résultats cohérents. Un témoin négatif (contrôle) est préparé de la même façon, mais seulement en présence d'eau physiologique-DMSO (10%) avec un témoin positif en présence du Triton X-100 (1%) et qui représente l'hémolyse à 100%.

Les tubes sont incubés pendant 30 min à 37°C puis centrifugés à 9000g pendant 5 min. La lecture est faite avec un spectrophotomètre à 415nm.

Le pourcentage  
selon

d'hémolyse est déterminé  
l'équation suivante :

$$\% \text{ d'hémolyse} = [AT / A_{H 100\%}] * 100$$

AT : Absorbance du test (en présence ou absence d'alcaloïdes).

A<sub>H 100%</sub> : Absorbance hémolytique à 100% (en présence du triton X-100).

### III.3.1.5. Observation microscopique

Pour l'évaluation d'éventuels changements morphologiques au niveau des globules rouges qui pourraient être induits par nos alcaloïdes totaux (0µg/ml ; 500µg/ml ; 4000µg/ml), des frottis ont été réalisés et observés sur microscope optique à différents grossissements.

### III.3.2. Étude de la fragilité osmotique

#### III.3.2.1. Principe

En hématologie, la résistance osmotique des hématies s'apprécie en mettant une même quantité de sang dans des solutions salines tamponnées, à concentration saline décroissante. Au bout d'une heure, on mesure dans chaque tube la quantité d'hémoglobine libérée et on l'exprime en % de l'hémoglobine totale présente dans le sang. On obtient ainsi, pour chaque concentration saline, le pourcentage d'hémolyse. La résistance globulaire est diminuée quand l'hémolyse se produit dans des solutions plus riches en chlorure de sodium. La résistance globulaire est augmentée quand elle a lieu dans des solutions moins riches en chlorure de sodium. La résistance globulaire peut augmenter en présence d'une drogue douée de propriété d'osmorégulation.

#### III.3.2.2. Mode opératoire

Le test de la fragilité osmotique a été réalisé suivant le protocole de Sharma (2010). La résistance osmotique des érythrocytes a été mesurée dans la présence et l'absence d'alcaloïdes totaux de *Nigella damascena* (500 et 1000µg).

Après l'incubation des érythrocytes avec les alcaloïdes totaux à 37 °C pendant 30 min, les échantillons ont été centrifugés et les culots de globules rouges sont remis en suspension et dilués soit avec de l'eau physiologique ou un tampon isotonique pour obtenir une concentration de NaCl allant de 0 à 0,9%. Les suspensions cellulaires ont été laissées à s'équilibrer à température ambiante pendant 30 min, puis centrifugée à 9000g pendant 5 min.

L'hémolyse a été déterminée à 415 nm, 100% hémolyse étant celle des érythrocytes dans l'eau. Les courbes de fragilité osmotique ont été construites en traçant le pourcentage d'hémolyse en fonction de la concentration du NaCl. La concentration efficace de NaCl induisant 50% d'hémolyse des globules rouges a été définie comme CE50 et a été calculée à partir de la courbe de fragilité osmotique correspondante.

#### **III.4. Analyse statistique**

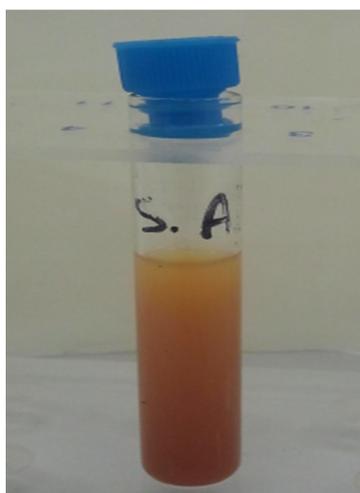
Les résultats sont présentés sous forme de moyen  $\pm$  écart type. L'analyse statistique est effectuée en utilisant le logiciel STATISTICA (version 5). Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA/MANOVA. Les différences sont considérées significatives à  $p < 0,05$ .

#### IV.1. Extraction des alcaloïdes totaux

Le rendement de l'extrait a été calculé par rapport à la masse initiale de la matière sèche. L'extraction liquide- liquide des alcaloïdes totaux à partir des graines a permis d'obtenir un extrait de couleur brun jaunâtre avec un rendement d'extraction de 40mg pour 30g de la masse sèche des graines, qui correspond à un rendement massique de 0,15%. Ce résultat concorde avec celui qu'on trouve dans la littérature. En effet, la graine de *Nigella damascena* est caractérisée par la présence d'un alcaloïde majoritaire, la damascenine qui représente une concentration de l'ordre de (0,1 – 0,7 %) du poids sec de la graine (Mohan, 1960). Un taux minimal par rapport à celui cité dans la littérature est peut être du à la région de la récolte, la qualité des graines ou à la méthode d'extraction.

##### IV.1.2. Identification des alcaloïdes totaux

En présence du réactif de Dragendorff (solution de bismuth iodure de potassium), notre extrait a donné une réaction positive. Un précipité d'une couleur orange, signe de présence d'alcaloïdes a été formé (Figure 9).

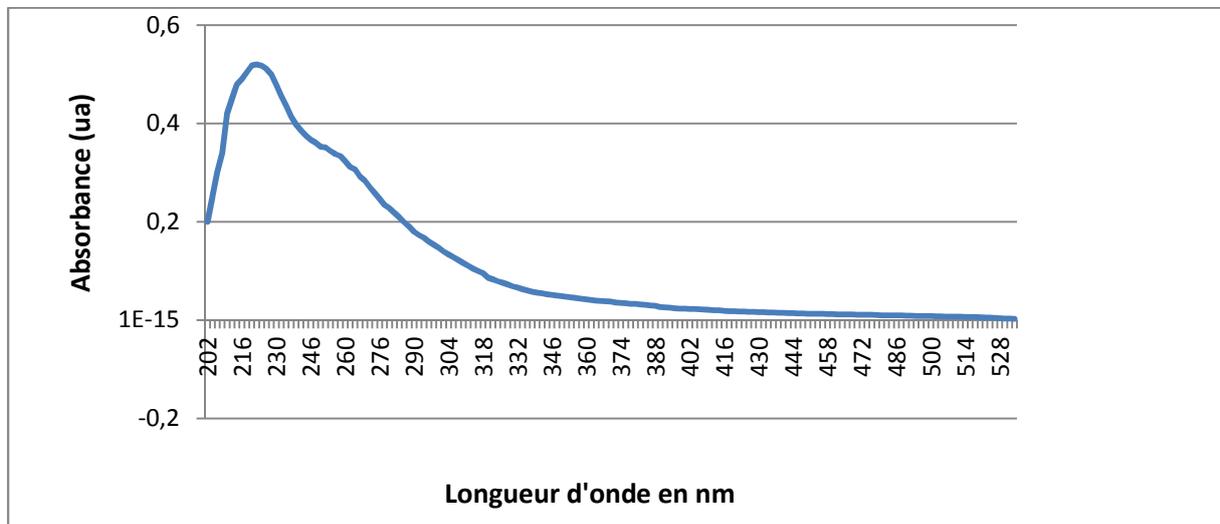


**Figure 9** : Formation d'un précipité orangé en présence du réactif dragendorff.

##### VI.1.3. Spectre d'absorbance des alcaloïdes totaux

Les alcaloïdes totaux de *Nigella damascena* solubilisés dans l'éthanol n'absorbent que dans le domaine UV. Leur spectre d'absorbance présente un profil avec un maxima à 226nm et un épaulement à 260nm (Figure10). L'absorbance totale des alcaloïdes de *Nigella damascena* est probablement caractéristique de l'alcaloïde majeur, la damascenine. L'absorbance UV de

