

Sommaire

SOMMAIRE	I
RESUME	II
ABSTRACT	III
الملخص	IV
TABLE DES MATIERES	V
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES TABLEAUX	XI
LISTE DES ABREVIATIONS	XII
INTRODUCTION	1
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE : CHAPITRE 1. L'ASTHME ALLERGIQUE	4
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE : CHAPITRE 2. LE STRESS OXYDANT ET L'ASTHME ALLERGIQUE	14
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE : CHAPITRE 3. LE TABAC SANS FUMEE	24
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE : CHAPITRE 4. LA GRAINE DE NIGELLE (<i>Nigella Sativa</i>)	33
PARTIE EXPERIMENTALE : MATERIEL ET METHODES	44
PARTIE EXPERIMENTALE : RESULTATS & DISCUSSION	68
CONCLUSION	110
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	112
ANNEXES	132

Résumé :

Ce travail a pour but d'évaluer les effets de l'extrait aqueux du tabac sans fumée (TSF), à une dose de 40 mg/kg, pendant 15 jours, sur un terrain asthmatique allergique dans un modèle expérimental chez le rat Wistar sensibilisé à l'ovalbumine, tout en évaluant les effets préventifs de l'huile de *Nigella sativa*, à une dose de 4 ml/kg/jour, à la fois vis à vis des effets de la sensibilisation allergénique mais aussi contre ceux du TSF.

Dans un premier temps, et afin de mesurer l'intensité de l'inflammation bronchique, les taux en interleukine-4, en oxyde nitrique et en protéines totales dans le sérum et le liquide du lavage broncho-alvéolaire (LBA) ont été mesurés. Par la suite, les paramètres du stress oxydant sont analysés dans les érythrocytes, les poumons et le foie. De plus, le dosage des paramètres biochimiques, pour l'exploration fonctionnelle hépatique et rénale, a été effectué. Enfin, une étude histopathologique des poumons, du foie et des reins a été réalisée.

Les résultats montrent que l'administration du TSF aux rats sensibilisés provoque une augmentation de l'IL-4 et de NO aussi bien dans le sérum que dans le liquide du LBA ; ainsi qu'une modification sur l'architecture tissulaire pulmonaire, hépatique et rénale. Ces effets sont nettement atténués lors du traitement par la plante. Les résultats montrent aussi, que le TSF provoque une peroxydation lipidique intense, avec une augmentation des taux des protéines carbonylées, un épuisement important du GSH et des thiols non protéiques, ainsi qu'une réduction significative de l'activité des différents systèmes antioxydants (GPx, SOD et CAT). Toutefois, le prétraitement par l'huile de *Nigella sativa* révèle le rétablissement de ces paramètres. Egalement, les résultats des paramètres biochimiques montrent que le TSF provoque une augmentation significative de l'activité enzymatique des transaminases plasmatiques et de la phosphatase alcaline comparativement aux rats sensibilisés et du groupe témoin. Cependant, le traitement par la plante a montré une amélioration considérable de l'activité de ces enzymes.

L'ensemble de ces résultats suggère que le TSF est un facteur de risque responsable de l'aggravation de l'inflammation allergique. Enfin, nos résultats confirment que l'huile de *Nigella sativa* est un anti-inflammatoire et un antioxydant efficace pour atténuer l'intensité du stress oxydant engendré dans un modèle d'asthme expérimental et représenterai un traitement potentiel dans cette pathologie, mais aussi contre les effets délétères du TSF.

Mots clés : Tabac sans fumée, Inflammation allergique, Stress oxydant, Rat wistar. *Nigella sativa*

Abstract:

This work aims to evaluate the effects of the administration of an aqueous extract of smokeless tobacco (ST) at a dose of 40 mg/kg for 15 days in wistar rats previously sensitized with ovalbumin (Ova). Thus, while evaluating the preventive effects of *Nigella sativa* oil, at a dose of 4 mL/kg/day, against both allergen sensitization effects and those of TSF.

Initially, in order to measure the intensity of bronchial inflammation, the levels of interleukin-4, nitric oxide and total proteins in serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were measured. Subsequently, oxidative stress parameters are analyzed in erythrocytes, lungs and liver. In addition, the assay of biochemical parameters for functional liver and renal exploration. Finally, an histopathological study of the lungs, liver and kidneys was performed.

The results show that administration of ST to Ova sensitized rats causes an increase of IL-4 and NO in both serum and BALF; as well as an important cellular modification on pulmonary, hepatic and renal tissue architecture. These effects are significantly reduced during treatment with the plant. The results also show that ST causes intense lipid peroxidation, increased levels of carbonyl protein groups, significant depletion of reduced glutathione (GSH) and non-protein thiols (NPSH), as well as a significant reduction in different antioxidant systems (GPx, SOD and CAT). However, pretreatment with *Nigella sativa* oil is revealed by the restoration of these parameters. Also, the results of the biochemical parameters show that ST causes a significant increase in plasma transaminase enzymes activity and alkaline phosphatase by comparing to the Ova sensitized rats and the control group. However, the treatment with the plant has shown a considerable regulation of the activity of these enzymes.

All of these results suggest that smokeless tobacco is a risk factor responsible for the aggravation of allergic inflammation as well as the cytotoxicity induced by oxidative stress in subjects with allergic asthma. Finally, our results confirm that *Nigella sativa* oil is an anti-inflammatory and antioxidant effective in mitigating the intensity of oxidative stress generated in an experimental asthma model and will represent a potential treatment in this pathology, but also against the deleterious effects of smokeless tobacco.

Keywords: Smokeless tobacco, Sensitization, Allergic inflammation, Oxidative stress, Wistar rat.

الملخص:

يهدف هذا العمل إلى تقييم الآثار الناتجة عن مستخلص مائي من التبغ بجرعة 40 ملغم / كغم لمدة 15 يوما عند الفئران من سلالة Wistar محفزة سابقا عن طريق مستضد مادة الزلال (Ovalbumine). وهذا، لدراسة الآثار الوقائية والعلاجية لزيت الحبة السوداء بجرعة 4 مل / كغ / يوم، على الربو الناجم تجريبيا وكذلك الآثار الناتجة عن استهلاك التبغ.

في البداية، من أجل قياس شدة التهاب الشعب الهوائية، تم قياس مستويات الانترلوكين 4 (IL-4) وأكسيد النيتريك والبروتينات الكلية في مصل الدم وسائل الغسيل القصبي (LBA). وفي وقت لاحق، تم تحليل معلمات الإجهاد التأكسدي في كريات الدم الحمراء والرنيتين والكبد. وبالإضافة إلى ذلك، فحص المعلمات الكيميائية الحيوية للكبد والكلية. وأخيرا، أجريت دراسة نسيجية للرنيتين والكبد والكلية.

أظهرت النتائج أن إعطاء التبغ إلى الفئران المحفزة يسبب زيادة في IL-4 وأكسيد النيتريك في كل من مصل الدم وسائل الغسيل القصبي. فضلا عن تغيرات خلوية هامة على مستوى الأنسجة الرئوية والكبدية والكلوية. وتقلل هذه التأثيرات بشكل ملحوظ أثناء المعالجة بزيت الحبة السوداء. وأظهرت النتائج أيضا أن التبغ يسبب ارتفاع شديد بيروكسيد الدهون، وزيادة مستويات البروتين الكربوني، وانخفاض الجلوتاثيون (GSH) والثيول غير البروتينية (NPSH)، فضلا عن انخفاض كبير في مضادات الأكسدة الجزئية والأنزيمية المختلفة (GPx, SOD, CAT). في حين، تؤدي المعالجة المسبقة بزيت الحبة السوداء إلى استعادة معتبرة في هذه المعلمات. كما أظهرت نتائج المعلمات البيوكيميائية أن التبغ يسبب زيادة معتبرة في نشاط انزيمات Transaminases و Phosphatase alkaline بالمقارنة مع الفئران المحفزة والمجموعة الشاهدة. في حين، تؤدي المعالجة المسبقة بزيت الحبة السوداء إلى استعادة معتبرة في نشاط هذه الانزيمات.

كل هذه النتائج تشير إلى أن التبغ القموي هو عامل خطر مسؤول عن تفاقم التهاب الحساسية وكذلك السمية الخلوية الناجمة عن الإجهاد التأكسدي عند الأشخاص الذين يعانون من الربو التحسسي. ولذلك، من المهم زيادة الوعي العام، خاصة عند الشباب، بالخطر غير المشكوك فيه الذي يمثله هذا النوع من التبغ. أخيرا، تؤكد نتائجنا أن زيت الحبة السوداء هو مضاد للالتهابات ومضادات الأكسدة فعال في التخفيف من شدة الإجهاد التأكسدي المتولد في نموذج الربو التجريبي، وقد تمثل العلاج المحتمل في هذه الأمراض وكذلك ضد الآثار الضارة الناجمة عن استهلاك هذا النوع من التبغ.

الكلمات الدالة: التبغ القموي، الحساسية، الالتهاب التحسسي، الإجهاد التأكسدي، الفئران wistar.

Table des matières

SOMMAIRE	I
RÉSUMÉ	II
ABSTRACT	III
الملخص	IV
TABLE DES MATIERES	V
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES TABLEAUX	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XII
INTRODUCTION	1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE :

CHAPITRE I. L'ASTHME ALLERGIQUE	4
1. PRÉVALENCE DE LA MALADIE	4
2. FACTEURS INFLUENÇANT L'EXPRESSION ET LE DÉVELOPPEMENT DE L'ASTHME	5
2.1. Facteurs de l'hôte	5
2.1.1. Génétique de l'hôte	5
2.1.2. Obésité	6
2.1.3. Sexe	6
2.2. Facteurs environnementaux	6
2.2.1. Les allergènes	7
2.2.2. Les infections respiratoires virales	7
2.2.3. Le tabac	7
2.2.4. Les polluants de l'air	8
3. RÉACTION INFLAMMATOIRE DE L'ASTHME	8
3.1. Mécanisme de la réaction asthmatique	8
3.2. Cellules impliquées dans la réaction asthmatique	9
3.2.1. Mastocytes	9
3.2.2. Cellules épithéliales respiratoires	11
3.2.3. Macrophages	11
3.2.4. Cellules dendritiques	11
3.2.5. Polynucléaires éosinophiles	11
3.2.6. Lymphocytes T	11
3.2.7. Polynucléaires neutrophiles et basophiles	12
3.2.8. Lymphocytes B	12
3.3. Médiateurs de la réaction asthmatique	12
3.3.1. Les immunoglobulines E	12
3.3.2. L'histamine	13
3.3.3. Les cytokines	13
3.3.4. Les chimiokines	13
3.3.5. Le monoxyde d'azote (NO).....	13
3.3.6. Les leucotriènes	13
CHAPITRE II. LE STRESS OXYDANT ET L'ASTHME ALLERGIQUE	14
1. DÉFINITION.....	14
2. LES ESPÈCES RÉACTIVES DE L'OXYGÈNE ET LES ESPÈCES RÉACTIVES DU NITROGÈNE	14
2.1. Sources des espèces réactives de l'oxygène	16
2.1.1. La mitochondrie	16
2.1.2. La NADPH oxydase	16
2.1.3. Peroxysome	16
2.1.4. Xanthine oxydase	16
2.1.4. Autres sources (exogènes)	16
3. LES ANTIOXYDANTS	17
3.1. Les antioxydants enzymatiques	17
3.1.1. Les superoxydes dismutases (SOD)	18
3.1.2. La catalase (CAT)	18

3.1.3. La Glutathion peroxydase (GPx).....	18
3.1.4. Les peroxyredoxines (PRX) ou thioredoxines peroxydases	18
3.2. Les antioxydants non-enzymatiques	18
3.2.1. Le glutathion réduit (GSH)	18
3.2.2. Les vitamines C et E	18
3.2.3. Les flavonoïdes	19
4. IMPLICATION DU STRESS OXYDATIF DANS L'ASTHME	19
CHAPITRE III. TABAC SANS FUMÉE	24
1. LA PLANTE DE TABAC	24
2. LES FORMES DE TABAC SANS FUMÉE	25
2.1. Tabac à chiquer	25
2.2. Tabac à priser	25
2.3. Le snus	25
3. PRODUCTION ET DISTRIBUTION EN ALGÉRIE	26
4. CONSOMMATION	26
5. EFFETS SUR LA SANTÉ	28
5.1. Le tabac sans fumée est cancérigène pour l'homme	28
5.2. Relation tabac sans fumer et stress oxydant	29
6. LÉGISLATION/RELIGION ET TABAC	30
6.1. OMS	30
6.2. JORAD	30
6.3. Fatwas	31
CHAPITRE 4 : LA GRAINE DE NIGELLE (<i>Nigella sativa</i>)	33
1. ÉTYMOLOGIE	33
2. ASPECT BOTANIQUE DE <i>Nigella sativa</i> L.,	33
3. HISTOIRE DE <i>Nigella sativa</i> L DEPUIS LA DECOUVERTE JUSQU'À L'UTILISATION COMME REMEDE	34
4. COMPOSITION CHIMIQUE	35
5.1. L'huile fixe	36
5.2. L'huile essentielle	36
5.3. Les alcaloïdes	37
5.4. Les triterpènes saponines	38
5.5. Les flavonoïdes	38
5.6. Les protéines	38
5.7. Les vitamines et les sels minéraux	39
6. PROPRIÉTÉS PHARMACOLOGIQUES DES GRAINES DE <i>Nigella sativa</i>	40
6.1. Effets sur le système immunitaire	40
6.2. Effets anti-inflammatoire et analgésique	40
6.3. Activité antimicrobienne et antifongique	40
6.4. Effets anticancéreux et antimutagène	41
6.5. Effets sur le système gastro-intestinal	41
6.6. Effets sur le système respiratoire	41
6.7. Activité antidiabétique	41
6.8. Activité antioxydante	42
PARTIE EXPÉRIMENTALE :	
CHAPITRE 5. MATÉRIEL ET MÉTHODES	44
5.1. BUT ET OBJECTIFS	44
5.2 - ANIMAUX ET CONDITIONS D'ÉLEVAGE	44
5.3 – PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL	45
5.3.1 – Composition des lots et traitement des rats	45
5.3.2 – Sensibilisation des rats	47
5.3.3 – Provocation des animaux par l'aérosol	48
5.3.4 - Préparation et administration d'extrait de tabac sans fumée	48
5.3.5 – Administration de l'huile de <i>Nigella sativa</i>	48
5.4 - SACRIFICE ET PRÉLEVEMENT DES ORGANES	49
5.4.1. Prélèvement sanguin	49
5.4.2 - Technique du lavage broncho-alvéolaire	49

5.4.3 - Prélèvement des organes	49
5.4.4 - Préparation des homogénats de tissus	49
5.4.5 - Préparation des lysats d'érythrocytes	50
5.4.5 - Préparation des lysats d'érythrocytes	50
5.5 - DOSAGE DES PARAMETRES BIOCHIMIQUES	50
5.5.1 - Dosage des protéines totales	50
5.5.2 - Dosage des transaminases plasmatiques	51
5.3.3 - Dosage de la phosphatase alcaline (PAL) plasmatique	52
5.3.4 - Dosage d'albumine	53
5.3.5 - Dosage de l'urée plasmatique	54
5.3.6 - Dosage de la créatinine plasmatique	54
5.6 – DOSAGE DES PARAMETRES SU STRESS OXYDANT	55
5.6.1- Dosage des protéines	55
5.6.2 - Détermination de la peroxydation lipidique au niveau tissulaire	56
5.6.3 - Détermination du taux des protéines carbonylées	57
5.6.4 - Détermination du taux du glutathion réduit (GSH)	58
5.6.5 - Dosage des thiols non-protéiques (NPSH)	59
5.6.6 - Détermination de l'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx) (E.C. 1.11.1.9)	60
5.6.7 - Dosage de l'activité de la superoxyde dismutase (E.C.1.15.1.1)	61
5.6.8 - Dosage de l'activité enzymatique de la catalase (E.C.1.11.1.6)	62
5.7 - Dosage ELISA de l'IL-4	63
5.8 – Dosage de l'oxyde nitrique	65
5.9 - Etude histologique	66
5.10 - Traitement statistique	67
CHAPITRE 6. RÉSULTATS & DISCUSSION	68
1- POIDS CORPOREL	68
2 - VARIATION DE LA CONSOMMATION QUOTIDIENNE D'ALIMENT ET DE L'EAU DE BOISSON ..	68
3- POIDS ABSOLU ET RELATIF DE CERTAINS ORGANES	68
Discussion	72
4- ACTION SUR CERTAINS BIOMARQUEURS PLASMATIQUES DE LA FONCTION HÉPATIQUE ET RÉNALE	74
4-1- Protéines totales plasmatiques	74
4-2- Activité des transaminases	74
4-3- Activité de la phosphatase alcaline (PAL)	74
4-4- Albumine	74
4-5- La créatinine	74
4-6- L'urée	75
Discussion	77
5- ETUDE DES PARAMETRES DU STRESS OXYDANT	79
5.1- Les paramètres non-enzymatiques	79
5.1.1- Le malondialdéhyde	79
5.1.2- Les protéines carbonylées	79
5.1.3- Le glutathion réduit	80
5.1.4- Les thiols non protéiques (NPSH)	81
5.2- Les enzymes	86
5.2.1- La glutathion peroxydase	86
5.2.2- La catalase	86
5.2.3- La superoxyde dismutase	87
Discussion	91
6 – OXYDE NITRIQUE (NO)	98
7 - L'INTERLEUKINE-4 (IL-4)	100
8 - NOMBRE DE CELLULES ET LES NIVEAUX DE PROTÉINES TOTALES DANS LE LBA	102
Discussion	104
8 – ETUDE HISTOLOGIQUE	105
8.1 – Le tissu pulmonaire	105
8.2 – Le tissu hépatique	105
8.3 – Le tissu rénal	105
Discussion	109

CONCLUSION 110

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 112

ANNEXES 132

LISTE DES FIGURES	
Figure 1 : La prévalence de l'asthme, selon l'âge et le sexe, en Algérie.	3
Figure 2 : Classification des 61 principaux gènes associés à l'asthme selon leurs fonctions biologiques.	5
Figure 3 : Les différents acteurs cellulaires et moléculaires de la réaction inflammatoire asthmatique.	9
Figure 4 : Aperçu des différents ERO et des antioxydants régulateurs de leur production.	16
Figure 5 : Physiopathologie de l'asthme.	19
Figure 6 : Les anomalies Redox déclenchent l'apoptose dans les cellules épithéliales des voies respiratoires.	20
Figure 7 : Le stress oxydatif et nitrosant dans l'asthme.	21
Figure 8 : <i>Nicotiana tabacum</i> .	23
Figure 9 : Prévalence du tabagisme sans fumée chez les adultes dans la Région africaine de l'Organisation mondiale de la santé.	25
Figure 10 : Diagramme schématisant le métabolisme de la nicotine, le produit chimique addictif présent dans tous les produits du tabac.	28
Figure 11 : Graine de Nigelle cultivée.	32
Figure 12 : <i>Nigella sativa</i> L.	36
Figure 13 : Structure chimique des composants actifs retrouvés dans l'huile essentielle de <i>Nigella sativa</i> L.	40
Figure 14 : Structure chimique des principaux alcaloïdes de <i>N. sativa</i> L.	40
Figure 15 : Structure chimique des trois flavonoïdes isolés de <i>Nigella sativa</i> L.	41
Figure 16 : Différentes cibles moléculaires de <i>N. sativa</i> et thymoquinone dans les maladies inflammatoires.	50
Figure 17a : Compartimentation des rats en six lots traités différemment.	53
Figure 17b : Le protocole expérimental réalisé en 31 jours.	54
Figure 18 : Le protocole de sensibilisation.	55
Figure 19 : Schéma montrant la provocation des animaux par l'aérosol.	56
Figure 20 : Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique.	66
Figure 21 : Réaction entre les protéines carbonylées et le DNPH.	67
Figure 22 : Principe de dosage du glutathion.	68
Figure 23 : Réduction du réactif d'Ellman.	69

Figure 24 : Schéma du principe de la technique ELISA sandwich utilisée.	74
Figure 25 : Détection des NO_2^- par les réactifs de Griess.	75
Figure 26 : Variation des taux de MDA dans les érythrocytes (a), le foie (b) et les poumons (c) chez les rats témoins et traités.	90
Figure 27 : Variation des taux des protéines carbonylées dans les érythrocytes (a), le foie (b) et les poumons (c) chez les rats témoins et traités.	91
Figure 28 : Variation des taux du glutathion réduit dans les érythrocytes (a), le foie (b) et les poumons (c) chez les rats témoins et traités.	92
Figure 29 : Variation des taux des thiols non protéiques réduit dans les érythrocytes (a), le foie (b) et les poumons (c) chez les rats témoins et traités.	93
Figure 30 : Variation de la glutathion peroxydase dans les érythrocytes (a), le foie (b) et les poumons (c) chez les rats témoins et traités.	96
Figure 31 : Variation de la catalase dans les érythrocytes (a), le foie (b) et les poumons (c) chez les rats témoins et traités.	97
Figure 32 : Variation de la superoxyde dismutase dans les érythrocytes (a), le foie (b) et les poumons (c) chez les rats témoins et traités.	98
Figure 33 : Variation de taux des NO dans le sérum (a) et le LBA (b) chez les rats témoins et traités après 31 jours du traitement.	106
Figure 34 : Variation de taux de l'IL-4 dans le sérum (a) et le LBA (b) chez les rats témoins et traités après 31 jours du traitement.	108
Figure 35 : Photomicrographies de sections colorées H & E du poumon ($\times 400$).	114
Figure 36 : Photomicrographies de sections colorées H & E du foie ($\times 400$).	115
Figure 37 : Photomicrographie de sections colorées H & E du rein ($\times 100$ et $\times 400$).	116

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les principaux ERO et ERN, leurs formations et leurs propriétés	14
Tableau 2 : Consommation actuelle du tabac sans fumée selon le sexe, l'âge, le milieu et la région.	26
Tableau 3 : Les données de l'utilisation du tabac sans fumée selon les derniers résultats du sondage au 31 décembre 2016.	27
Tableau 4 : Différentes espèces et variétés de <i>Nigella</i> L. et leur distribution géographique.	37
Tableau 5 : Composition chimique générale des graines de <i>Nigella sativa</i> .	38
Tableau 6 : Composition minérale des graines de <i>Nigella sativa</i> .	42
Tableau 7 : Variation de poids corporel (g) chez les rats témoins et traités après 31 jours du traitement.	77
Tableau 8 : Consommation quotidienne de l'aliment et de l'eau de boisson chez les rats témoins et traités après 31 jours du traitement.	77
Tableau 9 : Variation de poids absolu (PA) (g) et relatif (PR) (g/100g de PC) du foie, des poumons et des reins chez les rats témoins et traités après 31 jours du traitement.	78
Tableau 10 : Variation de quelques paramètres biochimiques chez les rats témoins et traités après 31 jours du traitement.	83
Tableau 11 : Variation du nombre des cellules et des niveaux des protéines totales dans le LBA des rats témoins et traités après 31 jours du traitement.	101

Liste des abréviations :

AP-1 : Activator protein 1.

BAX : Bcl-2 associated X protein.

Bcl-2 : B-cell lymphoma 2 (lymphome à cellules B).

BHA : Butylhydroxyanisole.

BHT : Butylhydroxytoluène.

CAT : Catalase.

CCl₄ : Tétrachlorure de carbone.

COX-1 et 2 : Cyclo-oxygénase-1 et 2.

CXCR1 et CXCR2 : C-X-C motif chemokine receptor 1 et 2.

CXCL8 et CXCL10 : C-X-C motif chemokine ligand 8 et 10.

CRP : C-réactive protéine.

DC : Dendritic cell.

DPPH : 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle.

ECP : Eosinophil cationic protein.

EPO : Eosinophil peroxidase.

GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor.

GPx : Glutathion peroxydase.

GSH : Glutathion réduit.

GST : Glutathion S-transférase.

HRB : Hyperréactivité bronchique.

IARC : International Agency For Research On Cancer.

ILC2 : Type 2 innate lymphoid cell.

IMC : Indice moyen corpusculaire.

iNOS : Inducible nitric oxide synthase.

LPO : Lipoxygenase.

LPS : Lipopolysaccharide.

LTC₄ : Leucotriène C₄.

MAPK : Mitogen-activated protein kinase.

MBP : Major basic protein.

MDC : Macrophage-derived chemokine.

MMP13 : Matrix metallopeptidase 13.

MPO : Myéloperoxydase.

NF- κ B : Nuclear factor-kappa B.

Nrf2 : Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2.

Ns-D1 et 2 : *Nigella sativa*-defensin 1 et 2.

OX40 : OX40 receptor, aussi connu comme TNFRSF4 (Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4) et CD134.

OX40L : OX40 ligand, aussi connu comme TNFSF4 (tumor necrosis factor ligand superfamily member 4) et CD252.

PAF : Platelet activating factor.

PGE2 : Prostaglandine E2.

PGF2 : Prostaglandine F2.

PGD2 : Prostaglandine D2.

PPAR- γ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma.

SOD : Superoxyde dismutase.

STZ : Streptozotocine.

TARC : Thymus activation-regulated chemokine.

TGF- β : Tumor growth factor.

Th2 : T helper cell.

TLR-4 : Toll Like Receptor 4.

TNF- α : Tumor necrosis factor.

TQ : Thymoquinone.

TSLPR : Thymic stromal lymphopoietin protein receptor.

INTRODUCTION

Introduction :

L'addiction tabagique est une épidémie mondiale qui fait de plus en plus de ravages dans tous les pays du monde (Schivo et al., 2014). Pourtant, l'industrie du tabac continue à rassurer les consommateurs (anciens et nouveaux clients) soucieux de leur santé en leur offrant l'illusion de la sécurité et en leur proposant de nouveaux produits aux noms évoquant la santé, parfumés aux fruits ou dans de beaux emballages. Tel est le cas, en Algérie, où les jeunes (collégiens et lycéens) sont bernés par des propos attrayants qui leur font croire à de nouvelles gammes de produits soi-disant moins nocifs.

Fort heureusement, la santé publique mondiale bénéficie des forces conjuguées de l'Organisation des Nations Unies et de ses Etats Membres qui ont produit la Convention-cadre de l'Organisation mondiale de la Santé pour la lutte antitabac (CCLAT OMS) (WHO report on the global tobacco epidemic, 2017) outil puissant pour combattre le tabagisme sous toutes ses formes, car toutes sont mortelles !

Dans notre présente étude, nous avons choisi de contribuer à la lutte anti-tabagique en menant une étude expérimentale chez les rats wistar. Pour cela, nous nous sommes intéressés aux effets d'une forme locale de tabac sans fumée. Seulement, beaucoup de travaux ont été réalisés chez des animaux de laboratoire afin d'étudier les effets du tabac, mais aucune étude, à notre connaissance, n'a testé le tabac sans fumée sur un terrain d'asthme allergique. En effet, Annaba étant une ville côtière, humide, elle comporte une population à forte prédisposition pour l'asthme allergique (Meharzi et al., 2017). Aussi, il nous a paru utile d'entreprendre des investigations combinant consommation de tabac sans fumée et pathologie d'asthme allergique. Nul n'ignore que cette pathologie constitue également un important problème de santé publique puisqu'elle touche environ 300 millions de personnes de tous âges dans le monde et augmente de 50% par décennie (Abdel-Aziz et al., 2014). La réponse inflammatoire est caractérisée par une augmentation du nombre d'éosinophiles et de mastocytes (Wardlaw et al., 1988), l'hypersécrétion de mucus et l'activation des lymphocytes T (Lukacs, 2001), le développement de diverses altérations des parois des voies aériennes et des muscles lisses des vaisseaux sanguins dans les tissus pulmonaires (Raza-Asim et al., 2010). Comme l'inflammation est fréquemment associée à une génération accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et que l'environnement biochimique dans les voies respiratoires asthmatiques est favorable aux réactions induites par les radicaux libres, il a été démontré qu'une inflammation provoquait un stress oxydatif accru dans les voies respiratoires chez les sujets asthmatiques (Dworski, 2000).

Ainsi, l'effet des xénobiotiques contenus dans l'extrait de tabac sans fumée pourrait être atténué par une éventuelle phytothérapie grâce aux propriétés biologiques notamment anti-radicales des métabolites secondaires d'origine végétale. C'est ce que nous avons envisagé en utilisant l'huile d'une plante appartenant à notre patrimoine national et aux vertus extraordinaires ! Il s'agit de *Nigella sativa*, communément appelée graine noire et largement étudiée pour ses effets pharmacologiques et thérapeutiques (activités antibactériennes, antifongiques, antidiabétiques, antioxydantes, anti-inflammatoires et analgésiques, anticancéreuses et immunomodulatrices) (Aftab et al., 2013). En effet, maints travaux relatent son contenu en composés actifs qui ont été isolés et identifiés grâce à des études phytochimiques telles que l'acide phénolique, l'épicatéchine, la quercétine, les flavones (Krishnan et Muthukrishnan, 2012) et la thymoquinone (TQ) (Keyhanmanesh et al., 2010 ; El Gazzar et al., 2006).

En bref, la présente étude vise à étudier, d'une part, les effets du tabac sans fumée sur l'aggravation de l'inflammation, le stress oxydatif et la cytotoxicité ; d'autre part, à évaluer l'efficacité, l'effet anti-inflammatoire et antioxydant de l'huile de *Nigella sativa* sur l'inflammation des voies respiratoires dans un modèle d'asthme allergique chez les rats wistar. Ainsi, nous nous proposons dans une première partie théorique de cette présente étude de développer les points suivants :

- L'asthme allergique : une définition, quelques données épidémiologiques et les facteurs impliqués dans l'expression et le développement de la maladie.
- Le stress oxydatif et l'asthme allergique : les espèces réactifs d'oxygène et le nitrogène, les antioxydants enzymatiques et moléculaires et l'implication du stress oxydant dans l'asthme.
- Le tabac sans fumée : la plante, les différentes formes, la production et la distribution en Algérie, la consommation, les effets sur la santé et législation/religion et le tabac.
- La graine de nigelle (*Nigella sativa*) : l'étymologie, l'historique, la systématique, l'aspect botanique de la plante, la composition chimique et les propriétés pharmacologiques.

Dans la partie expérimentale, nous nous proposons d'évaluer :

- Les effets cytotoxiques de l'ovalbumine et son implication dans l'induction d'un stress oxydant chez des rats Wistar sensibilisés au cours d'un protocole d'asthme expérimental par l'injection intra-péritonéale de l'allergène (l'ovalbumine) puis son inhalation.
- La cytotoxicité du tabac sans fumée sur les poumons, le foie et les reins.
- Les effets de la co-exposition au tabac sans fumée et à l'ovalbumine d'abord sur l'aggravation de l'inflammation allergique, le stress oxydant et l'exacerbation de l'asthme.

- Les effets du traitement par *Nigella sativa* sur l'inflammation bronchique, le stress oxydatif et la cytotoxicité causés par l'ovalbumine et/ou le tabac sans fumée dans ce modèle murin d'asthme expérimental.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I. L'ASTHME ALLERGIQUE

L'asthme est une pathologie symptomatique complexe caractérisée par la présence d'une inflammation chronique des voies respiratoires inférieures (Ober et Yao, 2011). Les mécanismes physiopathologiques majeurs qui caractérisent cette pathologie sont : une hyperréactivité bronchique (HRB), une obstruction réversible des voies respiratoires et une inflammation dominée par les éosinophiles et les mastocytes (Thomsen, 2014).

1. PREVALENCE DE LA MALADIE :

L'asthme est une des maladies chroniques les plus courantes, aussi bien chez les enfants que les adultes, dans le monde. Il représente une cause de mortalité et de morbidité qui ne cesse d'augmenter en raison du mode de vie urbanisé. Ce taux est prévu d'augmenter de 45 à 59% en 2025, entraînant un supplément de personnes asthmatiques estimé à 100 millions (GINA, 2003).

La prévalence de l'asthme varie considérablement d'un pays à un autre. Le GINA et l'OMS estiment qu'environ 300 millions de personnes dans le monde sont asthmatiques (Abdel-Aziz et al., 2014). Par ailleurs, depuis 2005, environ 35 millions de personnes à travers le monde sont mortes à cause des maladies respiratoires chroniques (y compris l'asthme) (Ozcan et Cubukcu, 2015).

Plusieurs enquêtes sur l'asthme ont été effectuées, parmi lesquelles l'enquête AIRMAG (*Asthma Insights and Reality in the Maghreb*) effectuée en 2008 dans les trois pays du Maghreb : l'Algérie, la Tunisie et le Maroc (**Figure 1**). Cette étude a révélé que dans ces pays, la prévalence de l'asthme (3.4 à 3.9 %) est plus élevée dans les régions côtières urbaines que dans les montagnes et les déserts (Bourdin et al, 2009).

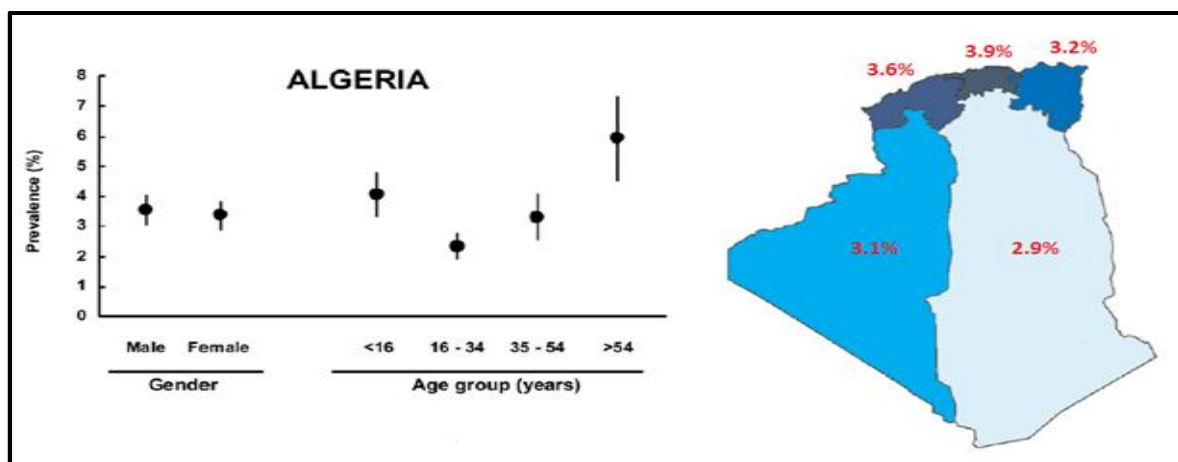


Figure 1 : La prévalence de l'asthme, selon l'âge et le sexe, en Algérie (Nafti et al., 2009).

L'enquête AIRMAG révèle aussi le nombre d'un million et demi de personnes atteintes d'asthme en Algérie, et le nombre de 1000 décès par an.

Par ailleurs, dans une autre enquête (TAHINA), on trouve que l'asthme en Algérie est classé en troisième position parmi les pathologies chroniques les plus courantes, après l'hypertension artérielle et le diabète, avec une prévalence de 9% et un taux de morbidité de 3.75% (TAHINA- Enquête Nationale de santé, 2007).

2. FACTEURS INFLUENÇANT L'EXPRESSION ET LE DEVELOPPEMENT DE L'ASTHME :

Les facteurs qui influencent le risque d'asthme peuvent être divisés en ceux attribués à l'hôte et qui causent le développement de l'asthme (essentiellement d'ordre génétique) et ceux liés à l'environnement et qui déclenchent les symptômes de l'asthme. Les mécanismes par lesquels ces deux facteurs influent sur le développement et l'expression de l'asthme sont complexes et interactifs (GINA, 2006).

2.1. Facteurs de l'hôte :

2.1.1. Génétique de l'hôte : Il est connu depuis longtemps que l'asthme est présent d'une génération à l'autre au sein des familles des personnes asthmatiques. Ainsi, chronologiquement, tel qu'il a été cité par Thomsen (2014), les plus célèbres médecins de leur époque ont constaté les faits suivants : en 1650, *Daniel Sennertus* a observé la présence de l'asthme dans les générations successives de sa femme. Par la suite, en 1868, *Henry Salter* a rapporté que 39% des patients d'un échantillon de 217 avaient des antécédents familiaux d'asthme. En 1920, *June Adkinson* a noté que parmi 400 patients asthmatiques de Boston, 48% avaient une prédisposition familiale. Cette prédisposition génétique, appelée atopie, a donc longtemps été considérée comme un facteur important dans le développement de l'asthme (Boumendjel et al., 2012). Environ 75% des patients asthmatiques sont atopiques, et cette atopie se manifeste par l'expression sérologique des Immunoglobulines E (IgE) associée à une atteinte des poumons (Meharzi et al., 2017).

Plusieurs études ont révélé que l'asthme est une maladie polygénique (plusieurs gènes impliqués), qui montre une hétérogénéité génétique (différentes combinaisons de gènes apparaissent dans les familles étudiées) et une pléiotropie (certains gènes sont impliqués dans le développement de plusieurs phénotypes) (Madore et Laprise, 2010). Les estimations de l'héritabilité de cette pathologie varient entre 35% à 95% (Ober et al., 2011). Les principaux gènes associés à l'asthme sont au nombre de 61. Ils ont été classés selon leurs principales

fonctions biologiques (**Figure 2**) : la réponse immunitaire (32 gènes/61; 52%), le remodelage (12 gènes/61; 20%) et les autres voies (17gènes/61; 28%) (Madore et al., 2010).

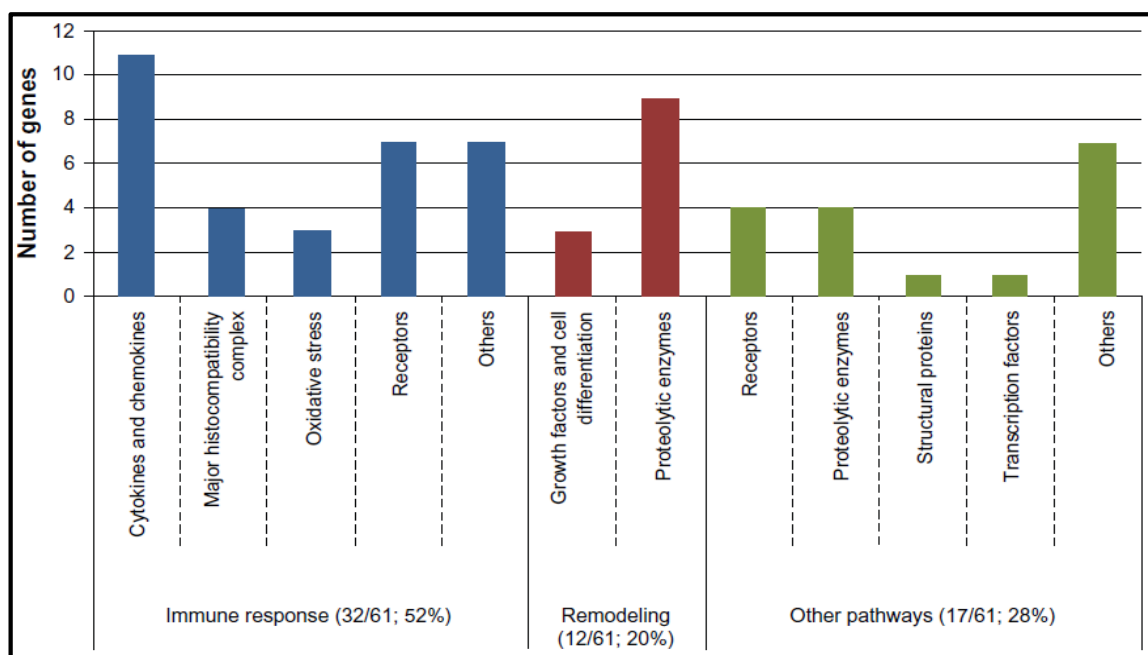


Figure 2 : Classification des 61 principaux gènes associés à l'asthme selon leurs fonctions biologiques (Madore et al., 2010).

2.1.2. Obésité : Plusieurs études ont constaté une augmentation de la prévalence de l'asthme chez les patients obèses (dont l'IMC $>30 \text{ kg/m}^2$) (GINA, 2010). L'accroissement du volume du tissu adipeux conduit à une augmentation de son fonctionnement, par conséquent un état pro-inflammatoire s'installe ce qui amène à l'augmentation de la synthèse de nombreuses cytokines, chimiokines, et des fractions solubles de leurs récepteurs. Ce groupe de médiateurs, appelé "adipokines", est composé de : l'interleukine(IL)-6, l'IL-10, l'éotaxine, le TNF- α , le TGF- β 1, la CRP, la leptine et l'adiponectine (Delgado et al., 2008).

2.1.3. Sexe : Le sexe masculin est un facteur de risque d'asthme chez les enfants. La prévalence de l'asthme avant l'âge de 14 ans est presque deux fois plus grande chez les garçons que chez les filles. Quand les enfants grandissent cette différence se rétrécit jusqu'à l'âge adulte où la prévalence de l'asthme devient plus grande chez les femmes que chez les hommes (GINA, 2006).

2.2. Facteurs environnementaux :

Plusieurs facteurs environnementaux ont été incriminés dans l'augmentation de la prévalence et du développement de l'asthme, parmi ces facteurs on peut citer :

2.2.1. Les allergènes : L'exposition à un allergène est un facteur de risque important pour le développement des sensibilisations atopiques spécifiques à cet allergène, et l'exposition aux allergènes chez les personnes sensibilisées est un facteur de risque pour les exacerbations d'asthme et/ou la persistance des symptômes de l'asthme (GINA 2002). L'augmentation du degré de sensibilisation allergique confère un risque beaucoup plus grand pour l'incidence de l'asthme et des exacerbations sévères (Jackson et al., 2014).