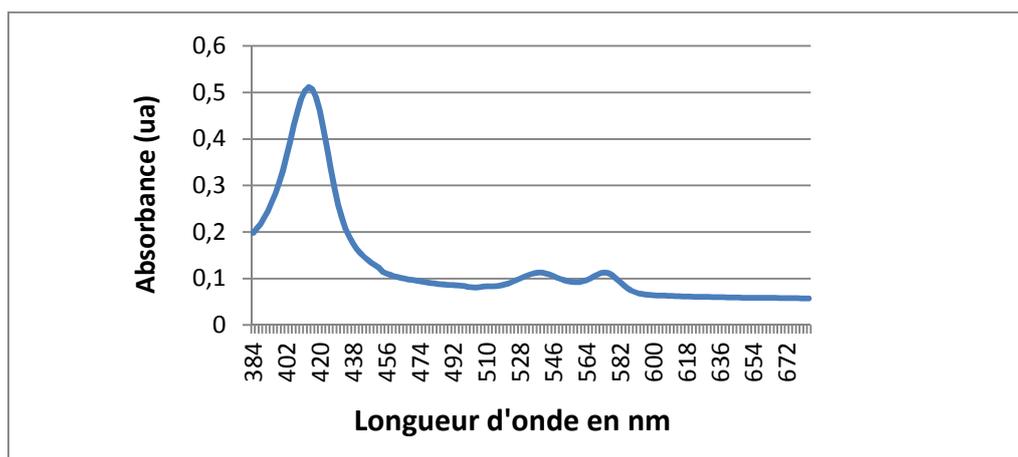
la damascenine masque probablement l'absorbance des alcaloïdes mineurs qui peuvent exister.



**Figure 10 :** Spectre d'absorption des alcaloïdes de *Nigella damascena* solubilisés dans l'éthanol (200µg/ml).

#### VI.1.4. Spectre d'absorbance de l'hémoglobine

Le spectre d'absorbance de l'hémoglobine présente un profil avec trois pics d'absorbance dont le maximum est à 415nm . Ce pic est probablement celui de la carboxyhémoglobine qui présente un maximum d'absorption au niveau de cette longueur d'onde ( **Figure 11**).

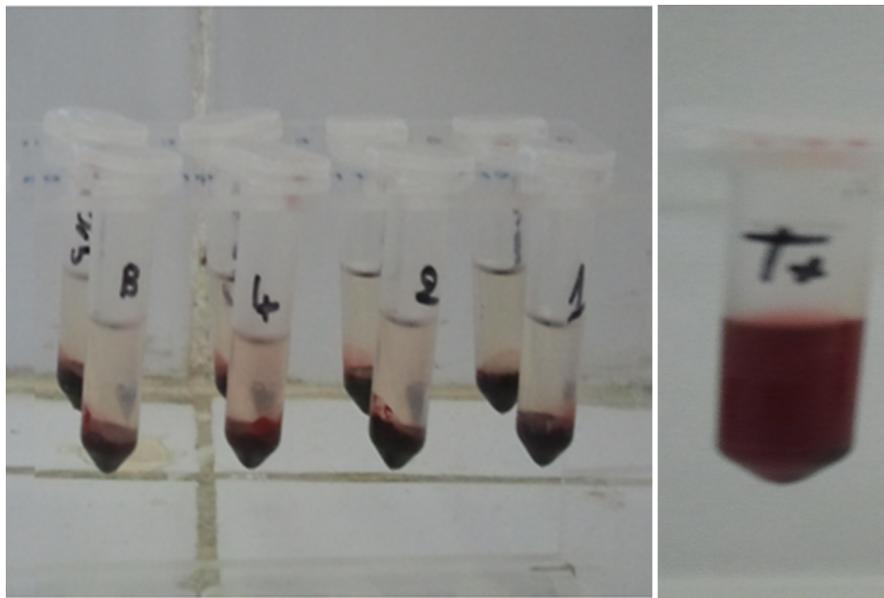


**Figure 11:** Spectre d'absorption de l'hémoglobine.

## IV.2. Test d'hémolyse

### IV.2.1. Visualisation à l'œil nu

Une observation directe des résultats est faite à l'œil nu (**Figure.12**), par comparaison avec les témoins positifs et négatifs ; le contenu de témoin positif est coloré en rouge ; c'est-à-dire que l'hémolyse est à 100%. Dans le témoin négatif y'a la formation du culot au fond du tube et le surnageant est transparent, cela est dû aux érythrocytes qui sont restés intacts (absence d'hémolyse). Les échantillons étudiés présents un surnageant d'une couleur très claire par rapport au témoin positif et un culot d'hématies se forme au fond du puits. Cela est expliqué par une hémolyse partielle ou absence d'hémolyse.