Parmi les aéroallergènes (pneumallergènes) les plus courants on peut citer : les acariens de poussières domestiques (tels que les dermatophagoïdes qui sont le plus souvent associés à l'asthme), les blattes, les pollens, et les allergènes portés par les animaux. Les champignons, les moisissures et les levures semblent être un facteur de risque d'asthme sévère. En effet, une étude qui a été réalisée par notre laboratoire de recherche (LBTE) en collaboration avec le service de parasitologie du CHU Ibn Sina (Annaba) sur une population de 75 enfants de la wilaya d'Annaba a montré la présence dans les maisons des enfants, d'une levure : *Rhodotorula sp*, et de plusieurs genres de moisissures : *Aureobasidium sp* (35%), *Penicillium sp* (21%), *Cladosporium sp* (17%), *Aspergillus sp* (12%), *Mucor sp* (8%), *Scytallidium sp* (3%), *Altenaria sp* (2%), *Paecylomyces sp* (2%), dont la présence est fortement corrélée avec la sévérité d'asthme (Meharzi et al., 2017).

2.2.2. Les infections respiratoires virales : Les données épidémiologiques confirment que les infections virales aiguës sont responsables de la majorité des exacerbations d'asthme chez les adultes et les enfants (Louis et al., 2012). L'un des virus les plus incriminés est le virus respiratoire syncytial détecté chez environ 70% des enfants à l'âge d'un an, et qui provoque des bronchiolites associées d'asthme pendant l'enfance et même jusqu'à l'âge adulte (James et al., 2013).

Le rhinovirus est un autre virus prédominant qui provoque des wheezings (ou respiration sifflante) et des bronchiolites nécessitant une hospitalisation, et qui sont associés à une augmentation d'environ 10 fois plus du risque d'asthme à l'âge de 6 ans (Jackson et al., 2014).

2.2.3. Le tabac : Plus de 4500 composés et contaminants ont été identifiés dans la fumée du tabac, parmi lesquels : des particules respiratoires, des hydrocarbures polycycliques, du monoxyde et dioxyde de carbone, des oxydes d'azote, et de la nicotine (GINA, 2002).

Il est prouvé que l'exposition à la fumée du tabac qui se trouve dans l'environnement (tabagisme passif), plus toxique que celle inhalée par le consommateur lui-même, augmente le risque de maladies des voies respiratoires inférieures *in utero*, et dans l'enfance (GINA, 2002). Quant au tabagisme maternel, pendant la grossesse, il influence la croissance et le développement des poumons chez le fœtus, ce qui augmente le risque d'asthme. En outre,

l'exposition postnatale et pendant l'enfance à la fumée du tabac représente un facteur de risque très important du développement de l'asthme (Jackson et al., 2014).

Le tabagisme actif n'est pas un facteur de risque pour le développement de l'asthme. Par contre, il contribue à la gravité et la sévérité de l'asthme qui se manifeste par une diminution accélérée de la fonction respiratoire chez les sujets asthmatiques, et une mauvaise réponse au traitement en empêchant la réaction anti-inflammatoire des corticoïdes administrés (GINA, 2002 ; Louis et al., 2012).

2.2.4. Les polluants de l'air : La pollution atmosphérique est l'une des causes de la morbidité de l'asthme qui affecte la santé différemment, en fonction de l'âge et des caractéristiques individuelles. Elle est associée à l'incidence de l'asthme et aussi à sa sévérité (D'Amato et al., 2015). Parmi les polluants extérieurs les plus incriminés, on trouve le gaz d'ozone (dont les concentrations troposphériques subissent de fortes augmentations pendant les jours ensoleillés d'été) qui irrite les muqueuses respiratoires (Louis et al., 2012). En outre, il y a aussi les particules fines (de diamètre < 10µm) qui présentent des concentrations élevées en cas d'inversion thermique en hiver (Louis et al., 2012). Un nombre croissant d'études montrent que les enfants vivants dans des zones proches de la circulation ont des risques d'incidence et d'aggravation d'asthme élevés, un taux d'absentéisme scolaire important, et une grande fréquence d'hospitalisations liées à l'asthme (D'Amato et al., 2015). Par contre, la prévalence de l'asthme est réduite chez les enfants élevés dans les zones rurales, ce qui est peut être due à la présence d'endotoxines dans leur environnement déviant ainsi la réponse immunitaire Th2 vers une réponse Th1, il s'agit de la théorie hygiéniste (GINA, 2010). Il existe en parallèle les polluants intérieurs (dans les maisons, les écoles, les bureaux, etc. ...) qui présentent aussi un facteur de risque pour l'asthme car c'est à l'intérieur de ces locaux que les gens passent 80 à 90% de leur temps (D'Amato et al., 2015).

3. REACTION INFLAMMATOIRE DE L'ASTHME :

3.1. Mécanisme de la réaction asthmatique :

La réponse asthmatique est provoquée par l'allergie chez 75 à 80% des cas (Madore et al., 2010). Les mécanismes immunologiques attribués à l'allergie respiratoire sont surtout ceux de la réaction d'hypersensibilité de type I, IgE médiée (Pons, 1992). On distingue deux phases (Montani et Tcherakian, 2009) :

- Une phase de sensibilisation : dans laquelle l'allergène inhalé, s'il n'est pas expulsé par les barrières muco-ciliaires, rentre en contact avec les cellules dendritiques qui vont l'apprêter, puis le présenter aux lymphocytes T naïfs. Ces derniers vont se différencier

en lymphocytes Th2 qui vont produire des cytokines (notamment l'IL-4), qui agissent sur les lymphocytes B et induisent la production des IgE par les plasmocytes (Madore et al., 2010) (figure 3).

- Une phase de réponse à la réintroduction de l'allergène (crise) : elle-même subdivisée en phase immédiate et phase retardée.

La réaction asthmatique immédiate (quelques minutes) est due à une contraction des muscles lisses bronchiques et un œdème de la muqueuse pulmonaire en réponse à des médiateurs (notamment l'histamine) qui proviennent, principalement, de la dégranulation des mastocytes activés par le pontage des IgE qui, elles mêmes, fixent l'allergène. Quant à la réaction retardée, elle apparaît chez certains sujets après la phase immédiate (environ 6 heures après), et elle s'accompagne d'une inflammation bronchique caractérisée par un nombre élevé de lymphocytes et d'éosinophiles (Montani, 2009 ; Dubé et Boulet, 1996).

3.2. Cellules impliquées dans la réaction asthmatique :

3.2.1. Mastocytes : Ils jouent un rôle primordial dans la réaction immunitaire asthmatique immédiate (Holgate, 2008), ainsi que dans le remodelage de la paroi bronchique (Berger et Tunon de Lara, 2007). On les trouve au niveau du tissu de la muqueuse pulmonaire et même à la surface des voies respiratoires (Pham-Van, 2010). Ils infiltrent aussi le muscle lisse bronchique, où leur concentration est plus élevée chez les personnes asthmatiques que chez les sujets sains (Berger et Tunon de Lara, 2007).

Ils expriment plusieurs récepteurs membranaires, parmi lesquels on trouve le récepteur de forte affinité "FcεRI" qui fixe les IgE nécessaires à leur activation (Pons, 1992). Cette fixation aboutit à la dégranulation mastocytaire et donc à la libération de plusieurs types de médiateurs (Histamine, tryptase, etc. ...). On trouve aussi les récepteurs "c-kit" (dont le ligand est le Stem Cell Factor libéré par les cellules épithéliales) et CXCR2/CXCR1 (dont les ligands respectifs sont : CXCL8 et CXCL10, libérés par les cellules musculaires des voies respiratoires). Ces récepteurs étant nécessaires à leur recrutement à la surface des voies respiratoires (Pham-Van, 2010).

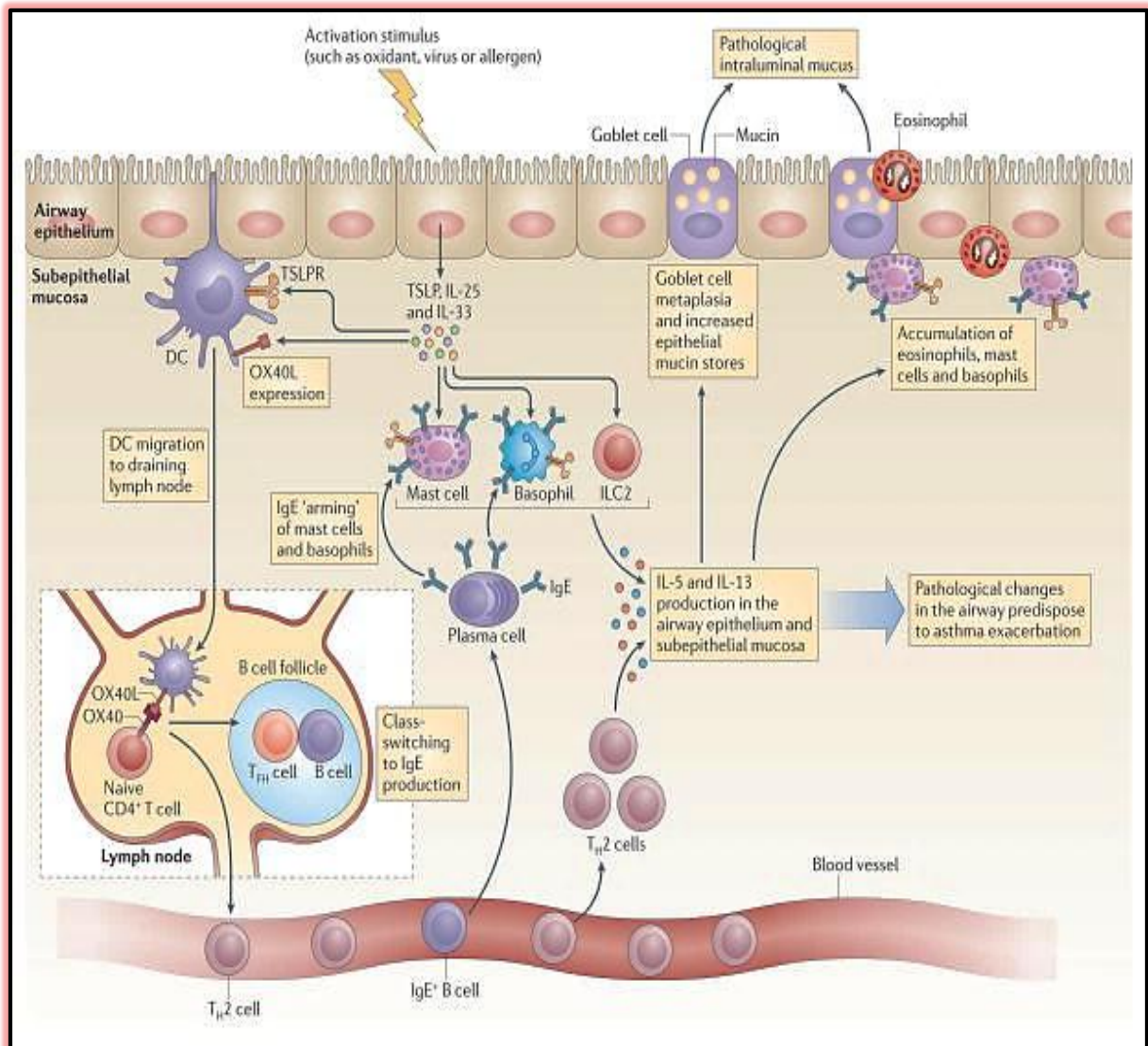


Figure 3 : Les différents acteurs cellulaires et moléculaires de la réaction inflammatoire asthmatique (Fahy, 2015).

3.2.2. Cellules épithéliales respiratoires : L'épithélium bronchique est victime des agressions répétées, d'origine externe par les allergènes et interne par les cellules inflammatoires (Montani, 2009 ; Pham-Van, 2010). Ces cellules épithéliales participent au processus inflammatoire par la libération de médiateurs tels que l'IL-6, l'IL-8, et les médiateurs lipidiques (PGE₂, PGF₂, etc. ...) (Eum, 1996).

3.2.3. Macrophages : Ils libèrent de nombreux médiateurs capables d'induire le recrutement d'une ou de plusieurs cellules inflammatoires, notamment des polynucléaires éosinophiles (PE). Par ailleurs, ils possèdent un récepteur de faible affinité "FcεR-II" qui fixe l'IgE ce qui peut causer son activation par l'allergène (Dubé et Boulet, 1996).

3.2.4. Cellules dendritiques : Elles sont localisées juste sous la membrane basale de l'épithélium bronchique. Les cellules dendritiques immatures capturent l'allergène, migrent vers les ganglions lymphatiques et deviennent semi-matures une fois arrivées, puis l'expression des molécules de co-stimulation (notamment CMH-II) les rend matures c-à-d capables de présenter l'allergène aux cellules TCD4⁺ et induire leur prolifération en Th2 (Hammad et Lambercht, 2006).

3.2.5. Polynucléaires éosinophiles : On les trouve dans la paroi des voies aériennes. Etant les cellules majeures de la phase tardive de la réponse allergique, les PE contribuent beaucoup à la pathogénicité de l'asthme (Montani, 2009).

Il existe une corrélation entre le nombre de PE et l'intensité de l'HRB. En effet, ces cellules sont riches en granules chargées de protéines à pH très alcalin (tel que MBP, ECP, EPO) et elles libèrent des enzymes et des radicaux libres d'oxygène qui provoquent une desquamation de l'épithélium bronchique. Elles libèrent aussi le leucotriène C4 et la PAF. Ces derniers sont des médiateurs lipidiques qui contractent les muscles lisses, provoquent une vasodilatation, augmentent l'adhésion des PE, stimulent la sécrétion du mucus, et participent au recrutement d'autres éosinophiles (Boulet, 1997).

3.2.6. Lymphocytes T : Ils modulent la réponse immunologique asthmatique, activent et libèrent de nombreux médiateurs protéiques engagés dans les interactions cellulaires, le recrutement, et l'activation d'autres cellules inflammatoires notamment les PE (Boulet, 1997). La présentation de l'allergène aux cellules TCD4⁺ (Th0) induit leur prolifération en cellules Th2 qui libèrent des cytokines qui régulent la synthèse des IgE par les cellules B (*IL-4* : stimulateur et *IFN-γ* : inhibiteur) ainsi que des cytokines impliquées dans le recrutement et l'activation des cellules inflammatoires (*GM-CSF* : recrute et active les éosinophiles ; *IL-3* et *IL-4* : activent les mastocytes et les basophiles).

Les lymphocytes TCD8⁺ jouent également un rôle important dans l'orientation de la réaction asthmatique, soit en cohérence avec les LTCD4⁺, soit en exerçant un rôle régulateur (ou suppresseur) vis-à-vis de ceux-ci en synthétisant des cytokines antagonistes. Le caractère cytotoxique leur confère la capacité de lutter contre les infections (virales ou à germes intracellulaires) rencontrées dans l'asthme et ses exacerbations (Ghosh et al., 2007).

3.2.7. Polynucléaires neutrophiles et basophiles : La présence des neutrophiles chez les sujets asthmatiques et dans leurs expectorations est un signe d'asthme chronique et sévère qui peut être dû à la destruction tissulaire accrue et au remodelage des voies respiratoires (Pham-Van, 2010).

Quant aux basophiles, la présence des récepteurs de forte affinité des IgE "FcεRI" sur leur surface et l'expression des cytokines Th2, de l'histamine et des granules leur confère la capacité de jouer un rôle certain dans la réponse asthmatique immédiate (Madore et al., 2010)

3.2.8. Lymphocytes B : Leur rôle consiste en le déclenchement de la réaction allergique par la production des IgE favorisée par l'IL-4 (libérée par les Th2) qui, chez l'homme, induit la commutation vers l'IgE, et vers un isotype d'IgG (IgG4) dont l'interaction avec les récepteurs Fcγ est peu efficace et l'activation du complément est faible (Pham-Van, 2010).

3.3. MEDiateurs DE LA REACTION ASTHMATIQUE :

De multiples médiateurs, sécrétés par différentes populations cellulaires, sont impliqués dans la réaction inflammatoire asthmatique. Ce qui rend très difficile l'établissement du rôle de chacun d'eux dans la physiopathologie de l'asthme (Pham-Van, 2010). Parmi ces médiateurs on trouve :

3.3.1. Les immunoglobulines E : Elles jouent un rôle central dans la régulation de la réaction allergique immédiate par l'action directe sur son récepteur FcεRI situé sur les cellules inflammatoires (les mastocytes essentiellement). Leur synthèse est provoquée par l'action de l'IL-4 libérée par les cellules Th2. Plusieurs études (effectuées sur des cohortes atopiques), sur la modulation de la sensibilisation IgE-dépendante vis-à-vis des pneumallergènes, ont confirmé l'existence d'une corrélation positive entre la sévérité de l'asthme et la concentration sérique des IgE totales (Girodet et Tunon de Lara, 2007 ; Boumendjel et al., 2012).

Des anticorps anti-IgE sont utilisés pour le traitement de l'asthme, il s'agit d'anticorps monoclonaux humanisés, avec 95% de séquences humaines et 5% de séquences murines, qui se lient aux IgE circulantes et membranaires (ils ne reconnaissent pas les IgE fixées aux FcεRI) pour inhiber leur fixation sur leur récepteur spécifique et par conséquent l'annulation de l'activation des cellules inflammatoires qui en déroule (Girodet et al., 2005).

3.3.2. L'histamine : Elle est sécrétée, essentiellement, par les mastocytes et les basophiles. Un mastocyte contient environ 3 à 5g d'histamine ce qui conduit, suite à une stimulation antigénique, à la libération d'une quantité très importante de ce médiateur. Elle contribue au déroulement de la réaction asthmatique par son action directe sur son récepteur H1 situé un peu partout dans l'organisme (notamment au niveau bronchique et vasculaire) pour permettre la diffusion tissulaire des protéines plasmatiques (dont le fragment C3 du complément), et aussi l'extravasation vasculaire qui conduit à la formation d'un œdème muqueux. Ce dernier participe à l'obstruction bronchique (Pons, 1992 ; Pham-Van, 2010).

3.3.3. Les cytokines : Ce sont le chef d'orchestre de la réaction inflammatoire asthmatique, qui déterminent la sévérité de cette réaction. Les cytokines clés comprennent l'IL-1β et le

TNF- α qui amplifient la réponse inflammatoire, et le GM-CSF qui prolonge la survie des éosinophiles. Les cytokines qui dérivent des Th2 incluent l'IL-5 nécessaire à la survie et à la différenciation des éosinophiles, l'IL-4 nécessaire à la différenciation des Th2, et l'IL-13 nécessaire à la production des IgE (GINA, 2010).

On trouve aussi l'IL-33 (membre de la famille de l'IL-1), détecté dans plusieurs types cellulaires, qui agit en synergie avec le facteur de croissance des cellules souches et le récepteur Fc ϵ RI des IgE pour activer les mastocytes et les basophiles, et pour la dégranulation et l'augmentation de la survie des éosinophiles (Hye et al., 2010).

3.3.4. Les chimiokines : Ils jouent un rôle important dans le recrutement des cellules inflammatoires dans les voies respiratoires et sont principalement exprimés par les cellules épithéliales des voies aériennes. Parmi ces chimiokines, l'exotoxine est relativement sélective pour les éosinophiles, et les TARC et MDC qui recrutent les cellules Th2 (Pham-Van, 2010).

3.3.5. Le monoxyde d'azote (NO) : Il s'agit d'un vasodilatateur puissant qui est produit essentiellement par l'action de la NO synthase inducible dans les cellules épithéliales des voies respiratoires (GINA, 2010).

3.3.6. Les leucotriènes : Leur synthèse, par de nombreux types cellulaires, est dépendante de l'enzyme 5-lipoxygénase. Parmi les leucotriènes on trouve le LTB₄ qui est un agent chimio-attractant puissant pour les neutrophiles. Les leucotriènes LTC₄, LTD₄, et LTE₄ (qui ont tous un effet broncho-constricteur puissant et induisent l'HRB) augmentent la perméabilité vasculaire et stimulent la sécrétion du mucus (Pham-Van, 2010).

CHAPITRE II. LE STRESS OXYDANT ET L'ASTHME ALLERGIQUE

1. DEFINITION

L'oxygène, molécule indispensable à la vie, est susceptible d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme via la formation de radicaux libres et des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ces notions ne sont toutefois pas nouvelles puisque, vers le milieu des années 50, Gerschman et Hartman avaient déjà évoqué la toxicité de l'oxygène et la « free radical theory » pour expliquer le processus de vieillissement (Bourgoin, 2012).

Le stress oxydatif correspond à une altération de l'homéostasie redox cellulaire, induite soit par une production excessive de radicaux libres, soit par une diminution des capacités de défense antioxydantes (Bourgoin, 2012).

Donc, dans la cellule il existe un équilibre entre la production des ERO et leur élimination. Le stress oxydatif s'installe lorsqu'il y a un déséquilibre en faveur de la production d'ERO conduisant à l'oxydation accrue des composants cellulaires essentiels (Servais, 2004).

Le poumon possède un système antioxydant bien développé. Beaucoup de constatations expérimentales et cliniques suggèrent que les oxydants jouent un rôle dans la pathogénie de plusieurs désordres respiratoires, telle que l'asthme. En particulier, Il est de plus en plus évident que l'inflammation chronique des voies aériennes, typique de l'asthme résulte d'une augmentation du stress oxydatif dans ces voies, ce que démontrent les taux élevés des produits de stress chez les asthmatiques (Zhao et al., 2008).

2. LES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE (ERO) ET LES ESPECES REACTIVES DU NITROGENE (ERN)

Les ERO sont de très petites molécules à base d'oxygène avec un pouvoir oxydant très puissant. Parmi les plus connus, on note l'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($\cdot OH$) (**Tableau 01**). Ces derniers sont extrêmement instables et tendent à réagir avec toutes molécules organiques qui se présentent. Les sources d'ERO sont multiples, tout comme leurs effets cellulaires et signalétiques, leur rôle est très complexe car elles peuvent avoir un rôle physiologique ou un effet toxique en fonction de leur concentration. Dans des conditions normales, elles sont générées en faible quantité et jouent un rôle de messagers secondaires capables, notamment, de réguler le phénomène de l'apoptose ou d'activer des facteurs de transcription (Haleng et al., 2007 ; Morissette, 2010).

En biologie, les radicaux libres sont formés le plus souvent par gain d'électron à partir de l' O_2 . Les ERO regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de l'oxygène mais également les composés non radicalaires (hydroperoxydes ROOH et H_2O_2). L'eau oxygénée (H_2O_2),

produit de la dismutation de l' $O_2^{\cdot-}$, est beaucoup plus stable que ce dernier et a la capacité de diffuser à travers les membranes biologiques (contrairement à l' $O_2^{\cdot-}$) (Servais, 2004).

Tableau 1 : Les principaux ERO et ERN : leurs formations et leurs propriétés
(Institut numérique, 2013).

Espèces réactives	Réaction de formation	Propriétés
L'Anion Superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)	Formé par la réduction mono électrique de l'oxygène: addition d'un seul électron $O_2 + 1 e^- \longrightarrow O_2^{\cdot-}$	C'est le radical le moins réactif mais le précurseur des autres ERO
Le Peroxyde d'Hydrogène (H_2O_2)	Produit à partir de l'anion superoxyde, réaction catalysé par la <i>superoxyde dismutase</i> . $O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} \xrightarrow{SOD, 2 H^+} H_2O_2 + O_2$	La majeure partie de la toxicité de l'eau oxygénée provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle ($OH^\bullet$)
Le Radical Hydroxyle ($OH^\bullet$)	formé par la réaction de <i>Fenton</i> à partir d' H_2O_2 en présence de métaux de transition: L'ion ferreux réagit avec le peroxyde d'hydrogène $H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow OH^\bullet + Fe^{3+} + OH^-$	Le radical hydroxyle ($OH^\bullet$) est le radical le plus avide d'électron et le plus dangereux pour l'organisme
Le Monoxyde d'Azote (NO)	Le NO est formé à partir de l'un des deux atomes d'azote terminal du groupement guanidine de la L-arginine, d'une part, et de l'oxygène moléculaire (O_2) d'autre part en présence de cofacteur: NADH, H^+ , réaction catalysé par les NO synthase (NOS)	Le NO est un radical libre qui est surtout réputé pour ses propriétés physiologiques (agit sur le tonus vasculaire)
Le Peroxynitrite ($ONOO^-$)	En l'absence d'une quantité suffisante de cofacteurs ou de substrat (arginine), les NOS produisent de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) plutôt que du $NO^\bullet$. L' $O_2^{\cdot-}$ produit lie le $NO^\bullet$ pour former du <i>Peroxynitrite</i>	Très réactif et sans doute responsable d'un stress oxydant, Il engendre des oxydations irréversibles et des nitrations diverses (surtouts des résidus tyrosines)

Parmi les ERN, le monoxyde d'azote NO joue un rôle important dans l'organisme humain et est impliqué dans une grande variété de mécanismes de régulation. En outre, il est également un agent cytotoxique présent dans les polluants environnementaux et la fumée de cigarette. Formé à partir de l'acide aminé semi essentiel L-arginine par l'action d'acide nitrique oxyde synthase (NOS), le NO pourrait être à l'origine de la formation d'autres radicaux tel que le nitrite NO_2^- et la peroxynitrite $ONOO^-$ (Suzy et al, 2002).

2.1. Sources des espèces réactives de l'oxygène :

Les sources des facteurs oxydants sont soit endogènes ou exogènes :

2.1.1. La mitochondrie : Organite utilisant de l'oxygène pour produire de l'ATP, la mitochondrie est l'une des plus grandes sources endogènes de production de radicaux libres. Au cours de la respiration cellulaire, 95 à 99 % de l'oxygène consommé est réduit en eau. Toutefois, 1 à 5 % de l'oxygène est transformé en anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) dans les complexes I et III de la chaîne de transport des électrons (Rioux, 2009). Dans ce procédé, l'oxygène est utilisé de façon contrôlée par la chaîne respiratoire mitochondriale comme accepteur final d'électron pour produire de l'eau. Cependant, cette chaîne de transport d'électrons n'est pas complètement étanche et laisse malgré elle fuir des électrons. Ces électrons vont réagir avec une molécule de dioxygène pour générer l'anion superoxyde alors que les électrons ratés de la respiration mitochondriale affectent uniquement la cellule elle-même (Morissette, 2010).

2.1.2. La NADPH oxydase : C'est une oxydase liée à la membrane plasmique. Elle a été initialement décrite dans les cellules phagocytaires où elle permet la production de l'anion de superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). Cette production par les neutrophiles et les autres phagocytes constitue une étape importante de notre réponse immunitaire innée où ($O_2^{\cdot-}$) constitue un précurseur des ERO qui agissent en tant qu'agents microbicides. La production non contrôlée d'ERO a été impliquée dans la destruction de tissu et un certain nombre d'états pathologiques. La NADPH oxydase phagocytaire représente une source majeure de production d'ERO dans le poumon dans le cadre de la réponse immunitaire (Banerjee et al., 2011 ; Servais, 2004).

2.1.3. Peroxysome : Le peroxysome, organite contenant de nombreuses enzymes générant du H_2O_2 , en est une source importante de production cellulaire. Toutefois, ce dernier est utilisé comme substrat par la catalase peroxysomale afin de réaliser des réactions de peroxydation qui constituent un important processus de détoxification présents dans le foie et le rein (Servais, 2004).

2.1.4. Xanthine oxydase : Il s'agit d'une enzyme soluble, principalement cytoplasmique, qui génère des ERO en réduisant l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique (Servais, 2004).

2.1.5. Autres sources (exogènes) : Parmi les nombreux facteurs exogènes associés à une production accrue et/ou à une diminution de l'élimination de radicaux libres (Rioux, 2009), on retrouve :

- L'alimentation (antibiotiques, alcool, café, aliments riches en protéines et/ou en lipides et/ou à indice glycémique élevé, faible consommation d'antioxydants).
- Le CO_2 atmosphérique.

- Les polluants (fumée de cigarette, pollution atmosphérique (SO₂, NO₂, O₃, hydrocarbures), métaux occupationnels (métaux de transition tels le mercure, le fer, le cadmium et le nickel, l'arsenic, l'amiante) et les métaux lourds).
- Les médicaments (traitements contre le cancer, psoralène).
- Les radiations (ionisantes, ultraviolets, micro-ondes).
- L'absorption dermique (insecticides, médicaments).

3. LES ANTI OXYDANTS :

Pour se protéger des effets délétères des ERO, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes (**figure 4**). On distingue deux sources d'antioxydants : l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque ; l'autre est endogène et se compose d'enzymes (exemple : la catalase), de protéines (exemple : la ferritine) et quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydantes (Haleng et al., 2007).

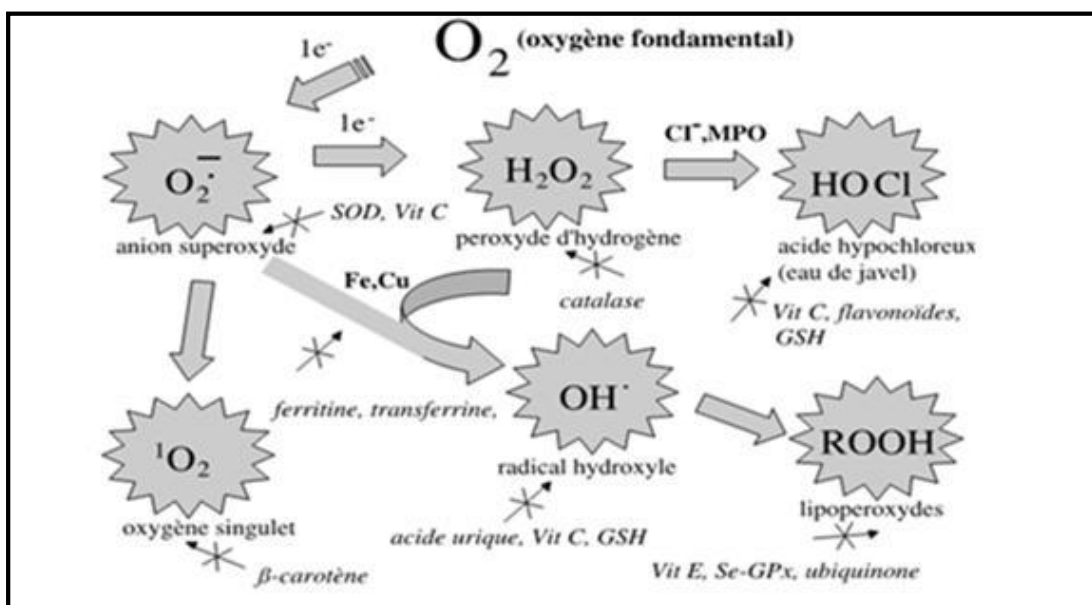


Figure 4 : Aperçu des différents ERO et des antioxydants régulateurs de leur production (Haleng, 2007).

3.1. Les antioxydants enzymatiques :

Pour contrecarrer les effets toxiques d'un déséquilibre d'oxydoréduction intracellulaire, la cellule mammifère est dotée d'un système de réponse ultra-performant comprenant : la voie de signalisation Keap1-Nrf2 (Keap1 : *Kelch-like ECH-associated protein 1* ; Nrf2 : *nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*). Cette voie de signalisation induisant la synthèse

d'enzymes capables soit de dégrader, soit de modifier les agents oxydants pour leur faire perdre leur pouvoir délétère (Page, 2012).

Parmi ces enzymes antioxydantes :

3.1.1. Les superoxydes dismutases (SOD) : Elles catalysent la dismutation de l' $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 selon la réaction suivante : $2 O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$

Les SOD appartiennent au groupe des oxydoréductases (EC1.15.1.1). Elles sont présentes dans toutes les cellules de mammifères et elles existent sous 3 formes différant par leur métal cofacteur : SOD Cu/Zn cytosolique (SOD1), SOD Mn strictement mitochondriale (SOD2), SOD à zinc (SOD3) localisée dans le milieu extracellulaire (Minig, 2009).

3.1.2. La catalase (CAT) : Dans les cellules eucaryotes, la catalase (EC1.11.1.6) est localisée principalement dans les peroxysomes, dans lesquels résident de nombreuses oxydases productrices d' H_2O_2 . Pour des fortes concentrations en H_2O_2 , elle catalyse sa transformation en eau et en dioxygène (Minig, 2009), selon la réaction suivante : $2 H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2 H_2O$

3.1.3. La Glutathion peroxydase (GPx) : Il s'agit d'une sélénoprotéine enzymatique qui catalyse la réduction d'une variété d'hydroxydes ($ROOH$ et H_2O_2) qui sont alors transformés en molécules assimilables (eau ou alcool) en utilisant le glutathion réduit (GSH). Une enzyme inverse, la glutathion réductase, permet ensuite de régénérer le glutathion réduit à partir du disulfide de glutathion ou GSH oxydé (GS-SG) (Dandrea, 2003).



3.1.4. Les peroxyredoxines (PRX) ou thioredoxines peroxydases : L'antioxydant majeur responsable du maintien des protéines à l'état réduit est la thiorédoxine qui sera régénérée par le NADPH sous l'action de la thiorédoxine réductase (TrxR) qui elle même possède un groupement sélénocystéine dans son site actif. Elle intervient dans la dégradation des peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène (Bouguerne, 2012).

3.2. Les antioxydants non-enzymatiques :

En plus des systèmes de défense enzymatiques, le corps humain emploie également les antioxydants non enzymatiques pour limiter l'accumulation excessive d'ERO. Ceux-ci incluent, mais ne sont pas limités à :

3.2.1. Le glutathion réduit (GSH) : Il s'agit d'un tripeptide (glutamique-cystéine-glycine) qui possède un groupement thiol $-SH-$, et considéré comme l'un des constituants majeurs du système antioxydant endogène. Il intervient dans la défense contre l'oxydation *via* leur rôle comme cofacteur de certaines enzymes antioxydantes telles que les glutathion peroxydases et les glutathion transférases (Lemaoui, 2011).

3.2.2. Les vitamines C et E : La vitamine C ou acide ascorbique est un excellent piègeur des ERO qui peut protéger divers substrats biologiques (protéines, acides gras, ADN) de l'oxydation. Lors de son oxydation en acide déhydroascorbique, elle passe par une forme radicalaire intermédiaire (radical ascorbyl) qui joue un rôle essentiel dans la régénération de la vitamine E oxydée. Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au sein des acides gras de la membrane cellulaire et des lipoprotéines où elle joue un rôle protecteur en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par un stress oxydant (Passeport Santé, 2016).

3.2.3. Les flavonoïdes : Les flavonoïdes sont des produits largement distribués dans le règne végétal. Ils sont capables de moduler l'activité de certaines enzymes et de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires, qui pourraient avoir des propriétés antioxydantes. En effet les flavonoïdes inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle fortement réactif et ils sont également capables de chélater les ions métalliques oxydants (Institut numérique, 2013).

4. IMPLICATION DU STRESS OXYDATIF DANS L'ASTHME :

Le stress oxydant est censé avoir un rôle dans le développement des maladies humaines telles que le cancer, les désordres cardiovasculaires et les maladies respiratoires. L'asthme est une maladie résultante de l'inflammation chronique des voies aériennes, et le stress oxydant peut être impliqué dans sa pathogénie (Comhair et al, 2009).

Comme il a été décrit dans le chapitre précédent, la pathogenèse de l'asthme implique des interactions complexes entre plusieurs types cellulaires et médiateurs, parmi ces derniers, les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote endogènes et exogènes (**figure 5**) (Comhair et al, 2009). L'augmentation du stress oxydatif peut contribuer à la progression ou la persistance de l'inflammation des voies aériennes en provoquant une hyperréactivité accrue de ces voies, une stimulation de la sécrétion de mucine, une induction de divers médiateurs chimiques proinflammatoires et la stimulation de bronchospasme (Massoud et Rezaei, 2013).

Les ERO réduisent aussi la fonction bêta-adrénergique dans le poumon rendant donc les muscles lisses des voies respiratoires plus sensibles à l'acétylcholine (Rahman et MacNee, 2012) et provoquent aussi l'hyperréactivité bronchique en stimulant la libération d'histamine par les mastocytes et la sécrétion de mucus des voies aériennes de l'épithélium (Kirkham et al, 2006). Le plus haut niveau de stress oxydatif provoque de graves effets cytotoxiques, y compris l'apoptose et la nécrose (Cho et Moon, 2010).

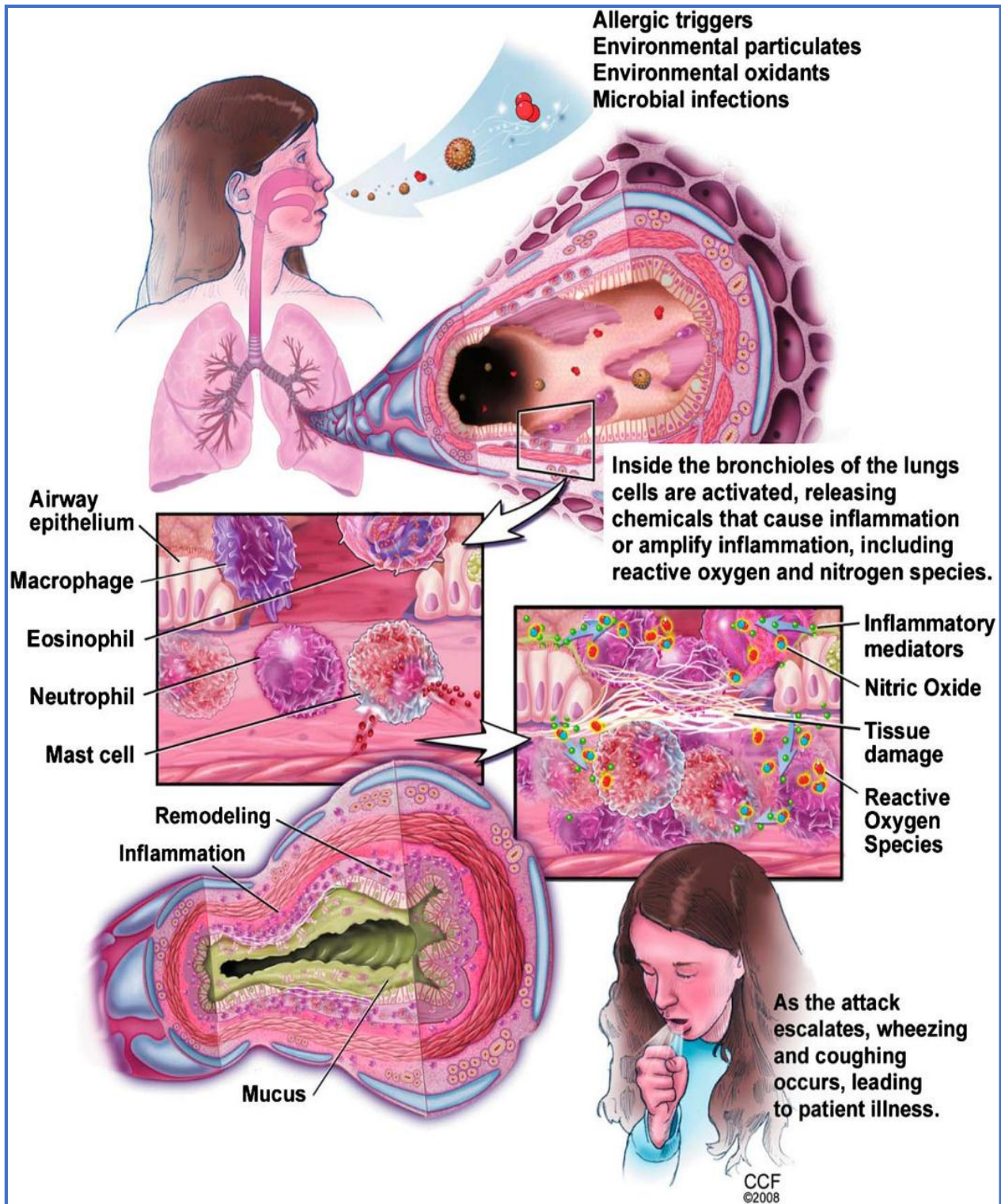


Figure 5 : Physiopathologie de l'asthme (Comhair et al, 2010).

Les changements au niveau du réservoir intracellulaires/extracellulaires de glutathion modifient l'équilibre d'oxydoréduction intracellulaire. Le flux de GSH active d'une manière reproductible la libération de BAX du cytochrome C dans des lignées cellulaires (cellules HeLa et U937, lignée cellulaire de monocytes) et cela constitue un des mécanismes conduisant à l'induction de l'apoptose (**figure 6**). Par conséquent, des modifications dans le rapport GSSG/GSH et leur distribution intracellulaire et extracellulaire contribuent également à l'apoptose des cellules de l'épithélium des voies aériennes dans l'asthme (Comhair et Erzurum, 2009).

Les cellules inflammatoires et immunitaires dans les voies respiratoires, tels que les macrophages, les neutrophiles et les éosinophiles, libèrent une quantité accrue d'ERO chez des patients asthmatiques (**figure 7**) (Kirkham et al, 2006). Lorsqu'elles sont activées, ces cellules peuvent produire du superoxide (O_2^-) par l'intermédiaire de complexe membranaire NADPH-dépendant et la dismutation ultérieure de l' O_2^- donne l'hydrogène peroxyde (H_2O_2). Le O_2^- et le H_2O_2 sont essentiels pour la formation des radicaux cytotoxiques puissants comme le radical d'hydroxyle ($\cdot OH$) ainsi que les ERN (Dworski, 2000 ; Barnes, 2008).

L'asthme est caractérisé par la perte de l'activité antioxydante touchant à la fois les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques. Des études ont montré que les niveaux de GPx et de SOD ainsi que les composants non enzymatiques du système antioxydant incluant le glutathion réduit, l'acide ascorbique, l' α -tocophérol, le lycopène, et le β -carotène ont été significativement plus faibles chez les enfants souffrant d'asthme par rapport aux sujets contrôles sains (Meharzi et al., 2017 ; Sahiner et al., 2011).