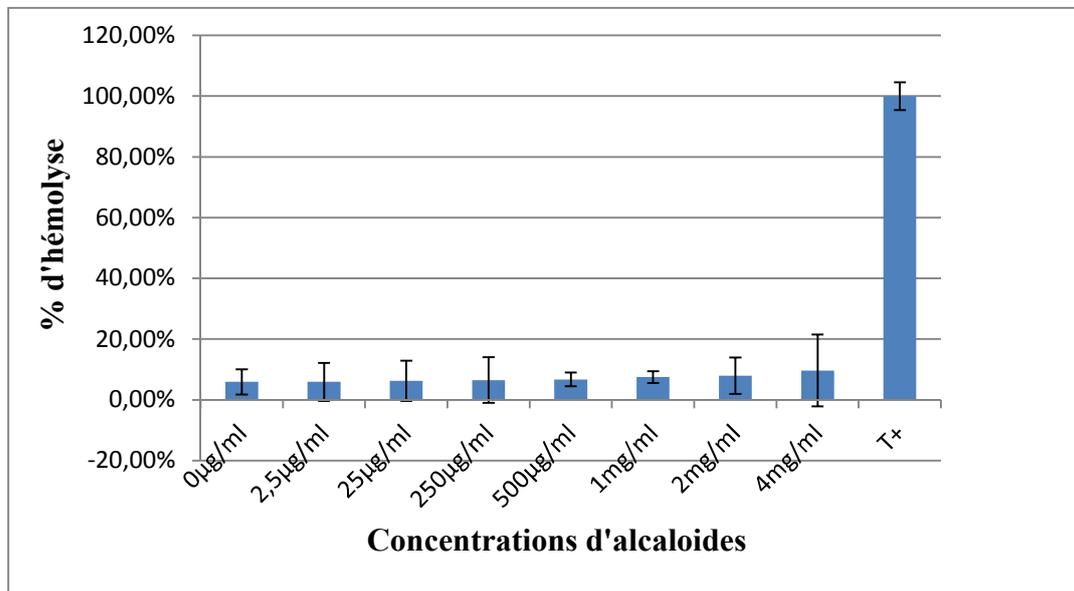


**Figure 12** : Processus hémolytique par déversions de l'hémoglobine..

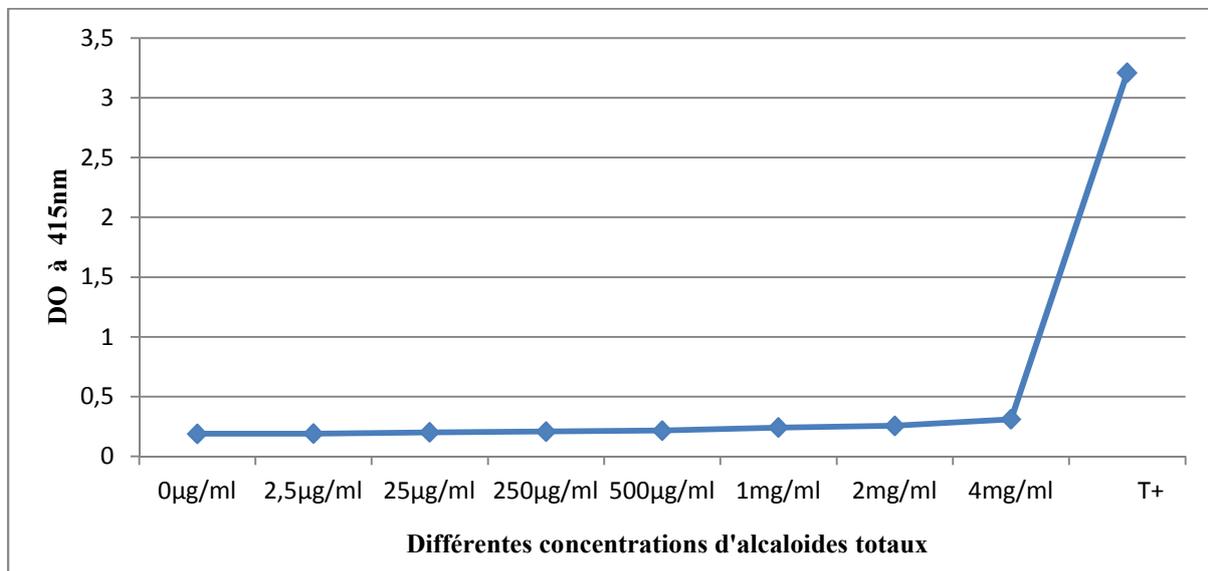
### IV.2.2. Dosage de l'hémoglobine et pourcentage d'hémolyse

Les observations faites au cours de notre évaluation révèlent que 4000  $\mu\text{g}$  d'alcaloïdes totaux pendant un temps d'incubation de 30min est une dose qui n'affecte pas l'intégrité cellulaire. D'ailleurs, les résultats obtenus en calculant le pourcentage d'hémolyse ainsi que par dosage spectrophotométrique de l'hémoglobine déversée par les érythrocytes au cours du processus hémolytique ne montrent aucune différence d'absorbance significative (**Figure 14**) par rapport au témoin ( $P > 0.05$ ). Le plus grand pourcentage d'hémolyse a été obtenu en

présence de 4000 $\mu$ g d'alcaloïdes totaux est représenté par 9,68% d'hémolyse avec 5,91% de celui du contrôle (Figure.13).



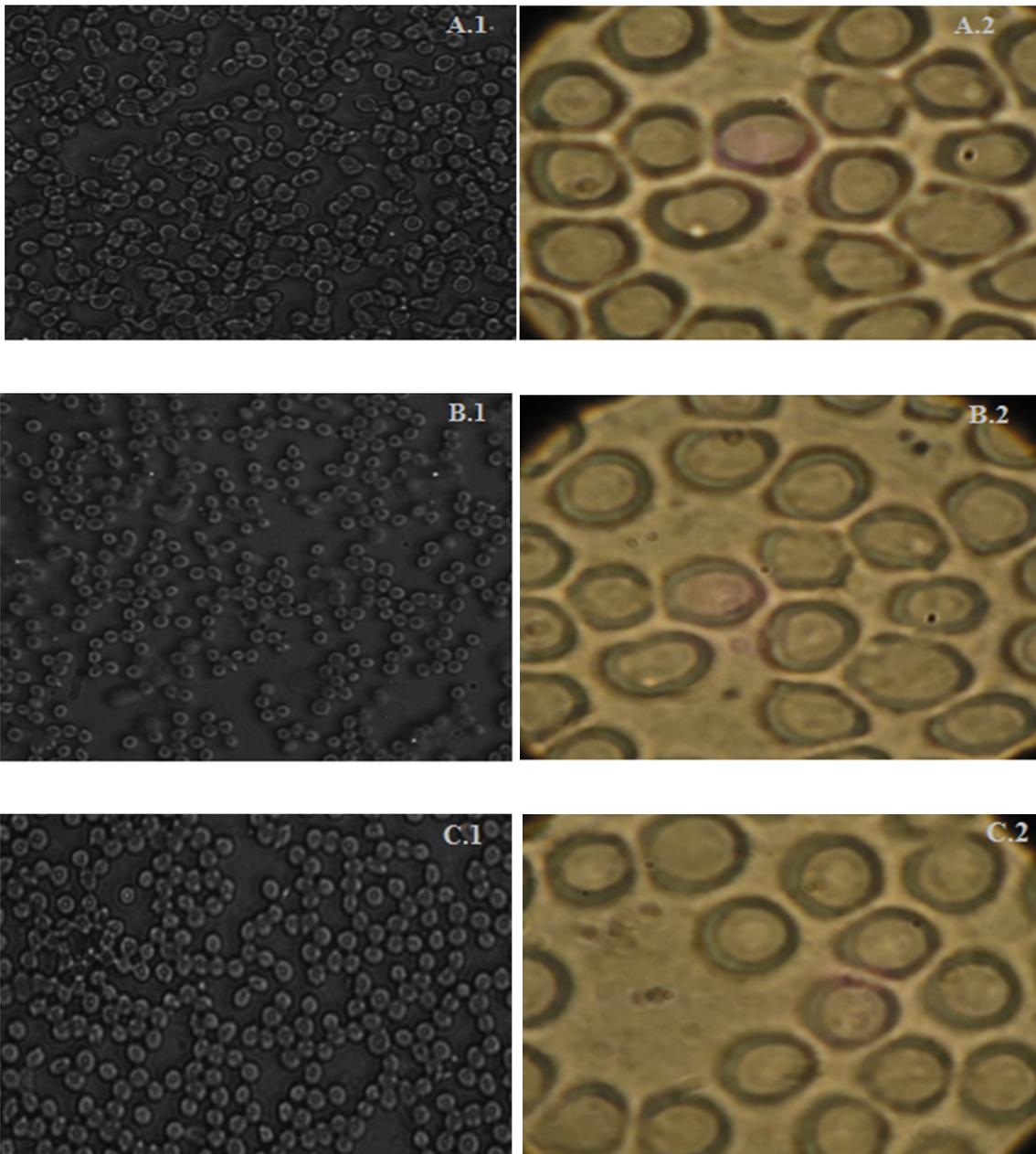
**Figure 13:** Pourcentage d'hémolyse érythrocytaire en présence et en absence des différentes concentrations d'alcaloïdes et du Triton X-100 ( $P > 0.05$ ).