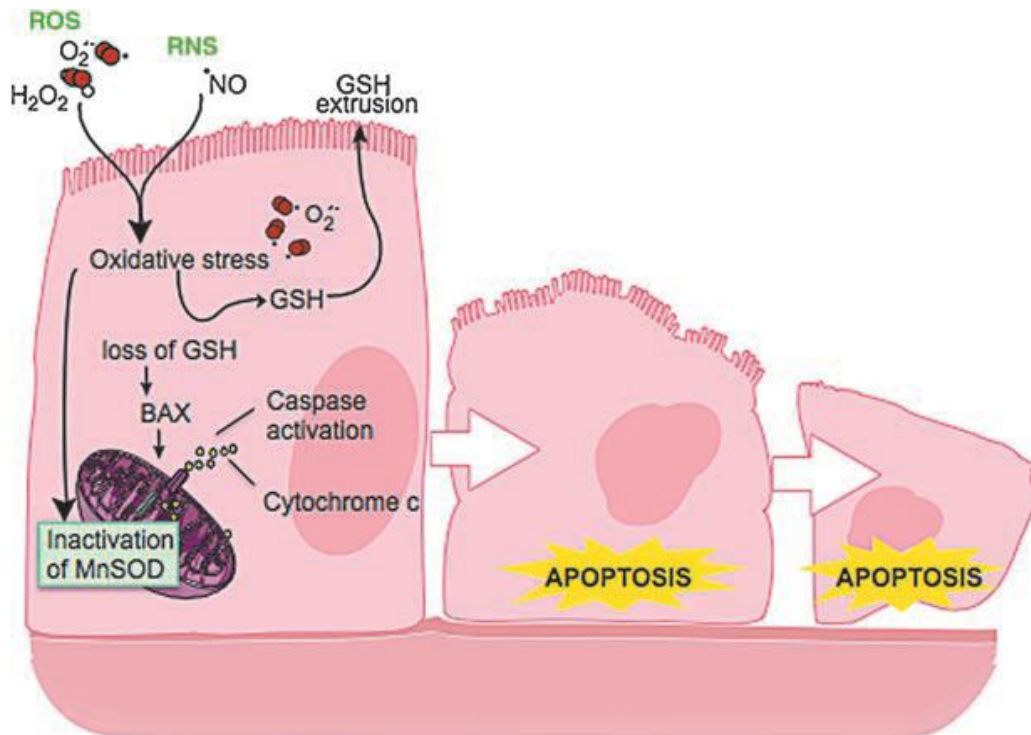


Figure 6 : Les anomalies Redox déclenchent l'apoptose dans les cellules épithéliales des voies respiratoires (Comhair et Erzurum, 2009).

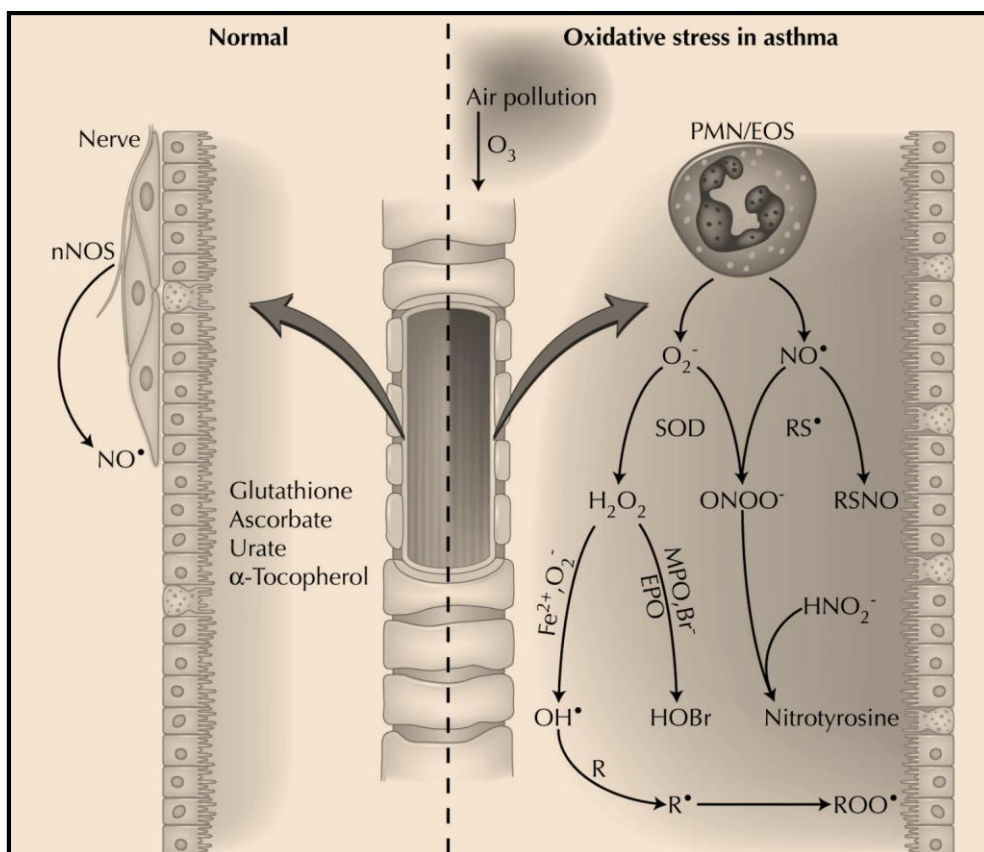


Figure 7 : Le stress oxydatif et nitrosant dans l'asthme (Russell et Bowler, 2004).

Les ERO sont impliqués dans la réponse au stress oxydatif où, on constate qu'à des niveaux inférieurs de stress oxydatif, les systèmes de défense antioxydants commencent à fonctionner grâce à l'activation de Nrf2 (un facteur de transcription important qui induit la synthèse de 200 molécules antioxydantes intracellulaires). Alors qu'à des niveaux élevés de stress oxydatif, des réponses cellulaires inflammatoires seraient provoquées via l'activation de AP-1 et NF- κ B. Cela se traduit par la sécrétion de divers types de cytokines proinflammatoires et des chimiokines (Cho et Moon, 2010).

Les dommages oxydatifs ont des effets innombrables et peuvent influencer négativement les voies métaboliques y compris l'amplification du processus inflammatoire (Babusikova et al, 2012). Les protéines oxydées peuvent perdre leurs fonctions biologiques à la suite d'importantes et complexes modifications chimiques protéiques et peuvent devenir aussi plus sensibles à la protéolyse intracellulaire. Parmi ces protéines on trouve : les protéines carbonylées, le nitrotyrosine et le 3-chlorotyrosine (Babusikova et al, 2012). Le nitrotyrosine est un produit stable obtenu par l'action de ONOO^- qui ajoute un groupe nitro au groupe hydroxyle de la tyrosine. Cette nitration de la tyrosine des protéines peut affecter l'activité enzymatique, en réduisant par exemple l'activité histone désacétylases (HDAC) (Kirkham et al, 2006).

La peroxydation lipidique est un exemple des dommages oxydatifs des membranes biologiques et les autres composants lipidiques structuraux. Les membranes biologiques endommagées présentent des changements des propriétés biophysiques, une mobilité limitée des protéines et des lipides dans ces membranes et une diminution de leur fluidité. La peroxydation des lipides membranaires aboutit à la production d'isoprostanes, d'éthane, et de substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) permettant de mesurer la concentration de malondialdéhyde (Babusikova et al, 2012).

Les isoprostanes sont des métabolites stables de l'acide arachidonique qui contribuent à la contraction des muscles lisses en agissant sur la tyrosine kinase, Rho et Rho kinase, et conduisent ainsi à une diminution de l'activité phosphatase de la chaîne légère myosine, ce qui augmente le niveau de phosphorylation de ces chaînes ainsi que la contraction (Prado et al, 2011).

Par opposition des ERO cités plus haut, ceux dérivant de l'environnement concerne à la fois les gaz et les particules de la pollution atmosphérique, cela va de la fumée de cigarette et les gaz oxydants, tels que l'ozone, le dioxyde d'azote, aux particules aéroportées.

CHAPITRE III. TABAC SANS FUMEE

1. LA PLANTE DE TABAC

Le tabac est un produit manufacturé, élaboré à partir de feuilles séchées de plantes de tabac commun. Il en existe de nombreuses variétés dont *Nicotiana tabacum*, une espèce originaire d'Amérique centrale appartenant au genre botanique des *Nicotiana* de la famille des *Solanaceae*, de même la tomate et la pomme de terre (Figure 8). Le tabac puise ses origines en Amérique du Sud, où les Aztèques et les Incas le fumaient il y a plus de 3000 ans, comme en témoigne la découverte de pipes (Martinet et Bohadana, 2004).



Figure 8 : *Nicotiana tabacum* (Martinet et Bohadana, 2004).

En effet, c'est Christophe Colomb qui le découvre lors de son arrivée à Cuba et l'importe en Europe. A cette époque, beaucoup lui ont attribué des vertus thérapeutiques. A la fin du XIXe siècle, apparaissent, en Europe, des machines permettant la fabrication industrielle de cigarette.

2. LES FORMES DE TABAC SANS FUMEE

Le tabac sans fumée (TSF) se présente sous de nombreuses formes et peut être consommé selon diverses méthodes, sous des noms et attributs variés. Deux formes majeures peuvent être distinguées :

2.1. Tabac à chiquer : Il est broyé comme de l'herbe finement coupée et destiné à être mâché à volonté tout au long de la journée. En Asie du Sud-Est, le tabac est fréquemment ajouté à divers mélanges d'épices et d'herbes (telles que ceux provenant d'une espèce de palmier du genre Areca : les noix d'arec, les feuilles de bétel (Institut National du Cancer, 2009).

2.2. Tabac à priser : Il est réduit en particules, semblables à une mouture de café, humidifié et utilisé en coinçant le tabac entre la gencive et la joue. Le tabac à priser, le plus populaire, renferme du tabac humecté ou parfois sec, haché très finement. Malgré son nom, l'utilisateur renifle rarement ce produit. Il en place plutôt une pincée ou un sachet entre sa lèvre supérieure et sa gencive et laisse le tabac dans sa bouche, sans mastiquer, durant environ 30 minutes, alors que le chiqueur mord dans un morceau de tabac pour ensuite le placer entre la gencive et la joue en mâchant au besoin (il peut garder un seul morceau dans sa bouche durant des heures) (Institut National du Cancer, 2009).

2.3. Le snus : Le « swedish snus » (snus suédois) est une variante du tabac à priser, en général humide, dont certaines confections doivent être maintenues au froid. Ressemblant à des minuscules poches de thé, le snus est un tabac en poudre humide et parfumé que les utilisateurs insèrent entre leur lèvre et leur gencive, sans le mastiquer et sans avoir à cracher, comme c'est le cas avec le traditionnel tabac à chiquer. Ce produit est vendu, depuis le XVIII^e siècle, en Suède et en Norvège, mais il est interdit dans l'union européenne depuis 1992, sauf en suède (INPES, 2004).

En Algérie, le TSF, en particulier le tabac humide, a été consommé traditionnellement par la majorité des hommes dans tous les groupes sociaux. Localement, « chemma ou shammah » est le terme donné au tabac humide, qui est placé directement sur les gencives ou placé dans du papier, puis placé dans la bouche. Le tabac sec s'appelle « neffa » et il est pris par le nez. Chemma, la catégorie de TSF la plus répandue, est disponible via les canaux légaux et illicites (Euromonitor International, 2010).

3. PRODUCTION ET DISTRIBUTION EN ALGERIE :

L'Algérie exploite 8000 hectares de terre destinée à la culture de tabac, en moyenne 0,02% des terres agricoles. Le plus grand fabricant de TSF en Algérie est la Société Nationale des Tabacs et Allumettes (SNTA), une entité publique avec une part de marché de 88% en 2009. La SNTA produit les principales marques « Makla El Hilal » et « Nedjema ». Une société privée, Bentchikou Tabacs Algérie, qui compte pour la part de marché restante, a gagné du terrain depuis son entrée dans le pays en 2006 avec ses marques « Naffa Africaine », « Makla Ifriquia » et « Makla Bouhlel ». La société nationale SNTA avait le monopole de la production avant l'apparition de ce concurrent, mais elle reste le leader de la catégorie parce que les consommateurs se sont habitués à ses produits. Cependant, Bentchikou Tabacs Algérie, qui importe ses produits depuis son siège social en Belgique, gagne en parts de marché régulièrement en Algérie (Euromonitor International, 2010).

En Algérie, les bureaux de tabac ou les kiosques restent le premier canal de distribution, représentant 67% du volume des ventes en 2009. Ils sont largement distribués dans tout le pays et offrent la plus grande gamme de stock (Euromonitor International, 2010).

4. CONSOMMATION :

La prévalence de l'usage de tabac sans fumée varie considérablement non seulement entre les pays, mais aussi selon l'âge, le sexe et la situation socio-économique (Figure 9).

En Algérie, la consommation orale, représentée par le tabac à chiquer, communément appelée « Chemma », est de 10,4 %. Cette forme de tabac est consommée beaucoup plus dans les régions du centre (Algérois, Kabylie) et du sud. La consommation par le nez ou tabac à priser, communément appelée « Neffa », est de 4 % (Haddad et Moumni, 2011).

Selon l'étude TAHINA (2007), 9,48% des algériens consomment du tabac à chiquer (Tableau 2). Cette consommation se caractérise par :

- Une prédominance masculine (21 %)
- Une augmentation proportionnelle avec l'âge, avec un pic chez les 65-70 ans (13,73 %).
- Une prédominance en milieu rural avec (12,16 %) plus que dans le milieu urbain (7,96 %).
- L'apanage de 02 régions géographiques : les hautes plaines (11,13 %) et le sud (11,68 %).

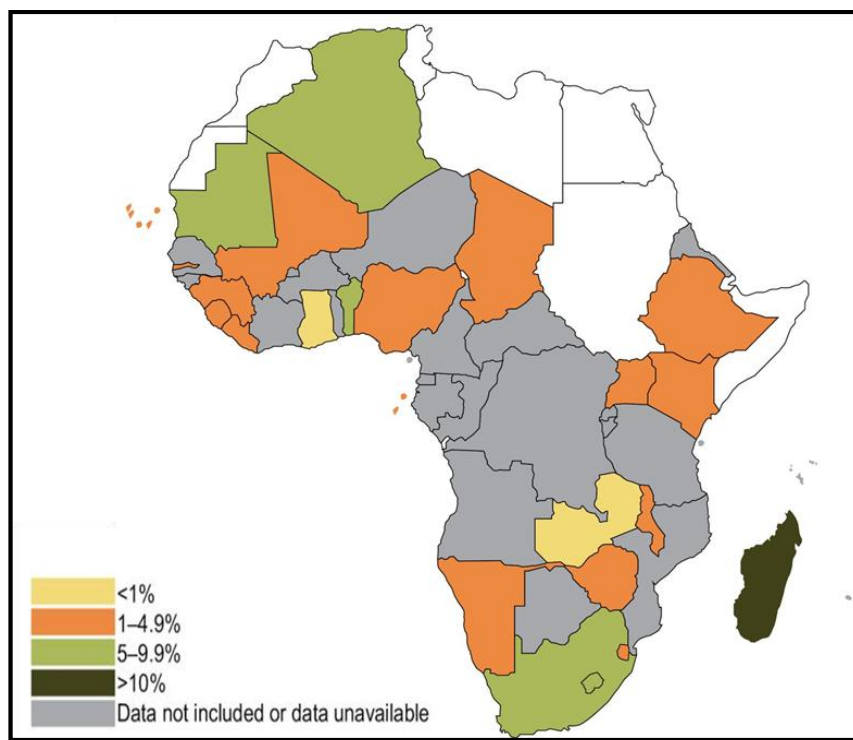


Figure 9 : Prévalence du tabagisme sans fumée chez les adultes en Afrique (WHO report on the global tobacco epidemic, 2011).

Tableau 2 : Consommation actuelle du tabac sans fumée selon le sexe, l'âge, le milieu et la région (Etude TAHINA, 2007).

	Hommes		Femmes		Total	
	%	IC [95%]	%	IC [95%]	%	IC [95%]
Age (ans)						
35-39	16.52	11.54 – 21.51	0.13	-0.05 – 0.32	6.04	4.06 – 8.02
40-44	19.04	13.28 – 24.81	0.16	-0.16 – 0.50	7.84	5.20 – 10.48
45-49	20.04	14.12 – 25.96	0.49	-0.04 – 1.03	7.27	4.95 – 9.58
50-54	22.54	17.10 – 29.97	0.29	-0.14 – 0.72	10.03	7.35 – 12.72
55-59	26.42	18.50 – 34.34	2.90	0.15 – 5.65	12.83	9.22 – 16.44
60-64	23.43	16.50 – 30.35	1.24	0.26 – 2.22	11.43	8.00 – 14.85
65-70	23.70	17.02 – 30.38	3.90	0.80 – 7.00	13.73	10.08 – 17.39
Milieu						
Urbain	18.38	15.13 – 21.64	0.99	0.27 – 1.71	7.96	6.42 – 9.50
Rural	26.20	20.85 – 31.56	1.20	0.02 – 2.37	12.16	9.29 – 15.03
Région						
Tell	21.03	17.75 – 24.32	0.23	-0.007 – 0.48	8.46	6.91 – 10.01
Hautes Plaines	23.85	17.26 – 34.44	2.25	0.93 – 3.57	11.13	7.87 – 14.40
Sud	16.94	10.11 – 23.77	4.59	-2.34 – 11.53	11.68	7.87 – 15.49
Total	21.44	18.59 – 24.29	1.06	0.53 – 1.59	9.48	8.08 – 10.88

Le dernier rapport de l’OMS sur l’épidémie du tabac en Algérie (WHO report on the global tobacco epidemic, 2017), indique que la consommation du TSF est de 3,5% chez les jeunes moins de 15 ans et de 5,7% chez les adultes (Tableau 3).

Tableau 3 : Consommation du tabac sans fumée selon les derniers résultats du sondage au 31 décembre 2016 (WHO report on the global tobacco epidemic, 2017).

	Usage chez les jeunes	Usage chez les adultes
Prevalence (%)	Utilisation actuelle du tabac sans fumée	Utilisation actuelle du tabac sans fumée
Mâles	6,9	10,0
Femelles	0,8	0,8
Total	3,5	5,7

Jeunes : Enquête mondiale sur le tabagisme chez les jeunes, 2013 ; National, âge 13-15
 Adultes : Enquête algérienne sur le tabagisme chez les adultes, 2010 ; National, âges +15

5. COMPOSITION DU TABAC SANS FUMEE & EFFETS SUR LA SANTE :

5.1. Le tabac sans fumée est cancérogène pour l’homme :

Parmi les 2 000 substances chimiques contenues dans le tabac sans fumée, 28 ont été identifiées, par l'INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER comme cancérogènes (IARC, 2007). En effet, les produits de tabac non fumé contiennent des agents cancérogènes, tels que les nitrosamines, le formaldéhyde, l’aldéhyde crotonique, les benzo-a-pyrène et autres hydrocarbures aromatiques polycycliques et le polonium 210 (Stepanov et al., 2009). Les nitrosamines spécifiques du tabac (N nitrosonornicotine (NNN) et 4-(méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)) sont clairement les agents cancérogènes les plus forts et les plus prévalents du tabac non fumé et sont susceptibles de jouer un rôle considérable dans l’induction de cancer buccal et celui du pancréas (Figure 10). Les quantités de NNN et NNK dans les produits de tabac non fumé vendus aux États-Unis sont en moyenne de 2 à 5 µg/g de tabac sec et sont bien supérieures aux quantités de nitrosamines de tout autre produit de consommation (Stepanov et al., 2009).

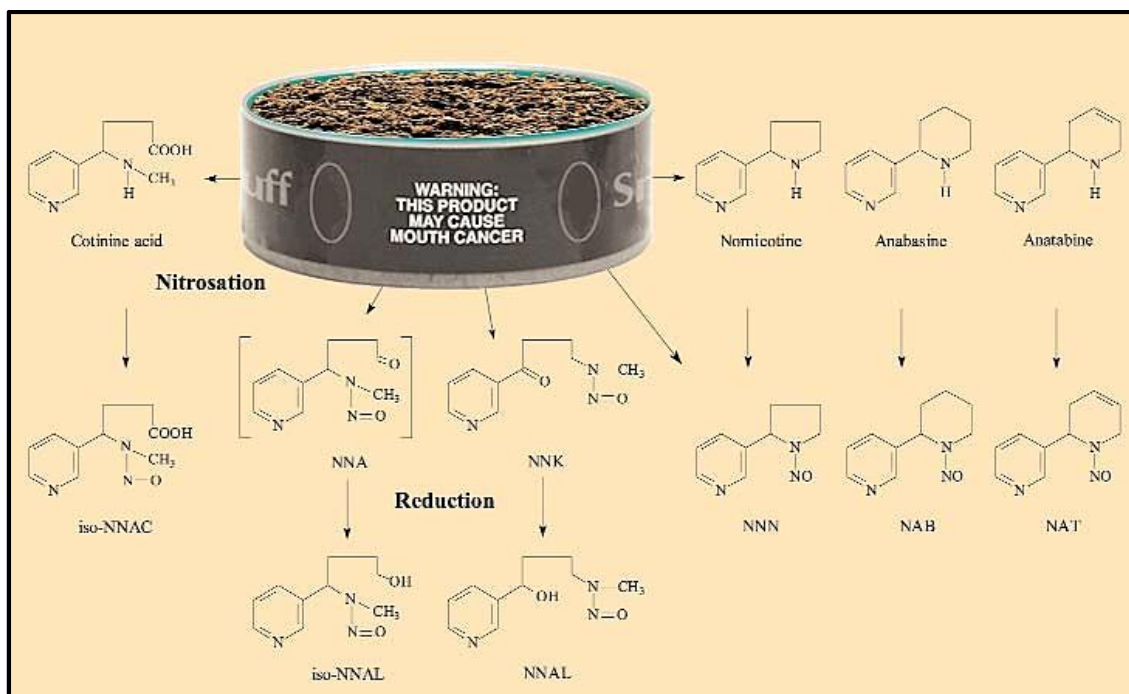


Figure 10 : Diagramme schématique du métabolisme de la nicotine, le produit chimique addictif présent dans tous les produits du tabac (WHO, 2007).

5.2-Tabac sans fumée et Stress oxydant :

Pendant ces deux dernières décennies, la recherche toxicologique s'est concentrée sur l'induction du stress oxydant après la consommation du tabac sans fumée comme mécanisme possible de la toxicité (Schivo et al., 2014 ; Velayutharaj et al., 2013 ; Avti et al., 2006 ; Bagchi et al., 2002). En fait, le stress oxydant (SO) est le résultat des processus de multi-étapes causant un déséquilibre dans la balance entre les oxydants/pro-oxydants et les antioxydants et menant aux dommages tissulaires au niveau des poumons (Kumari et al., 2013 ; Maduka et al., 2009), du foie (Velayutharaj et al., 2013 ; Shrestha et al., 2012 ; Bagchi et al., 1998) et des reins (Avti et al., 2006 ; Bagchi et al., 1998), conduisant en premier lieu à de nombreuses maladies comme le cancer (Schivo et al., 2014 ; Boffetta et al., 2008), les maladies cardiovasculaires (Gupta et al., 2013 ; Asplund, 2003), les dysfonctionnements de la reproduction (Gupta et Sreevidya, 2004), le diabète (Gupta et al., 2013) et aboutissant finalement à l'apoptose.

Par ailleurs, les lipopolysaccharides (LPS), composants de la paroi cellulaire bactérienne Gram négatives, sont des endotoxines efficaces capables d'activer l'immunité innée (Chaby et al., 2005), qui ont été détectés dans les produits de tabac : les cigarettes (~ 20 µg/cigarette), la fumée de cigarette traditionnelle et le tabac à chiquer (~ 0,12 - 0,2 µg/cigarette) (Pauly et Paszkiewicz, 2011). Le mécanisme d'action des LPS inclut la voie de stress oxydant en

stimulant la production de ROS et d'espèce réactive de l'azote. Des études précédentes suggèrent que les troubles du métabolisme oxydant-antioxydant jouent un rôle majeur dans le développement de la lésion pulmonaire LPS-induite chez les animaux ou les êtres humains (Thimmulappa et al., 2006 ; Gonzalez et al., 1996).

6. LEGISLATION/RELIGION ET TABAC :

6.1. OMS :

L'histoire de lutte contre le tabagisme connaît un tournant important lorsqu'il est reconnu comme une toxicomanie selon la définition de 1957 de L'OMS et qui définit une toxicomanie comme « un état d'intoxication périodique ou chronique engendré par la consommation répétée d'une drogue (naturelle ou synthétique) ». Ses caractéristiques sont notamment :

- Un invincible désir ou un besoin de continuer à consommer la drogue ou de se la procurer par tous les moyens.
- Une tendance à augmenter les doses.
- Une dépendance d'ordre psychique et généralement physique à l'égard des effets de la drogue.
- Des effets nuisibles à l'individu et à la société.

En 1971, lors de sa 24^{ème} assemblée, l'OMS débutait un vaste programme de lutte contre le tabagisme et en 1999, la directrice GROHARLEM Brundtland définit la lutte contre le tabagisme comme un objectif majeur de L'OMS. Cette politique a débouché sur l'adaptation au printemps 2003 d'une convention cadre « Framework convention on tobacco control » (FTCT) qui devait être signée puis ratifiée par la grande majorité des états membres de cette organisation, il s'agit aussi du premier traité international jamais adopté en matière santé publique.

Le texte prévoit des mesures pour restreindre la demande de tabac par : l'augmentation des taxes sur les cigarettes, la mise en œuvre des mesures législatives pour interdire de fumer dans les lieux publics et sur les lieux de travail intérieur et des mesures visant à lutter contre la contrebande, à interdire la vente du tabac aux moins de 16 ans ou encore de soutien aux pays pour qu'ils reconvertisse leurs cultures de tabac, est également énoncé (Convention-cadre de l'OMS pour la lutte antitabac, 2005).

6.2. JORAD :

En Algérie, plusieurs lois ont été adoptées pour lutter contre la consommation du tabac surtout dans les endroits publics. La première était la loi n° 85-05 du 16 février 1985, relative à la protection et à la promotion de la santé (Articles 63–64-65 et 66). En 15 juillet 1999,

l'arrêté **n° 24 MSP/MIN** ; portant création du comité médical national de lutte antitabac. En 2011, deux décrets exécutifs ont été mis en place. Le premier **n° 01-285** du 24 septembre, fixant les lieux publics où l'usage du tabac est interdit et les modalités d'application de cette interdiction (JORAD n°55 : p15–16), et le deuxième **n° 01-396** du 9 décembre portant réglementation des activités de fabrication et de distribution de tabacs.(JORAD N°75 p9-14). Plus tôt en 2005, l'instruction ministérielle **n° 1437/MSPRH/DP** relative à la mise en application du décret exécutif **n° 01-285** du 24 septembre 2001 fixant les lieux publics où l'usage du tabac est interdit et les modalités d'application de cette interdiction. Ensuite, le décret présidentiel **n° 06–120** du 12 mars 2006, portant ratification de la convention cadre de l'OMS pour la lutte antitabac adoptée à Genève le 21 mai 2003. Enfin, en 2017 deux instructions ministérielles dont la première **n° 020** du 23 mai relative à la mise en place des hôpitaux sans tabac, et celle du **03 Juin 2007** relative à la mise en place des hôpitaux sans tabac.

6.3. Fatwas :

En répondant à une question qui demande l'avis religieux relatif au tabagisme, Dar El- Iftâ (Egypte) précise que l'islam a interdit à l'homme tout ce qui pourrait lui causer un préjudice physique ou moral. A cet égard, Allah dit « *Ceux qui suivent le messager, le Prophète illettré qu'ils trouvent écrit (mentionné) chez eux dans la Thora et l'Evangile. Il leur ordonne le convenable, leur défend le blâmable, leur rend licites les bonnes choses, leur interdit les mauvaises, et leur ôte le fardeau et les jougs qui étaient sur eux. Ceux qui croiront en lui, le soutiendront, lui porteront secours et suivront la lumière descendue avec lui ; ceux-là seront les gagnants.* » (Al-Aaraf, 157).

En effet, on entend par les bonnes choses (figurées dans ce verset) tout ce qui a une utilité quelconque matérielle ou morale, alors qu'on entend par les mauvaises choses celles qui pourraient causer un préjudice physique ou moral. Allah, le Très-haut, dit « *Ne vous exposez pas, de votre propre initiative, à la perdition* » (Al-Baqara, 195).

Le Prophète a également dit « *En Islam, nul préjudice ni à causer ni à subir* » (rapporté par Ahmad dans son Mosnad, Ibn Maja d'après Ibn 'Abas – qu'Allah les agrée ! Il est également rapporté par Malek dans al-Mowatta' d'après Yahya al-Mazni ainsi que par Ibn Maja d'après Obada Ibn as-Samit).

Du point de vue médical, il est bien établi que le tabagisme, sous toutes ses formes, nuit à la santé de l'homme et affecte son physique. C'est pourquoi, il est catégoriquement interdit (Dar El- Iftâ Egyptienne, 2008).

En plus, concernant l'avis religieux relatif aux activités commerciales reliées au tabac, le Comité Permanent des Recherches Scientifiques et de la Délivrance des Fatwas (Al-Iftâ) (Arabie Saoudite) a répondu :

Louange à Allah, l'Unique, et prière et salut sur le Prophète ultime. Ensuite :

Après examen de la question, le Comité a déclaré illicite de travailler dans la fabrication, la commercialisation ou la publicité des cigarettes, et que le salaire perçu par ce biais est illicite, car ce travail revient à aider dans le mal et la transgression. Celui qui accomplit ce travail doit ainsi le quitter, se repentir auprès d'Allah et rechercher un travail licite : « *Et quiconque craint Allah, Il Lui donnera une issue favorable* » « *et lui accordera Ses dons par (des moyens) sur lesquels il ne comptait pas* » (At-Talaq, 3-4). Qu'Allah vous accorde la réussite et que les prières et le salut soient sur notre Prophète Mohammad, ainsi que sur sa famille et ses compagnons (Le Comité Permanent des Recherches Scientifiques et de la Délivrance des Fatwas (Al-Iftâ'), 2000).

CHAPITRE 4 : LA GRAINE DE NIGELLE (*Nigella sativa*) :

1. ÉTYMOLOGIE :

Le genre *Nigella* L. a été nommé d'après les graines noires caractéristiques retrouvées dans la plupart des espèces de *Nigella* (figure 11). Le terme latin « nigellus » est le diminutif de « niger », qui signifie noir (Hegi, 1975). Les grecs nommaient *Nigella sativa* « melanthion », de « melas » qui veut dire noir et « anthos » fleur, donc l'étymologie tire du même attribut (Toparslan, 2012).



Figure 11 : Graines de Nigelle cultivée (*N. sativa*) (The Goblin, 2017).

Nigella sativa est connue sous les noms de "Sanoudj", "habba sawda" et "habbet el baraka" dans presque tous les pays arabes (Beloued, 1998). Elle est connue sous d'autres noms en France comme, le cumin noir, le faux cumin, la poivrette, le sésame noir, la nielle, les cheveux de Vénus ou encore la nigelle (Toparslan, 2012).

2. ASPECT BOTANIQUE :

Nigella sativa est une plante annuelle herbacée atteignant 30 à 60 cm de haut appartenant à la famille des *Ranunculaceae*. Ses feuilles pennatiséquées, divisées en lobes étroits, sont lancéolées à linéaires et présentent des onglets nectarifères. Les feuilles inférieures sont petites et pétaloïdes et les feuilles supérieures sont longues (Bonnier, 1990 ; Ghedira, 2006). Les fleurs sont petites à pétales blanchâtres et sépales pétaloïdes et présentent de nombreuses étamines insérées sur le réceptacle (Ghedira, 2006). La plante est hermaphrodite à reproduction autonome dont le fruit est une capsule formée de 3 à 6 carpelles soudés entre eux jusqu'à la base des styles persistants (Bonnier, 1990). Chaque capsule contient plusieurs graines triangulaires blanchâtres et à maturité, elles s'ouvrent et l'exposition des graines à l'air les rend noires. Ses graines sont ovoïdes de 2 à 3.5 mm présentent 3 à 4 angles avec une face supérieure finement granuleuse et réticulée (Ghedira, 2006) (Figure 12).



Figure 12 : *Nigella sativa* L. (Toparslan, 2012).

3. HISTOIRE DE *Nigella sativa* L., DEPUIS LA DECOUVERTE JUSQU'À L'UTILISATION COMME REMÈDE :

Des fossiles du début du Crétacé (-250 millions d'années) prouvent l'existence des nigelles à la fin de l'Ère secondaire (Bittkau et Comes, 2005).

Par ailleurs, des archéologues ont trouvé une fiole d'huile de cumin noir dans le tombeau du Pharaon Toutânkhamon (v.-1353 à -1343).

Hippocrate (460-377 av. J.-C.), surnommé le père de la médecine conseille de brûler les graines de nigelle pour tuer les moucheron et les moustiques ; et Tragus les employait comme antihelminthiques (Toparslan, 2012).

On crédite à l'excellence des arabes en médecine l'élargissement du champ d'application de cette plante en thérapeutique. « Soignez-vous en utilisant la graine de nigelle, c'est un remède contre tous les maux à l'exception de la mort », telle est la recommandation faite par le prophète Mohammed au 7 siècle. Enfin, les médecins arabes connaissaient la toxicité de *N.*

sativa à forte dose. De ce fait, ils recommandaient de ne pas dépasser une dose unitaire d'un demi-*Dirham* (1,62 g) et une dose journalière de deux *Dirhams* (6,48 g) (Toparslan, 2012).

4. COMPOSITION CHIMIQUE :

Les graines de *N. sativa* contiennent différents composants, dont les lipides, les protéines, les glucides, les vitamines et les minéraux (Ramadan, 2007 ; Al-Jassir, 1992). Le pourcentage d'ingrédients varie en fonction de la répartition géographique, du temps de récolte et des méthodes de culture (Kamal et al., 2010). Une approximation de la composition est donnée dans le tableau 5.

Tableau 5 : Composition chimique générale des graines de *Nigella sativa*
(Amin et Hosseinzadeh, 2016).

Constituants		Composition chimique	Pourcentage
Huile	Huile fixe	Acides : Linoléique (Omega-6), Oléique, Palmitoleique, Linolénique (Omega-3), Myristoleique, Dihomolionolénique, Stéarique, Eicosadienoïque, Myristique, Arachidique, Béhanique. Stérols (β -sitostérol, avenastérol, stigmastérol, campestérol et lanosterol), Tocophérols (α , β , et γ) Thymoquinone, Rétinol (vitamine A), Caroténoïdes (β -carotène)	22-38%
	Huile essentielle	Thymoquinone, p-Cymene, Carvacol, α -Pinene, β -Pinene, Longifolène, t-Anethole Thymol, Thymohydroquinone, Dithymoquinone (nigellone)	0,40-1,50%
Protéines		Acide glutamique, Arginine, acide aspartique, Leucine, Glycine, Valine, Lysine, Thréonine, Phénylalanine, Isoleucine, Histidine, Méthionine	20,8–31,2%
Glucides		Glucose, Rhamnose, Xylose, Arabinose	24,9-40%
Sels minéraux		Calcium, Phosphore, Fer, Potassium, Sodium, Zinc, Magnésium, Manganèse, Cuivre, Sélénium	3,7-7%
Saponines		α -Hederine (melanthine), Hederagenine (melanthigenine)	0,013%
Alcaloïdes		Nigellicine, Nigellimine, Nigellidine	0,01%
Autres vitamines		Vitamine A, Thiamine, Riboflavine, Pyridoxine, Niacine, Folacine, Vitamine C	1-4%

5.1. L'huile fixe :

L'huile fixe représente 22-38% du poids de la graine. Elle Contient des quantités appréciables d'acides gras insaturés (acides linoléique, oléique et inolénique) ainsi que des acides gras saturés en petites quantités (acides arachidonique et eicosénoïque). Outre le profil des acides gras, il comprend également des quantités considérables de vitamine E (tocophérol α , β et γ), le rétinol (vitamine A), les caroténoïdes (β carotène) et la thymoquinone (2-isopropyl-5-méthyl-1,4-benzoquinone). Les vitamines liposolubles représentent plus de 0,2% de la teneur totale en huile (Amin et Hosseinzadeh, 2016 ; Al-Saleh et al., 2006).

5. 2. L'huile essentielle :

L'huile essentielle représente entre 0,40-1,50% du poids total des graines (Amin et Hosseinzadeh, 2016). Elle est d'une grande importance fonctionnelle en raison de sa richesse en composants volatiles, tels que 18,4-24% de thymoquinone (TQ), 46% de monoterpènes, y compris le p-cymène, l' α -pinène, le thymol (THY), la dithymoquinone (DTQ, la nigellone) et Thymohydroquinone (THQ) (Singh et al., 2014 ; Burits et Bucar, 2000). Des travaux récents sur l'huile essentielle de *Nigella sativa* cultivée au Sahara Algérien (Timimoune et Adrar), et extraite par deux méthodes différentes, l'hydrodistillation et distillation par micro-onde, ont montré qu'elle représente entre 1,4–1,9 % du poids de l'huile fixe et 0,18 à 0,50% du poids des graines. Analysée par CPG et GC-MS, on y a retrouvé 112 composés qui ont été identifiés et caractérisés, le p-cymène représente toujours le composé le plus abondant suivi de la thymoquinone (Benkaci et al., 2007).

La photodimérisation de la TQ, par suite de l'exposition à la lumière solaire pendant la séparation et l'extraction des quinones de la graine, produit de la dithymoquinone. Parmi les composants isolés de l'huile volatile de *N. sativa*, la TQ est apparue comme le principal ingrédient actif (Al-Saleh et al., 2006 ; Ghosheh et al., 1999). La structure chimique des principaux ingrédients de l'huile de *N. sativa*, y compris la thymoquinone, la dithymoquinone, la thymohydroquinone, le p-cymène et le thymol est présentée dans la figure 13.

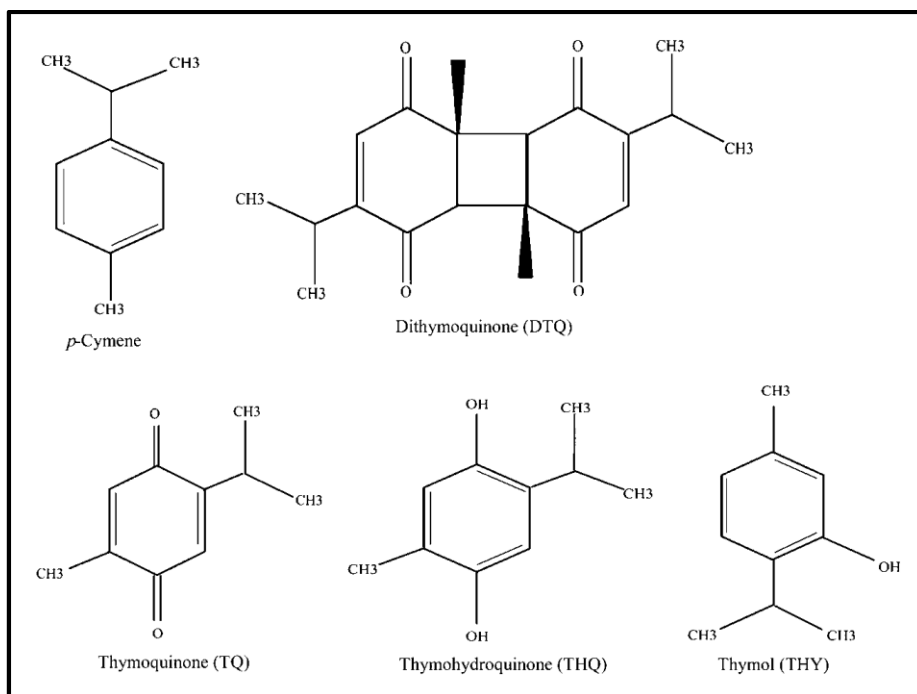


Figure 13 : Structure chimique des composants actifs retrouvés dans l'huile essentielle de *Nigella sativa* L. (Amin et Hosseinzadeh, 2016).

5. 3. Les alcaloïdes :

Les graines de *Nigella sativa* contiennent également des alcaloïdes comme la nigellicine (Atta-Ur-Rahman et al., 1985a) et la nigellidine, ayant un noyau indazol (Atta-Ur-Rahman et al., 1995), l'isoquinone nigellimine (Atta-Ur-Rahman et al., 1992) et son N-oxyde (Atta-Ur-Rahman et al., 1985b), ainsi que les alcaloïdes diterpènes Dollabllane-types nigellamines A₁, A₂, B₁, B₂ (Morikawa et al., 2004a), A₃, A₄, A₅, et C (Morikawa et al., 2004b) (Figure 14).

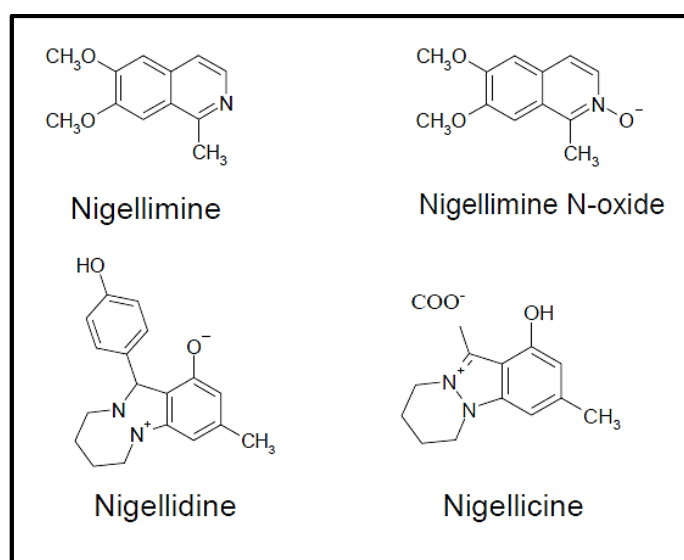


Figure 14 : Structure chimique des principaux alcaloïdes de *N. sativa* L. (Toparslan, 2012).