**Figure 14:** Absorbance de l'hémoglobine à 415nm en présence et en absence des différentes concentrations d'alcaloïdes et du Triton X-100 ( $P > 0.05$ ).

### IV.2.3.Observation microscopique

Les observations par microscopie optique ne révèlent aucun signe d'affection morphologique des cellules érythrocytaires. Les frottis sanguins observés à faible et à fort grossissement (**Figure 15**) montrent que les membranes cellulaires sont intactes aussi bien au niveau du contrôle ainsi qu'en présence des deux fortes concentrations : 500 et 4000 $\mu$ g.

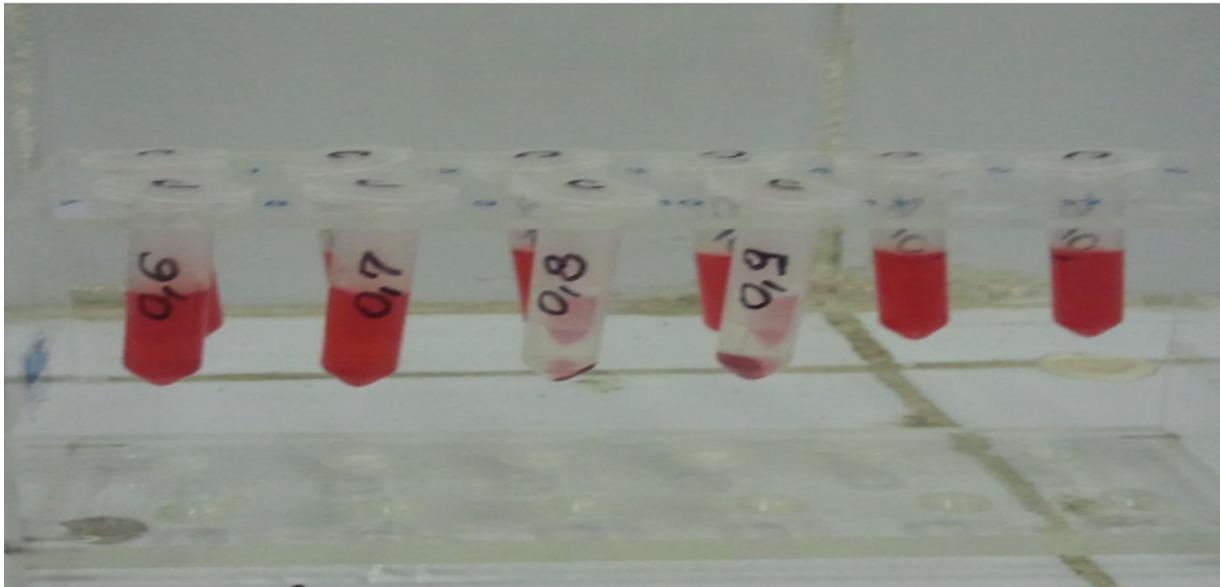


**Figure 15** : Images par Microscopie optique de la morphologie érythrocytaire en absence et en présence des alcaloïdes totaux de la graine de *Nigella damascena*. (A) Cellules contrôle ;(B) cellules incubées avec 500  $\mu$ g/ml; (C) Cellules incubées avec 4000  $\mu$ g/ml. (À gauche : Gx25 ; à droite : Gx1000) .