5.4. Les triterpènes saponines :

Dans une étude réalisée par Kumara et Huat (2001), il a été possible d'isoler et de caractériser à partir des graines de *Nigella sativa* une saponoside triterpénique douée de propriétés antitumorales appelée l' α -hederine. Une étude ultérieure de Taskin et ses collaborateurs (2005) a permis d'isoler à partir de l'extrait méthanolique trois autres saponosides apparentées à l' α -hederine, avec l'élucidation de leurs structures par des méthodes chimiques et spectrales :

- 3-O- β -D-xyl (1-3)- α -L-rha- (1-2)- α -L-ara-28-O- α -L-rha(1-4)- β -D-glu(1-6)- β -D-glu-hédéragénine.
- 3-O- α -L-rha-(1-2) α -L-ara-28-O- α -L-rha(1-4)- β -D-glu(1-6)- β -D-glu-hédéragénine.
- 3-O- β -D-xyl(1-3)- α -L-rha-(1-2)- α -L-arahédéragénine.

5.5. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des composés aromatiques dont la biosynthèse constitue l'un des processus fondamentaux de la phytochimie. Les Renonculacées sont un groupe riche en flavonols et en flavones. En 1997, trois flavonoïdes triglycosylés (Figure 15) ont été isolés à partir des graines de *N. sativa* et leurs structures ont été déterminées (Merfort et al., 1997) :

1. quercétine 3-glycosyl (1 $\rightarrow$ 2) galactosyl (1 $\rightarrow$ 2) glucoside.
2. kœmpférol 3-glycosyl (1 $\rightarrow$ 2) galactosyl (1 $\rightarrow$ 2) glucoside.
3. quercétine 3-(6-feruloglucosyl) (1 $\rightarrow$ 2) galactosyl (1 $\rightarrow$ 2) glucoside.

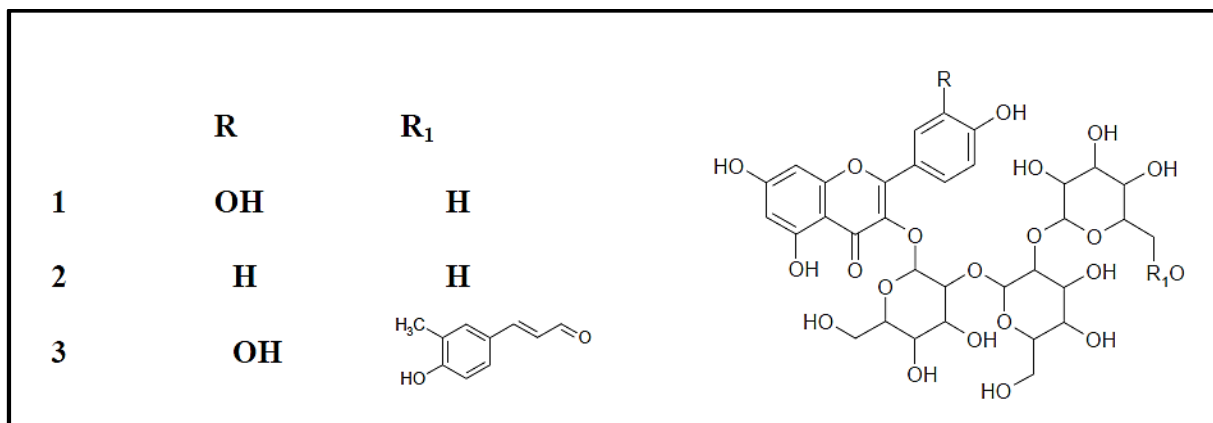


Figure 15 : Structure chimique des trois flavonoïdes isolés de *Nigella sativa* L.

(Merfort et al., 1997).

5.6. Les protéines :

Les graines de *Nigella sativa* sont très riches en protéines (environ 16 %), avec dominance de l'acide glutamique (22,4%), d'acide aspartique (10,05%) et d'arginine (9,18%) (Al-Gaby, 1998). La protéine la plus étudiée jusqu'à maintenant est la lipase qui catalyse des réactions de transestérification (Tuter et al., 2003). L'analyse des acides aminés de l'hydrolysate de ces

protéines révèle la présence de 17 acides aminés y compris 8 parmi les 9 acides aminés essentiels (Al-Jassir, 1992 ; Salem, 2005 ; El-Obeid et al., 2006).

5.7. Les vitamines et les sels minéraux :

La composition en vitamines révèle la présence des vitamines B₁, B₂, B₆, PP et de l'acide folique (Nergiz et Otles, 2003). Ramadan et Mörsel (2002) ont analysé les vitamines liposolubles de *Nigella sativa* et ont pu identifier toutes les classes des tocophérols dans l'huile. Les tocophérols totaux constituent 0,05% de l'huile, et sont constitués majoritairement de l' α -tocophérol (48%) et 6 du γ -tocophérol (28%). Ces mêmes chercheurs ont pu également identifier d'autres vitamines liposolubles comme le β -carotène (0,05%) et la vitamine K (0,1%). Dans une étude ultérieure, Al-Saleh et son équipe (2006) ont affirmé après analyse par HPLC que les teneurs en α et γ -tocophérols sont relativement élevées : de 5, 65 à 11,39 mg/kg et de 2, 26 à 6,95 mg/kg respectivement alors que celle de all-trans-rétinol est très faible de 0 à 0,54 mg /kg des graines.

L'analyse minérale a été réalisée par spectrophotométrie par absorption atomique sur des graines de Nigelle provenant de 4 pays différents : Inde (1 échantillon), Syrie (2 échantillons), Turquie (1 échantillon) et Jordanie (1 échantillon). Les valeurs obtenues pour chaque échantillon ne montraient que peu de variations et le tableau 6 en donne une moyenne :

Tableau 6 : Composition minérale des graines de *Nigella sativa* (Takruri et Dameh, 1998).

Composition	Teneur en mg/100g
Potassium	527,70 $\pm$ 47,70
Phosphore	526,50 $\pm$ 30,16
Sodium	49,60 $\pm$ 6,13
Fer	10,50 $\pm$ 1,56
Zinc	6,04 $\pm$ 0,38
Calcium	185,90 $\pm$ 18,27
Cuivre	1,84 $\pm$ 0,34

La teneur des graines en sélénium a été également déterminée, elle représente 0,27-0,54 mg/kg des graines (Al-Saleh et al., 2006). Une autre étude confirme l'absence de métaux lourds (cadmium, plomb et arsenic) (Al-Jassir, 1992).

6. PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES DES GRAINES DE *Nigella sativa*

Durant les vingt dernières années, plusieurs travaux ont porté sur l'étude de *Nigella sativa*, notamment sur les effets dus à ses extraits ainsi qu'aux principaux constituants (notamment la thymoquinone) sur divers systèmes *in vivo* et *in vitro*. Ces travaux ont ressorti plusieurs effets de grande importance pour la médecine moderne, parmi ces effets on cite les plus importants :

6.1. Effets sur le système immunitaire

Les graines de *Nigella sativa* présentent *in vitro* des propriétés immuno-potentialisatrices sur la prolifération des splénocytes, de la fonction des macrophages et de l'activité antitumorale des cellules NK en utilisant des cellules primaires BLAB/c et C57/BL6 (Majdalawieh et al., 2010). Aussi, elle stimule la production de l'INF- γ et la prolifération des macrophages et des lymphocytes T₄ *in vivo* (Salem et Hussain, 2000).

Des études récentes ont rapporté que l'extrait hydroéthanolique des graines de *N. sativa* supprime la production d'IL-4 et améliore la production d'INF- γ dans le sang de cobayes sensibilisés à l'ovalbumine et inhibe la production de cytokines Th2 (IL-4, IL-5 et IL-13) et rétabli la diminution de la production de cytokines Th1 (INF- γ) chez des souris sensibilisées (Boskabady et al., 2011 ; Balaha et al., 2012).

6.2. Effets anti-inflammatoire et analgésique

L'activité anti-inflammatoire des feuilles de la plante contenant la TQ est 12 fois supérieure à celle mesurée dans l'extrait de graines. Ceci a été montré par une réduction significative de la production de l'oxyde nitrique (Alemi et al., 2013). En effet, la TQ, désormais reconnu comme un nouvel inhibiteur des voies proinflammatoires, fournit une stratégie prometteuse qui combine des modes d'action anti-inflammatoires et pro-apoptotiques (Chehl et al., 2009). Ainsi, la TQ présente un léger effet inhibiteur sur l'expression de COX-1 et la production de PGE-2 dans un modèle d'inflammation allergique des voies respiratoires chez les souris. Cette découverte suggère que la TQ a un effet anti-inflammatoire pendant la réponse allergique dans le poumon par l'inhibition de la synthèse de PGD-2 et de la réponse immunitaire conduite par les cellules Th2 (El Mezayen et al., 2006).

6.3. Activités antimicrobienne et antifongique

Les différents extraits des graines de *Nigella sativa* présentent un large spectre d'inhibition vis-à-vis de nombreuses souches bactériennes. Une inhibition claire de la croissance de *Staphylococcus aureus* a été observée par une concentration de 300 mg/ml (Bakathir et Abbas, 2011).

Aftab et al (2013) ont montré que les extraits méthanoliques de *N. sativa* ont l'effet antifongique le plus fort suivi par les extraits de chloroforme contre différentes souches de *Candida albicans*. Par contre, les extraits aqueux ne présentent aucune activité antifongique. Deux nouvelles défensines antifongiques, appelées Ns-D1 et Ns-D2, ont été isolées à partir de graines de *N. sativa* et séquencées. Ces défensines ont montré une forte activité antifongique envers un certain nombre de champignons phytopathogènes (Rogozhin et al., 2011).

6.4. Effets anticancéreux et antimutagène

Il a été démontré que l'administration de *N. sativa* exerce de puissants effets inhibiteurs sur le développement de la tumeur du rat et sur la prolifération cellulaire dans de multiples organes comme les tumeurs du côlon, du poumon, de l'œsophage et de l'estomac dans la phase post-initiation sans évidence d'effets secondaires cliniques (Salim, 2010).

On a également constaté que la TQ inhibe l'angiogenèse et la croissance tumorale en inhibant le NFκB et ses molécules de régulation. On a conclu que la TQ inhibe efficacement la croissance tumorale et l'angiogenèse à la fois *in vitro* et *in vivo*. Par conséquent, l'inhibition de NFκB et des molécules effectrices en aval est un mécanisme sous-jacent possible de l'activité antitumorale et anti-angiogénique de la TQ dans l'ostéosarcome (Peng et al., 2013).

6.5. Effets sur le système gastro-intestinal

Les graines de *Nigella sativa* sont largement utilisées dans la médecine traditionnelle pour le traitement des désordres gastro-intestinaux, l'extrait aqueux des graines empêche de manière significative la formation d'ulcères gastriques. Il améliore également la sévérité de l'ulcère et la sécrétion d'acide gastrique (Al-Mofleh et al., 2008). L'huile de *N. sativa* ainsi que la thymoquinone protègent contre les lésions gastriques (El-Abhar et al., 2003). L'extrait alcoolique des graines de *N. sativa* présente également une activité antiulcéreuse qui a été attribuée aux flavonoïdes qu'il contient (Raj Kapoor et al., 2002).

6.6. Effets sur le système respiratoire

Les propriétés antitussives et antiasthmiques des graines de *Nigella sativa* sont bien reconnues depuis des siècles, faisant d'elle une des plantes les plus recommandées pour le traitement des maladies respiratoires. L'action des graines de *Nigella sativa* sur le système respiratoire est probablement la résultante de plusieurs effets : prophylactiques (Boskabady et al., 2007), inhibition des récepteurs H1 de l'histamine (Boskabady et Shiravi, 2000), antagonisme du calcium (Gilani et al., 2001, Boskabady et Shirmohammadi, 2002 ; Boskabady et al., 2004), et cholinergiques (Boskabady et Shahabi, 1997).

6.7. Activité antidiabétique

N. sativa est d'un bénéfice thérapeutique immense chez les personnes diabétiques et celles qui souffrent d'intolérance au glucose car elle accentue la sécrétion d'insuline induite par le glucose, en plus d'avoir un impact négatif sur l'absorption du glucose par la muqueuse intestinale (Kapoor, 2009).

6.8. Activité antioxydante

De nombreuses cibles moléculaires sont impliquées dans les activités antioxydantes et anti-inflammatoires de *N. sativa* et de ses composants actifs. En effet, l'huile essentielle et les oléorésines obtenues à partir de graines de cumin noir (Nigelle) ont montré des effets antioxydants avec activité chélatante sur les ions ferreux, un effet de balayage sur le radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH). En même temps, de tels effets sus à l'huile essentielle étaient plus élevés que ceux observés par des antioxydants synthétiques tels que le butylhydroxytoluène (BHT) et le butylhydroxyanisole (BHA) (Singh et al., 2014).

Selon Sethi et al. (2008), il est fort probable que de nombreuses activités anti-inflammatoires affectées à *N. sativa* soient dues à son principal constituant : la thymoquinone, y compris les effets sur les enzymes COX, iNOS et 5-LPO ainsi que les cytokines proinflammatoires telles que TNF- α , IL-1, Et IL-6, qui peuvent être médiées, en partie, par la suppression de l'activation NF- κ B (Sethi-et al., 2008), sachant que l'expression de gènes de nombreuses enzymes et cytokines est régulée par ce facteur de transcription (Ahn et Aggarwal, 2005).

Les différentes cibles moléculaires modulées par *N. Sativa* et son principal composant, la thymoquinone, sont représentées dans la figure 16.

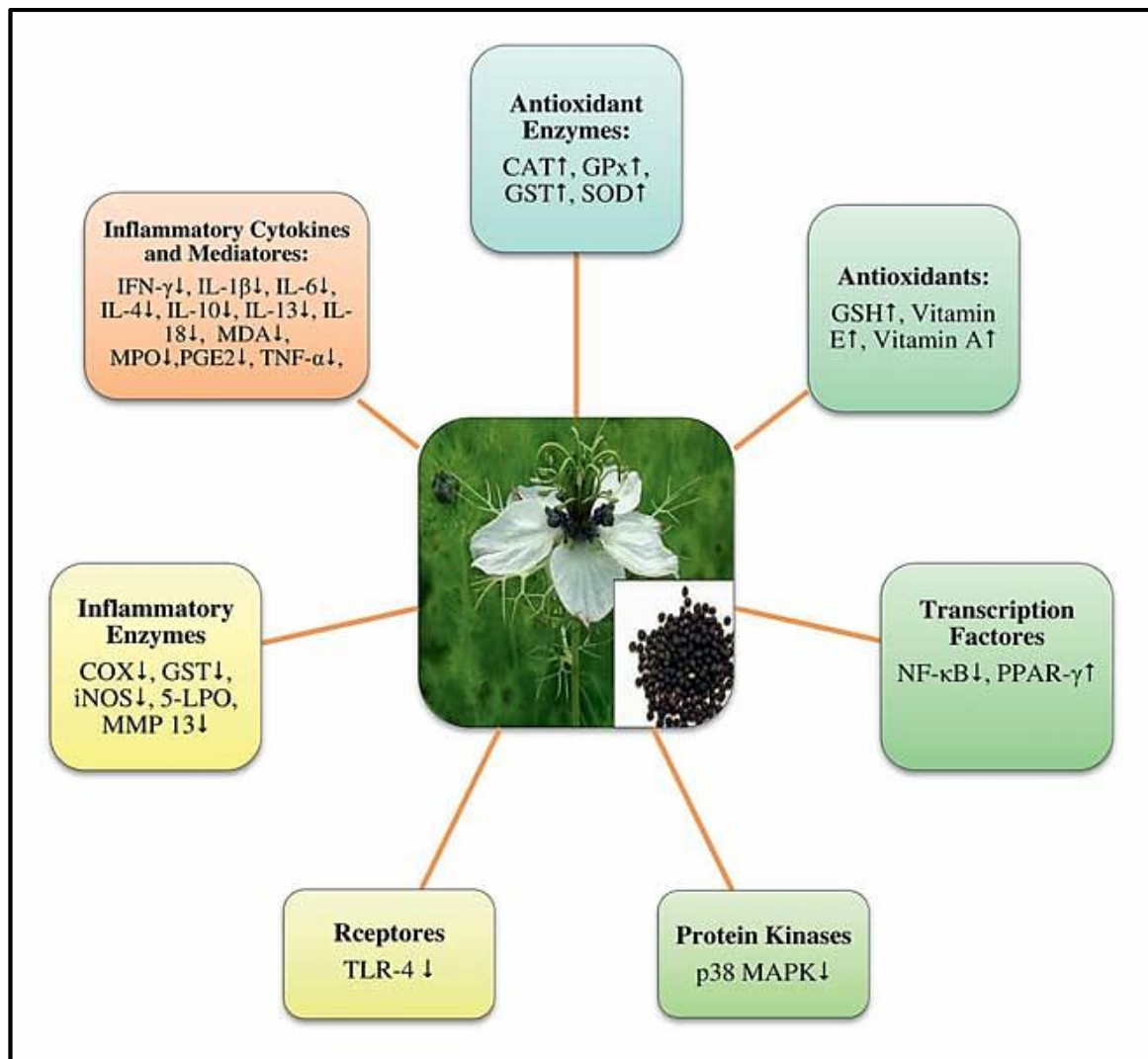


Figure 16 : Différentes cibles moléculaires de *N. sativa* et de la thymoquinone dans les maladies inflammatoires (Amin et Hosseinzadeh, 2016).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE 5. MATERIEL ET METHODES

5.1- BUT ET OBJECTIFS

Le but de cette présente étude est d'évaluer les effets de l'extrait aqueux du tabac sans fumée (TSF) sur un terrain asthmatique allergique dans un modèle expérimental chez le rat Wistar, tout en évaluant les effets préventifs et curatifs de l'huile de *Nigella sativa* à la fois vis à vis des effets de la sensibilisation allergénique mais aussi contre ceux du TSF.

Pour cela, et dans un premier temps, nous avons exploré les marqueurs biochimiques hépatiques et rénaux ainsi que le degré de l'inflammation et ce par :

- Le dosage des enzymes hépatiques (ASAT, ALAT et PAL), l'albumine, l'urée et la créatinine.
- Le dosage de l'IL-4 dans le sérum et le liquide du lavage broncho-alvéolaire (LBA).
- Le dosage de l'oxyde nitrique (NO) dans le sérum et le LBA.
- Le dosage des protéines totales dans le sang et le LBA.

Ensuite, dans un second temps, nous avons étudié la variation du statut de défense antioxydant au niveau du sang (érythrocytes) et des organes clés (poumon, rein et foie), en explorant :

- La peroxydation lipidique à travers le dosage du malondialdéhyde (MDA).
- L'oxydation des protéines via le dosage des protéines carbonylées.
- Le statut de défense antioxydant non enzymatique par le dosage du glutathion réduit (GSH) et des thiols non protéiques (NPSH).
- Les différentes enzymes antioxydantes (GPx, SOD, CAT).

En fin, dans un troisième temps, nous avons observé les modifications de l'architecture tissulaire pulmonaire, hépatique et rénale.

5.2 - ANIMAUX ET CONDITIONS D'ELEVAGE :

Au cours de notre protocole, nous avons utilisé 64 rats blancs mâles de la souche Wistar (*Rattus norvegicus*) qui proviennent de l'Institut Pasteur d'Algérie. Ces rongeurs, âgés de 6 à 8 semaines et d'un poids corporel compris entre 150 et 180g, ont été élevés dans une animalerie, et ont été soumis à une période d'adaptation d'un mois environ, sous une température de 25°C $\pm$ 2° et une photopériode naturelle. Ces rats ont été placés dans des cages en polyéthylène tapissées de copeaux de bois. Le nettoyage des cages et le changement de la litière ont été opérés un jour sur deux jusqu'à la fin de l'expérimentation. Ils ont été nourris à volonté avec un concentré énergiquement équilibré provenant de l'ONAB de Béjaïa dont la composition est détaillée dans l'Annexe (ANNEXE II).

5.3 – PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL :

5.3.1 – Composition des lots et traitement des rats :

Les rats ont été répartis équitablement en huit lots à raison de six rats par lot. Ils ont été sensibilisés et/ou traités avec l'huile de *Nigella sativa* et/ou administrés avec du tabac sans fumée, comme suit (figure 17a et 17b) :

- **Lot 1** : constitué de rats témoins (T) qui sont soumis aux mêmes conditions que les autres lots mais ont reçu uniquement l'eau physiologique ;
- **Lot 2** : constitué de rats sensibilisés à l'ovalbumine (Ova), et qui ont donc développés un asthme expérimental ;
- **Lot 3** : constitué de rats traités par voie orale (gavage) avec 4mL/kg/jour de l'huile de *Nigella sativa* (NS) ;
- **Lot 4** : constitué de rats sensibilisés à l'Ova et traités (gavage) avec 4mL/kg/jour de l'huile de *Nigella sativa* (Ova/NS) ;
- **Lot 5** : constitué de rats traités par le tabac sans fumée (TSF) à une dose de 40 mg/kg/jours ;
- **Lot 6** : constitué de rats sensibilisés à l'ovalbumine (Ova) traités par le tabac sans fumée (TSF) à une dose de 40 mg/kg/jours (Ova/TSF) ;
- **Lot 7** : constitué de rats traités par le tabac sans fumée (TSF) à une dose de 40 mg/kg/jours et traités par voie orale (gavage) avec 4mL/kg/jour de l'huile de *Nigella sativa* (TSF/NS) ;
- **Lot 8** : constitué de rats sensibilisés à l'Ova, traités par le tabac sans fumée (TSF) à une dose de 40 mg/kg/jours et traités (gavage) avec 4mL/kg/jour de l'huile de *Nigella sativa* (Ova/TSF/NS).