### IV.3. La fragilité osmotique

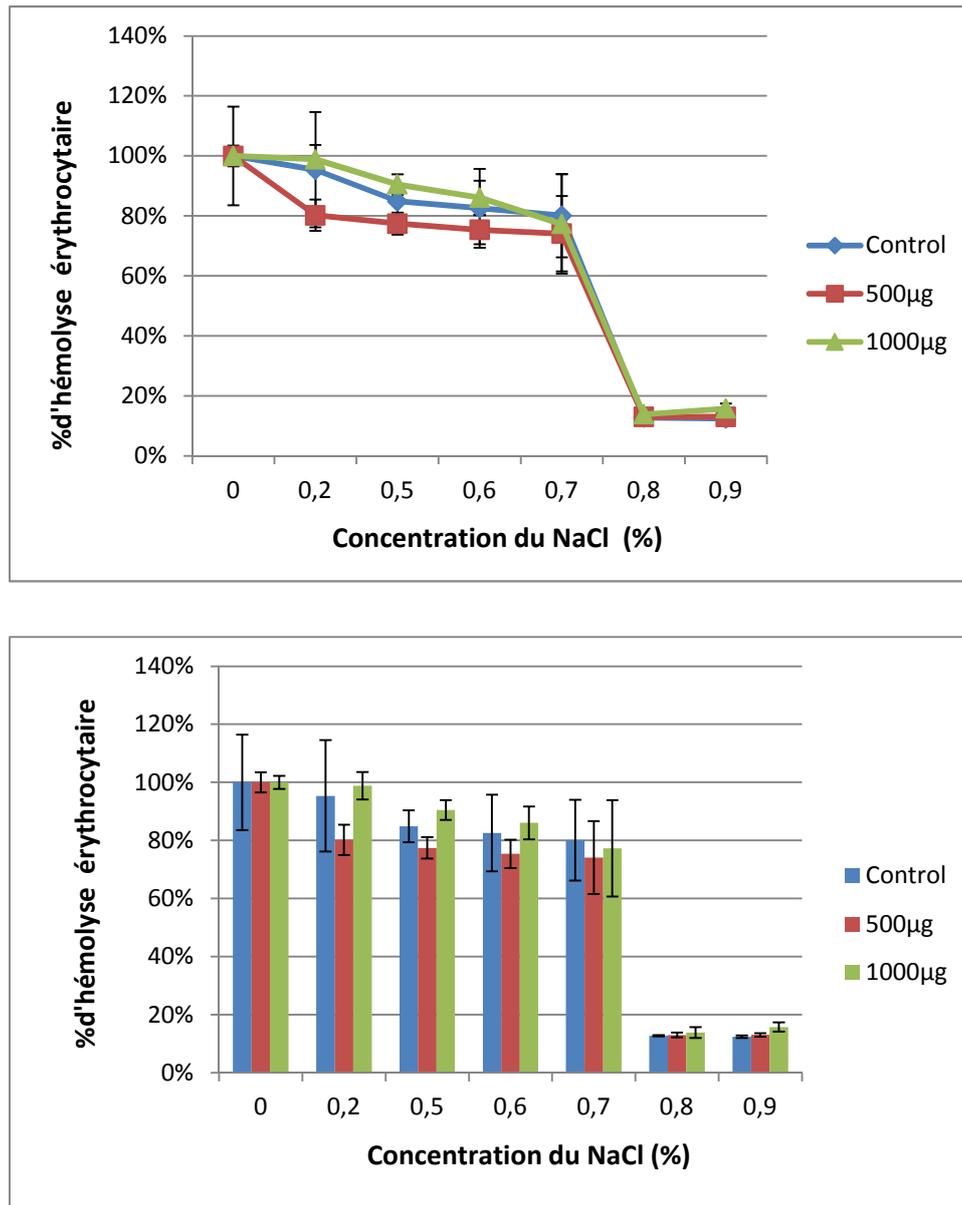
#### IV.3.1. Visualisation à l'œil nu

Une observation directe des résultats (**Figure 16**) a été faite, par comparaison avec les témoins : positif (eau distillée : 0%) et négatif (eau physiologique : 0,9%). Les autres tubes en fonction de la concentration décroissante du NaCl.



**Figure 16:** Processus hémolytique par déviations de l'hémoglobine (ici concernant le contrôle).

La figure 17 montre un profil de fragilité osmotique typique des érythrocytes traités et non traités par des alcaloïdes totaux. En présence de 500 $\mu$ g d'alcaloïdes, l'hémolyse a été diminuée et cela est surtout très apparent aux faibles concentrations de NaCl (de 0,2 à 0,7), mais cette différence tend à diminuer à des concentrations qui se rapprochent de la concentration isotonique et c'est pour cette raison que la concentration effectrice 50 (CE50) est pratiquement la même et qui est au alentour de 0,75% de NaCl (**Figure 17**).



**Figure 17 :** Courbes et histogramme représentant le pourcentage d'hémolyse lors de l'effet des différentes concentrations d'alcaloïdes (500 et 1000µg) sur la fragilité membranaire en fonction des concentrations du NaCl.

#### IV.4. Discussion générale

Ce travail a pour but d'évaluer les effets toxiques des alcaloïdes de la graine de *Nigella damascena* sur des érythrocytes humains. Le modèle de la cytotoxicité érythrocytaire est l'un des modèles directs et des plus simples.

Les 4000µg utilisés dans nos expériences est une dose réellement trop forte. Si on revient aux doses choisies lors des études toxicologiques *in vivo*, la plus forte dose conseillée par l'OCDE (organisation pour coopération et développement économique, Guideline-407, adopté le 03 octobre 2008) ne doit pas dépasser les 5000mg/kg, car une  $DL_{50}$  orale  $> 5000$  mg/kg ( $5000 < DL_{50} < 15000$  mg/kg) signifie une substance presque non toxique sur l'échelle de classification des toxiques de Hodge et Sterner (1949) chez les rats de laboratoire.

Selon **Van Miert (1986)**, la dose équivalente par kg pour l'homme à partir des doses choisies chez le rat est obtenue en divisant la dose chez le rat sur un facteur de (6,3), en tenant compte à la surface du corps ( $m^2$ ), du poids corporel (kg) chez le rat et l'homme. Compte tenu aussi du volume du sang qu'on a utilisé au cours de nos expériences d'hémolyse par rapport à celui du volume du sang total de l'homme, la dose de 5000mg représente 7,73µg. Il donc claire que, la plus forte concentration utilisée dans notre test de cytotoxicité est approximativement 500 fois cette dose. Le pourcentage d'hémolyse observé avec cette concentration n'as presque aucun effet ( $P > 0.05$ ). Les observations microscopiques ainsi que le taux d'hémolyse sont en parfaite corrélation, car aucun effet sur la morphologie érythrocytaire n'a été détecté. On constate donc que nos alcaloïdes sont loin d'être toxiques. Ces résultats confirment ceux obtenus *in vivo*. Les expérimentations animales ont indiqué que de fortes doses d'alcaloïdes de *Nigella damascena* ont une faible toxicité aiguë, avec une  $DL_{50}$  orale chez des souris de plus de 1800mg/kg du poids corporel (**Bekemeier et al., 1967**). En plus, les travaux de **Bougezza et al. (2013)** sur l'extrait méthanolique de la graine de *Nigella damascena* sur des souris Swiss Albinos montrent que cette plante est pratiquement inoffensive. Ces résultats sont comparables à ceux **delin et al. (1998)** qui ont démontré qua la berbérine, un alcaloïde de *coptis chinensis* ne provoque pas d'hémolyse. De même **Bribi et al. (2013)** qui ont démontré que 1000µg d'alcaloïdes de *Fumaria capréolata* n'ont aucun effet sur l'hémolyse.

Concernant l'effet de nos alcaloïdes sur la fragilité osmotique, un effet remarquable est celui en présence de 500µg d'alcaloïdes. L'hémolyse a été diminuée et cela est surtout très apparent aux faibles concentrations d'NaCl (de 0,2 à 0,7), c'est-à-dire à forte pression osmotique. Il est donc fort probable qu'à une certaine concentration, les alcaloïdes protègent la membrane érythrocytaire en renforçant la résistance membranaire et donc, la stabilité membranaire. En effet, les alcaloïdes de *Nigella damascena* sont très lipophiles (**Fico et al., 2004**), on pense que ces alcaloïdes s'intègrent à la membrane érythrocytaire et de ce fait renforce sa résistance contre les perturbations de la pression osmotique qui génère des perturbations membranaires. Les travaux d'Avraham and Avinoam (1973), montrent que la stabilisation des érythrocytes est affectée par la polarité et le degré d'insaturation du composé ajouté et par le niveau d'hémolyse employée et c'est l'interaction des deux parties polaires et hydrophobe d'un composé stabilisateur de la membrane érythrocytaire qui contribue à l'effet global de stabilisation.

Ces résultats donc montrent la non toxicité de nos alcaloïdes et confirment les résultats de la toxicité aiguë obtenus *in vivo* par les travaux de **Bekemeier et al (1967)** mais apportent en plus un probable potentiel effet stabilisateur membranaire de ces alcaloïdes.

**CONCLUSION**

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

---

La graine de *Nigella damascena* est une plante herbacée moyennement riche en alcaloïdes, si on la compare avec les plantes à alcaloïdes dont le taux d'alcaloïdes atteint dans certains cas les 80% des métabolites secondaires.

L'étude de la cytotoxicité érythrocytaire par les alcaloïdes totaux de *Nigella damascena* par de fortes doses (jusqu'à 4000µg/ml de sang) qui excèdent la limite de doses conseillées par l'OCDE n'a provoqué ni hémolyse ni changement dans l'intégrité structurale membranaire des érythrocytes après observations microscopiques à faible et à fort grossissement.

L'étude de la fragilité osmotique des érythrocytes traités avec les alcaloïdes totaux de la graine de *Nigella damascena* avec deux concentrations différentes ont montré une diminution de l'hémolyse dans l'échantillon de sang traité avec une concentration de 500µg/ml qui pourrait être dû à un effet stabilisateur de la membrane érythrocytaire de ses alcaloïdes.

La comparaison des différents résultats du test d'hémolyse, de la fragilité osmotique ainsi que l'observation microscopique montre que les alcaloïdes de la graine de *Nigella damascena*, est donc non toxique.

Vu les limitations des modèles de la cytotoxicité *in vitro* concernant la durée d'exposition aux agents toxiques, car près des trois quarts des médicaments n'expriment pas leur toxicité avec exposition aiguë, mais seulement après quelques jours d'exposition ; il serait donc important de faire une évaluation de la toxicité de ces alcaloïdes *in vivo* pour confirmer nos résultats et de confirmer l'intégration de ces alcaloïdes aux membranes et leurs effets protecteurs par des techniques plus poussées.

# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## Références bibliographiques

---

### A

- ❖ **Agradi, E., Fico, G., Cillo, F., Francisci, C., & Tomè, F.** (2001). Estrogenic activity of phenolic compounds from *Nigella damascena* evaluated using a recombinant yeast screen. *Planta medica*, 67 (06), 553-555.
- ❖ **Ameisen, J. C., Chikh, A., Bongiorno-Borbone, L., Knight, R. A., & Melino, G.** (2005). Cette mort nécessaire à la vie. *Journal de la Société de Biologie*, 199 (3), 267-276 .
- ❖ **Aniszewski , T.**(2007) .Alkaloid chemistry , biological significance , application and ecological role. In: Alkaloids- secrets of life. *1<sup>st</sup> Edition Elsevier*, 387-392.
- ❖ **Augry, F., Ravaud, P., Lopez, I., Letellier, D., Iltis, A., Bouscary, D., & Hazebroucq, G.** (1998). Erreurs de prescription des médicaments cytotoxiques: étude prospective de 5 000 ordonnances. *Journal de Pharmacie Clinique*, 17 (1), 20-4.
- ❖ **Avraham R and Avinoam L.** (1973). Differential effects of lipids on the osmotic fragility of erythrocytes *Biochimica et Biophysica Acta*, 311, 222-229.

### B

- ❖ **Brito, M.A, Silva, R. F., & Brites, D.** (2006). Bilirubin toxicity to human erythrocytes: a review. *Clinica chimica acta*, 374 (1), 46-56.
  - ❖ **Bouguezza, Y., . Bribi, N., Tacherfiout, M., , Amara, S., and Khettal, B.,** (2012). acute and sub-chronic toxicity study of *Nigella damascena* methanolic seed extract in mice. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4 (2), 413 – 419.
  - ❖ **Bonnier, G. E. M.** (1990). La grande flore en couleurs de Gaston Bonnier: France, Suisse, Belgique et pays voisins. *Paris: Editions Belin*, 5.
  - ❖ **Brooker, C.** (2000). Le corps humain: Étude, structure et fonction. Bruxelles : 2eme édition . De Boeck , 344-400
  - ❖ **Brown, J. M.** (1982). The mechanisms of cytotoxicity and chemosensitization by misonidazole and other nitroimidazoles. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 8 (3), 675-682.
  - ❖ **Bruneton , J.** (1987) . Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. *1<sup>ère</sup> Edition Technique et Documentation Lavoisier*, P 585.
-

## Références bibliographiques

---

- ❖ **Bruneton, J.** (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3<sup>ème</sup> Edition *Technique et Documentation Lavoisier*, 784-873.
- ❖ **Bruneton, J.** (2009). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales, Paris : 4<sup>ème</sup> Edition, *Technique et Documentation Lavoisier*, 841-842.

### C

- ❖ **Cohen, A.** (2002). Coeur et médecine interne. paris : 1<sup>er</sup> edition .*ESTEM* ,1904 .
- ❖ **Combier-Veuillet, C.** (2007). Passeur de vie, passeur de mort. *Le Divan familial*, (1), 169-178.
- ❖ **Cruz Silva, M. M., Madeira, V., Almeida, L. M., & Custódio, J.** (2000). Hemolysis of human erythrocytes induced by tamoxifen is related to disruption of membrane structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1464(1), 49-61.

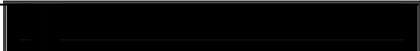
### D

- ❖ **Dausset, J.** (1976). Le complexe HLA. Les associations entre HLA et maladies. *Nouv. Presse Méd*, 5, 1477-1482
- ❖ **Delaunay, J.** (2007). The molecular basis of hereditary red cell membrane disorders. *Blood reviews*, 21(1), 1-20.

### E

- ❖ **Ewins, A. J.** (1912). LXII.—The constitution and synthesis of damascenine, the alkaloid of nigella damascena. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 101, 544-552.

### F

- ❖ **Fariss, M. W., Chan, C. B., Patel, M., Van Houten, B., & Orrenius, S.** (2005). Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Molecular interventions*, 5(2), 94.
  - ❖ **Fico, G., Panizzi, L., Flamini, G., Braca, A., Morelli, I., Tomè, F., & Cioni, P. L.** (2004). Biological screening of Nigella damascena for antimicrobial and molluscicidal activities. *Phytotherapy Research*, 18(6), 468-470.
- 
- 

## Références bibliographiques

---

### G

- ❖ **Garrett, R. H., & Grisham, C. M.** (2005). *Biochemistry*, Thomson Learning. *Inc., Stamford, Conn.*
- ❖ **Guignard, J.K.** (1996). *Biochimie végétale*. Paris : édition MASSON .174-192
- ❖ **Guignard, J.L.** (2000). *Abrégés de Biochimie Végétale*. 2ème Edition Dunod, pp : 171-209
- ❖ **Guignard, J.L.** (2001) .*Botanique systématique moléculaire*. Paris : Masson, 12<sup>ème</sup> Edition , p 304.

### H

- ❖ **Heiss, A. G., & Oeggl, K.** (2005). The oldest evidence of *Nigella damascena* L.(Ranunculaceae) and its possible introduction to central Europe. *Vegetation history and archaeobotany*, 14(4), 562-570.
- ❖ **Hurabielle, M., Paris, M.**(1980) .Abrégé de matière médicale, pharmacognosie ,Masson , 55-60.

### J

- ❖ **Jabbour, F., Nadot, S., & Damerval, C.** (2009). Evolution of floral symmetry: A state of the art. *Comptes rendus biologies*, 332(2), 219-231

### K

- ❖ **Kaplowitz, N.** (2005). Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nature reviews Drug discovery*, 4(6), 489-499.
- ❖ **Kültz, D.** (2005). Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu. Rev. Physiol.*, 67, 225-257.

### L

- ❖ **Labie, D., & Elion, J.** (2005). Bases moléculaires et physiopathologiques des maladies de l'hémoglobine. *EMC-Hématologie*, 2(4), 220-239.
  - ❖ **Lee, H. C., & Wei, Y. H.** (2005). Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37(4), 822-834
-

## Références bibliographiques

---

- ❖ **Letois, B., Lancelot, J. C., Rault, S., Robba, M., Tabka, T., Gauduchon, P., Bertreux, E., Le Talaer, J. Y.** (1990). Étude de la cytotoxicité in vitro de dérivés du carbazole III. 3-Amino et 3-nitro-1, 4-diméthyl-9H-carbazoles diversement substitués en position 6. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 25(9), 775-784.
- ❖ **Levy, R.** (1923). Sur le mécanisme de l'hémolyse par le venin de Scolopendre. *CR Acad. Sci.(Paris)*, 177, 1326-1328.
- ❖ **Lewis, W., Day, B. J., & Copeland, W. C.** (2003). Mitochondrial toxicity of NRTI antiviral drugs: an integrated cellular perspective. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(10), 812-822.
- ❖ **LIPKA, S., SINGH, J., HURTADO, J., AVEZBAKIYEV, B., ATALLAH, J., & MUSTACCHIA, P.** (2012). Hémolyse extravasculaire imitant un ictère obstructif grave. *Transfusion clinique et biologique*, 19(6), 366-367.
- ❖ **Lin N., Gao X., Li J., Zhu J.** (1998). Influence of huanglian and berberine on the erythrocytic osmotic fragility of experimental glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in rats, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 23 (9), 562-564.

## M

- ❖ **Magedov, I. V., & Kornienko, A.** (2012). Multicomponent reactions in alkaloid-based drug discovery. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 1-6.
  - ❖ **Marek, R.; Seckarova, P.; Holova, D.; Marek, J. & Sklenar, V.** (2003) . Secondary metabolites. *Nat.Prod*, 66 : 481-486.
  - ❖ **Martin, F., Legat, C., Coutet, J., Bracco-Nolin, C. H., Jacquet, M., Woronoff-Lemsi, M. C., & Limat, S.** (2004). Maîtrise des erreurs de préparation des médicaments anticancéreux en unité centralisée : de l'épidémiologie à l'assurance qualité. *Bulletin du cancer*. 91(12).972-976 .
  - ❖ **Moreau, F.** (1964). *Alcaloïdes et plantes alcaloïfères: par Fernand Moreau, 3eme édition* . Presses universitaires de France . 109
  - ❖ **Morissette, G., Moreau, E., René, C., & Marceau, F.** (2004). Massive cell vacuolization induced by organic amines such as procainamide. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 310(1), 395-406.
-

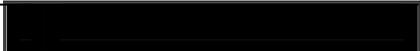
**O**

- ❖ **O'Brien, P. J., Kalow, B. I., Brown, B. D., Lumsden, J. H., and Jacobs, R. M.** (1989) Porcine malignant hyperthermia susceptibility: halothane-induced increase in cytoplasmic free calcium of peripheral blood lymphocytes. *Am. J. Vet. Res.* 50, 131–135.
- ❖ **O'brien, P. J., Irwin, W., Diaz, D., Howard C. E., Krejsa, C. M., Slaughter, M. R. Hougham, C.** (2006). High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with in vitro cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening. *Archives of toxicology*, 80(9), 580-604.
- ❖ **O'Brien, P.J., & Haskins, J. R.** (2006). In vitro cytotoxicity assessment. *In High Content Screening*. 356.415-425

**P**

- ❖ **Park, B. K., Kitteringham, N. R., Maggs, J. L., Pirmohamed, M., & Williams, D. P.** (2005). The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45, 177-202.
- ❖ **Perrier, R., Van der Kemp, T. A., & Zonszain, F.** (1997). *Expériences faciles et moins faciles en sciences biologiques*. paris :édition Doin .85-80
- ❖ **Prchal, J. T., & Gregg, X. T.** (2005). Red cell enzymes. *ASH Education Program Book*, 2005(1), 19-23 .

**R**

- ❖ **Ruffié, J.** (1993). *Naissance de la médecine prédictive*. Paris : Editions Odile Jacob . 377-380
- 
- 

## Références bibliographiques

---

### S

- ❖ **Schmauder, H. P., end Doebel, P.** (1991). XIX *Nigella* spp.: in vitro culture, regeneration, and the formation of secondary metabolites. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 15, 311-336.
- ❖ **Sébahoun, G.** (2005). *Hématologie clinique et biologique*. France : Arnette. 2eme edition .78
- ❖ **Slaughter, M. R., Thakkar, H., & O'Brien, P. J.** (2002). Effect of diquat on the antioxidant system and cell growth in human neuroblastoma cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 178(2), 63-70.
- ❖ **Sharma, B., Rai, D. K., Rai, P. K., Rizvi, S. I., & Watal, G.** (2010). Determination of erythrocyte fragility as a marker of pesticide-induced membrane oxidative damage. In *Advanced Protocols in Oxidative Stress II* .Humana Press. 123-128.
- ❖ **Sowemimo-Coker, S. O.** (2002). Red blood cell hemolysis during processing. *Transfusion medicine reviews*, 16(1), 46-60.
- ❖ **Sussman, N. L., Walterschied, M., Butler, T., Cali, J. J., Riss, T., Kelly, J. H., ... & Corporation, P.** (2002). The predictive nature of high throughput toxicity screening using a human hepatocyte cell line. *Cell Notes*, 3, 7-10.
- ❖ **Stevens, A., & Lowe, J.** (1997). *Histologie humaine*. paris : De Boeck . 1eme édition . 100-105

### T

- ❖ **Tramer, F., Da Ros, T., & Passamonti, S.** (2012). Screening of Fullerene Toxicity by Hemolysis Assay. In *Nanotoxicity*.. 203-217
- ❖ **Tulukcu, E.** (2011). A comparative study on fatty acid composition of black cumin obtained from different regions of Turkey, Iran and Syria. *Afr J Agric Res*, 6(4), 892-895.

### V

- ❖ **Van M.** (1986). The use in animals of drugs licensed for human use only. In: Van Miert, A.S.J.P.A.M., Bogaert, M.G., Debackere, M. (Eds.), *Comparative Veterinary Pharmacology, Toxicology and Therapy*. MTP Press, Boston, 489–500.
-

## Références bibliographiques

---

- ❖ **Valensi, F.** (2005). Morphologie des cellules sanguines normales. *EMC-Hématologie*, 2(1), 1-13.
- ❖ **Vishin, M. L., Mothes, K., Engelbrecht, L., & Schröter, H. B.** (1960). Biosynthesis of Damascenine in *Nigella damascena* L. *Nature*, 188, 61-62.
- ❖ **Vlès, F.** (1923). Notes sur les propriétés spectrales de l'hémoglobine des annelides. *Arch. d. physique Biol*, 1-28.

### W

- ❖ **Wajcman, H.** (2005). Hémoglobines: structure et fonction. *EMC-Hématologie*, 2(3), 145-157.
- ❖ **Wang, C., Qin, X., Huang, B., He, F., & Zeng, C.** (2010). Hemolysis of human erythrocytes induced by melamine–cyanurate complex. *Biochemical and biophysical research communications*, 402(4), 773-777.

### X

- ❖ **Xu, J. J., Diaz, D., & O'Brien, P. J.** (2004). Applications of cytotoxicity assays and pre-lethal mechanistic assays for assessment of human hepatotoxicity potential. *Chemico-biological interactions*, 150(1), 115-128.



# GLOSSAIRES

### ➤ **Anthraquinone**

Appartient à la famille chimique des hydrocarbures aromatiques polycycliques. C'est un dérivé de l'anthracène. Présent à l'état naturel chez un certain nombre d'animaux et de plantes, il est aussi une substance active de produit phytosanitaire (ou produit phytopharmaceutique, ou pesticide), qui présente un effet répulsif à l'égard des oiseaux.

### ➤ **Antinéoplasiques**

Se sont des médicaments qui font partie des chimiothérapies cytotoxiques et qui visent à bloquer la mitose, c'est-à-dire la division cellulaire. Ils sont le plus souvent employés en thérapeutique antitumorale. Ils regroupent plusieurs dizaines de médicaments parmi lesquels les agents alkylants (sels de platine, moutardes azotées...), les antimétabolites, les agents intercalants et les antimitotiques.

### ➤ **Antiarythmique**

Les agents antiarythmiques sont une classe de médicaments utilisés pour supprimer les rythmes accélérés du cœur (arythmies cardiaques), tels que la fibrillation auriculaire, le flutter auriculaire, la tachycardie ventriculaire et la fibrillation ventriculaire.

### ➤ **Bleu de trypan**

C'est un colorant vital utilisé pour colorer sélectivement les tissus ou cellules morts. Le bleu de trypan est aussi connu sous le nom de bleu diamine et de bleu Niagara.

### ➤ **Fibrates**

Famille de molécules médicamenteuses hypolipémiantes.

### ➤ **Nécrose**

La nécrose est une forme de dégât cellulaire qui mène à la mort prématurée et non programmée des cellules dans le tissu vivant

### ➤ **Phospholipidose**

Maladie de surcharge lysosomale, caractérisé par l'accumulation excessive de phospholipides dans les tissus.

### ➤ **Polyarthrite rhumatoïde**

La cause la plus fréquente des polyarthrites chroniques, est une maladie dégénérative inflammatoire chronique, elle est caractérisée par une atteinte articulaire souvent bilatérale et symétrique, évoluant par poussées vers la déformation et la destruction des articulations atteintes.

### ➤ **Psoriasis**

C'est une maladie autoimmune de la peau d'origine mal connue, en partie génétique. Cette affection dermatologique touche 1 à 3 % de la population mondiale. Dans sa forme bénigne, le psoriasis se limite au cuir chevelu, aux ongles, aux genoux, aux coudes, aux pieds, aux mains et, parfois, aux organes génitaux. Dans les cas graves, il s'étend et peut gagner la totalité du corps.

### ➤ **Statines**

Classe d'hypolipémiants, utilisés comme médicaments pour baisser la cholestérolémie de personnes qui risquent une maladie cardiovasculaire à cause de leur hypercholestérolémie.

## **Résumé**

*Nigella damascena est une plante de la famille des Renonculacée, utilisée en phytothérapie traditionnelle pour le traitement de l'affection catarrhale et comme diurétique. La poudre des graine est utilisé comme sternutatoire.*

*L'étude de la cytotoxicité des alcaloïdes totaux de Nigella damascena sur les cellules érythrocytaires après traitement avec différentes concentrations d'alcaloïdes totaux ne provoquent ni hémolyse ni changement morphologique des érythrocytes par observation microscopique à une concentration qui atteint 4000µg/ml de sang.*

*L'étude de la fragilité osmotique des érythrocytes traitées avec les alcaloïdes totaux de la graine de Nigella damascena a montré une diminution de l'hémolyse dans l'échantillon de sang traité avec une concentration de 500µg/ml qui pourrait être du à un effet stabilisateur de la membrane érythrocytaire de ces alcaloïdes.*

**Mots clés :** Cytotoxicité, érythrocyte, Nigella damascena, alcaloïdes.

---

## **Abstract**

*Nigella damascena is a plant of the Ranunculaceae family, used in traditional herbal medicine for the treatment of catarrhal affection and as diuretic. The seed powder is used as sternutatory.*

*The study of the cytotoxicity of total alkaloids of Nigella damascena on erythrocyte cells after treatment with different concentrations of total alkaloids do not cause hemolysis or morphological change of erythrocytes by microscopic observation at a concentration that reaches 4000µg/ml of blood.*

*The study of the osmotic fragility of erythrocytes treated with total alkaloids from the seed of Nigella damascenna showed a decrease of hemolysis in the blood sample treated with a concentration of 500µg/ml, which could be due to a stabilizing effect the erythrocyte membrane of these alkaloids.*

**Keywords:** Cytotoxicity, Erythrocyte, Nigella damascena, Alkaloids