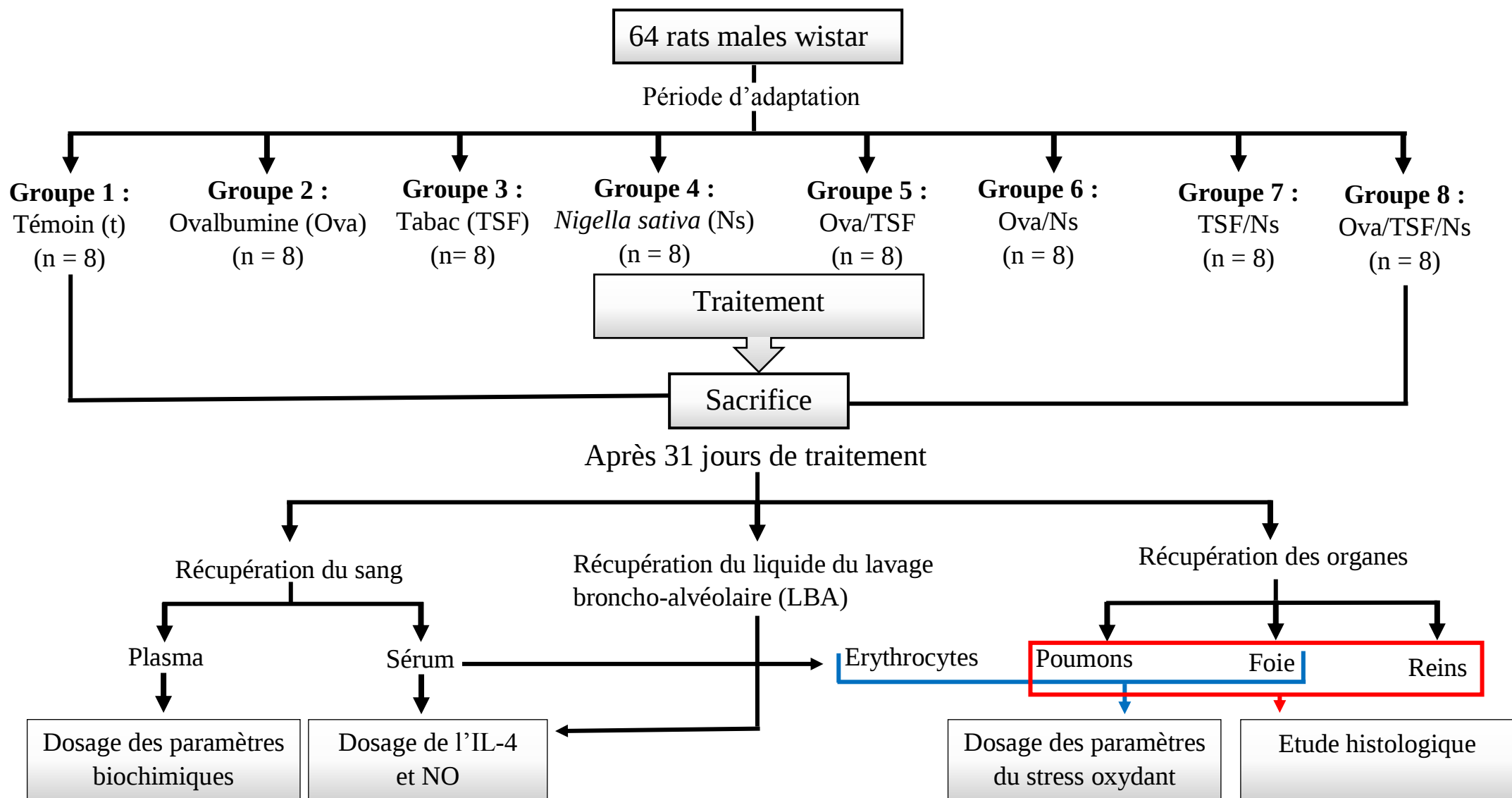


Figure 17a : Compartimentation des rats en six lots traités différemment.

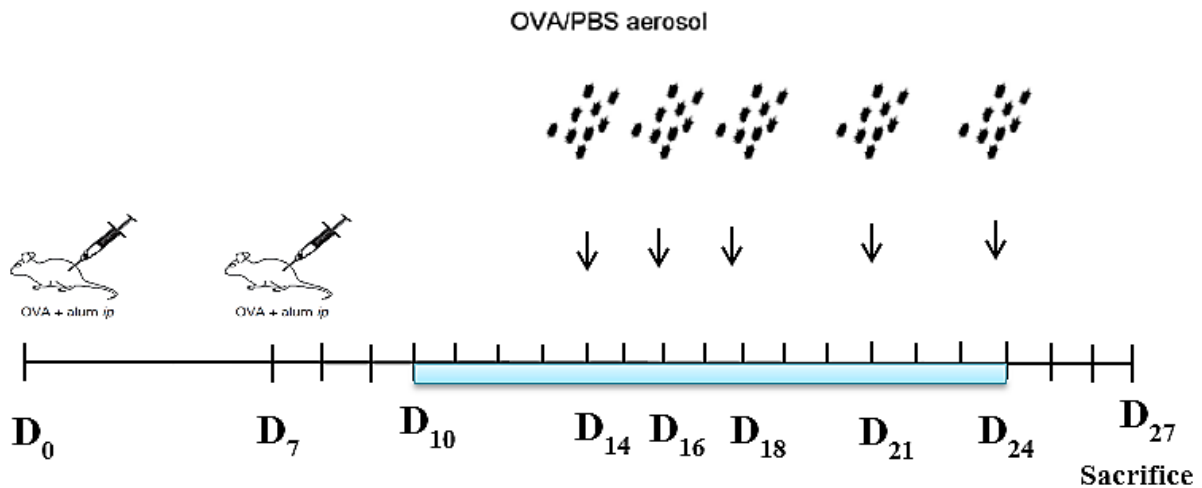


Figure 17b : Le protocole expérimental réalisé en 31 jours

(NS était administrée 4 jours avant la première injection)

: Administration orale de TSF.

5.3.2 – Sensibilisation des rats :

Les rats ont été sensibilisés à l'ovalbumine (grade II, Réf. A5253-250G, Sigma Aldrich) selon une méthode qui provoque une inflammation aigue avec un phénotype d'asthme allergique, qui est validé dans la littérature (Moerloose et al., 2005).

La sensibilisation a été effectuée par voie intra-péritonéale à l'aide d'une solution de 10 mg/ml d'ovalbumine qui est combinée à un adjuvant d'hydroxyde d'aluminium ($\text{Al}(\text{OH}_3)$) (Alun, Sigma Aldrich) dissout à raison de 1 mg/ml dans une solution saline à 0,9%. L'injection a lieu au premier jour (J_0) et répétée au septième jour (J_7) selon le protocole schématisé dans la figure 19. Les deux autres lots ont juste reçu une injection d'eau physiologique.

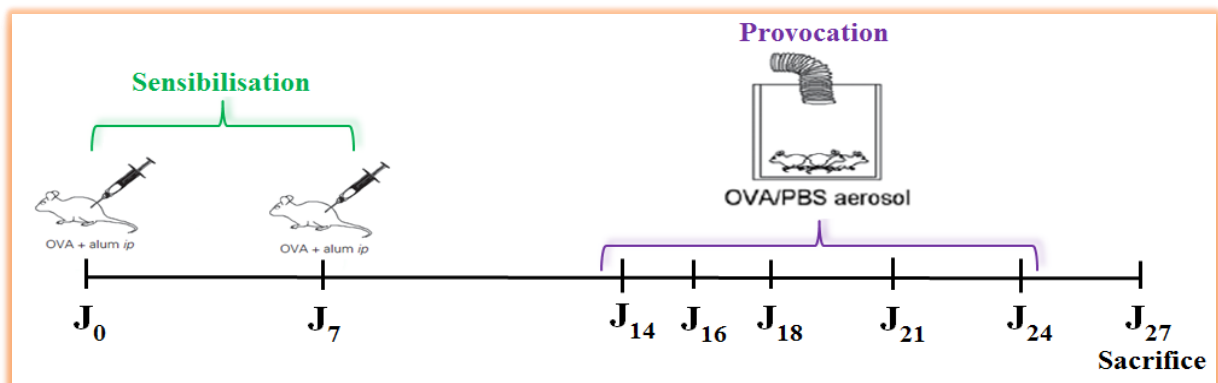


Figure 18 : Le protocole de sensibilisation.

5.3.3 – Provocation des animaux par l'aérosol :

La réaction anaphylactique a été induite par une réexposition au même allergène (injecté) et ce par inhalation intra-nasale d'ovalbumine à 10 mg/ml diluée dans une solution saline à 0,9% (Moerloose et al., 2005) (figure 19). Ainsi, aux jours 14, 16, 18, 21 et 24, les animaux ont été placés dans une chambre en plexiglas qui dispose d'une ouverture permettant le libre passage du nébulisât via un nébuliseur à compression (OMRON, NE-C29-E) fonctionnant à un débit de 0,4 mL/min pendant une durée de 30 minutes. Quant aux autres, ils ont été exposés à un aérosol d'eau salinée à 0,9% pendant 30 minutes et ce aux mêmes moments que les lots précédents.

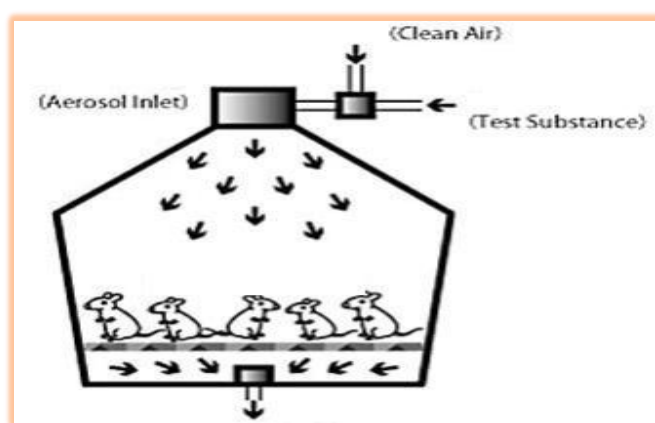


Figure 19 : Schéma montrant la provocation des animaux par l'aérosol.

5.3.4 - Préparation et administration d'extrait de tabac sans fumée :

Une forme commerciale de tabac sans fumée "El-Nardjass", produit par la société Ets El-Nardjass Company (zone 06, Sidi Chehmi-Oran, Algérie) a été utilisée. Le TSF a été dissous dans de l'eau distillée. La concentration létale DL50 de la nicotine chez le rat étant de 50 mg/kg de poids corporel (NIOSH, 1986), les concentrations de TSF utilisées correspondent à 80% de cette valeur, à savoir 40mg/kg de poids corporel (Adias et al., 2014).

Une quantité de 1 mL de la solution mère a été administrée par gavage une fois par jour pendant quinze (15) jours (Adias et al., 2014). Les rats des autres groupes ont reçu 1 mL d'eau distillée sauf les groupes NS. Les jours de provocation, TSF a été administré 30 minutes après l'exposition aux aérosols (Moerloose et al., 2005).

5.3.5 – Administration de l'huile de *Nigella sativa* :

L'huile de *Nigella sativa* a été obtenue auprès d'un marché commercial local (elle a été produite par la société Ets EL-BARAKA BPN° 302, Birkadem-Alger, Algérie). La société produit l'huile par pressage à froid de graines fraîches sans utiliser de produits chimiques.

L'huile a été administrée par voie orale (gavage) pendant 31 jours, à la dose de 4 mL/kg/jour (Balaha et al., 2012). Les rats des autres groupes ont reçu 1 mL d'eau distillée sauf les groupes TSF. Les jours de sensibilisation et de l'exposition à l'aérosol, l'huile de NS a été administrée 30 minutes avant le traitement.

5.4 - SACRIFICE ET PRELEVEMENT DES ORGANES :

Le sacrifice, par décapitation, a eu lieu au jour 27, soit 72 heures après la dernière inhalation d'ovalbumine.

5.4.1. Prélèvement sanguin :

Le sang est immédiatement recueilli dans deux types de tubes. Le premier, sec, destiné à une centrifugation à 3000 tours/min pendant 15 minutes ; le sérum recueilli servira pour les dosages des protéines totales et de l'IL-4 ; quant au culot érythrocytaire, il sera utilisé pour la préparation des lysats d'érythrocytes qui sont destinés pour le dosage des paramètres du stress oxydant. Le second tube, contenant un anticoagulant (EDTA), est destiné pour mesurer les paramètres hématologiques.

5.4.2 - Technique du lavage broncho-alvéolaire :

Grâce à la gaine d'un micro-perfuseur (Dispositif épicrânien avec tubulure en PVC) dont les dimensions sont les suivantes : 0,8 mm × 19 mm × 300 mm (« Sharp » lot 20070722. Industries Médico-Chirurgicales (IMC) Rouiba-Alger), la trachée a été canulée et le lavage broncho alvéolaire (LBA) a été effectué 3 fois avec à chaque fois 1 mL de la solution PBS (Oberholzer et Pretorius, 2009). Le liquide du LBA a été recueilli puis centrifugé à 1500 g pendant 5 min à 4°C. Une fois le surnageant récupéré et conservé pour les dosages des protéines totales et de l'IL-4, le culot cellulaire a été remis en suspension dans 1 mL de la solution PBS pour la numération cellulaire en utilisant un hémocytomètre (Full Automatic Blood Cell Counter MODEL PCE-210N).

5.4.3 - Prélèvement des organes :

Rapidement après le sacrifice, les animaux ont été disséqués pour le prélèvement des organes, en l'occurrence le foie, les reins et les poumons. Ces trois organes ont été subdivisés en deux : une première moitié est stockée dans le congélateur pour la préparation ultérieure de l'homogénat qui a servi au dosage des paramètres du stress oxydant. L'autre moitié est fixée dans une solution de formol à 10% afin de réaliser des coupes histologiques.

5.4.4 - Préparation des homogénats de tissus :

Un gramme de foie, de rein ou de poumon de rats récupérés à partir des huit lots étudiés, ont été broyés par un broyeur ultrason. Après homogénéisation des tissus dans 2 mL de solution tampon phosphate (TBS : Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) à 1:2 (P/V), et centrifugation

de la suspension cellulaire (3500 tours/min, 4°C, 35 min), le surnageant obtenu est aliquoté dans des tubes eppendorf puis conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

5.4.5 - Préparation des lysats d'érythrocytes

Le culot contenant les érythrocytes est lavé deux fois comme suit : un premier lavage est réalisé avec 2 mL de la solution de lyse des globules rouges [KH_2PO_4 (10 mM), NaCl (150 mM), pH = 7,4]. Après centrifugation à 3000 g pendant 15 minutes à 4°C, le culot est récupéré et lavé une seconde fois avec 2 mL de la même solution de lyse. Après agitation, puis centrifugation à 4000 g pendant 30 minutes à 4°C, le surnageant est enfin prêt à être utilisé.

5.5 - Dosage des paramètres biochimiques :

Tous les tests biochimiques ont été effectués dans des échantillons de plasma en utilisant ARCHITECT ci8200 Abbott Diagnostics Autoanalyzer.

5.5.1 - 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 et al., 1999).

- Mode opératoire :

Le réactif de travail est mélangé aux échantillons dans les proportions suivantes :

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (mL)	1.0	1.0	1.0
Etalon (µL)	--	25	--
Echantillon (µL)	--	--	25

Puis, les mélanges réactionnels sont mixés et incubés 5 min à 37 °C ou 10 min à la température ambiante (15-25°C). Les absorbances des échantillons et de l'étalon sont lues contre le blanc réactif à 540 nm. La coloration finale est stable au moins 30 minutes.

- Calcul de la concentration :

La concentration des protéines totales est calculée par la formule suivante :

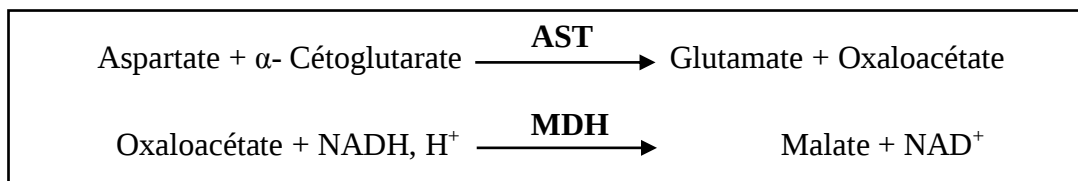
$$\text{Protéines totales (g/dL)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times \text{concentration de l'étalon (7 g/dL)}$$

5.5.2 - Dosage des transaminases plasmatiques :

a - Détermination de l'activité d'aspartate aminotransférase (EC 2.6.1.1) :

- Principe :

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



- **Réactif de travail** : Dissoudre un comprimé de R2 (voir annexe 7) dans un flacon de R1. Ce réactif est stable 21 jours à 2-8°C ou 72 heures à 15-25°C.

- Mode opératoire :

Le réactif de travail est mélangé aux échantillons dans les proportions suivantes :

Réactif de travail (mL)	1.0
Echantillon (µL)	100

Puis, les mélanges réactionnels sont mixés et incubés pendant une minute. L'absorbance initiale est lue à 340 nm. Le chronomètre est redémarré simultanément pour lire à nouveau les absorbances après 1, 2 et 3 minutes.

- Calcul de la concentration :

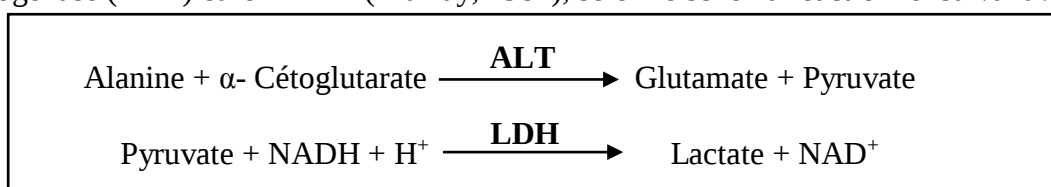
La concentration d'aspartate aminotransférase calculée par la formule suivante :

$\text{ASAT (U/L)} = \Delta\text{DO}/\text{min} \times 1750$
--

b - Détermination de l'activité d'alanine aminotransférase (EC 2.6.1.2) :

- Principe :

L'alanine aminotransférase (ALAT) appelée aussi glutamate pyruvate transaminase (TGP) catalyse le transfert réversible d'un groupe amine à partir de l'alanine au α -cétooglutarate formant le glutamate et le pyruvate. Le pyruvate produit est réduit en lactate par le lactate déshydrogénase (LDH) et le NADH (Murray, 1984), selon le schéma réactionnel suivant :



La diminution de la concentration en NADH est directement proportionnelle à l'activité enzymatique d'alanine aminotransférase dans l'échantillon (Murray, 1984).

- **Réactif de travail** : Dissoudre le contenant du R2 dans le flacon de R1. Ce réactif est stable 2 semaines à 2-8°C.

- **Mode opératoire** :

Le réactif de travail est mélangé aux échantillons dans les proportions suivantes :

Réactif de travail (mL)	1.0
Echantillon (µL)	100

Puis, les mélanges réactionnels sont mixés et incubés pendant une minute à température ambiante. L'absorbance initiale est lue à 340 nm, puis à nouveau après 1, 2 et 3 minutes. La moyenne des absorbances par minutes (Δ Abs/min) est alors déterminée pour l'utiliser dans les calculs.

- **Calcul de la concentration** :

La concentration d'alanine aminotransférase est calculée par la formule suivante :

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

5.3.3 - Dosage de la phosphatase alcaline plasmatique :

- **Principe** :

La phosphatase alcaline (PAL) catalyse l'hydrolyse de p-nitrophényl phosphate à pH 10.4 pour donner le p-nitrophénol et le phosphate (Wenger et al., 1984 ; Sabokbar et al., 1994), selon la réaction suivante :



La formation de p-nitrophénol est mesurée photométriquement, où elle est proportionnelle à l'activité catalytique de la phosphatase alcaline dans l'échantillon.

- **Réactif de travail** : dissoudre une tablette de réactif 2 (substrat) dans une bouteille du réactif 1 (tampon).

- Mode opératoire :

Le réactif de travail est mélangé aux échantillons dans les proportions suivantes :

Réactif de travail (mL)	1.2
Echantillon (µL)	20

Puis, les mélanges réactionnels sont mixés et incubés pendant une minute. L'absorbance initiale est lue à 405 nm, puis à nouveau après 1, 2 et 3 minutes.

La moyenne des absorbances par minute ($\Delta \text{ abs/min}$) est alors déterminée pour l'utiliser dans les calculs.

- Calcul de la concentration :

Pour estimer l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline, on utilise la formule suivante :

$$\text{Phosphatase alcaline (U/L)} = \Delta \text{ DO/min} \times 3300$$

5.3.4 - 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 (Doumas et al., 1971).

- Mode opératoire :

Réactifs	Blanc	Étalon	Échantillon
Réactif (mL)	1.0	1.0	1.0
Étalon (µL)	--	5	--
Échantillon (µL)	--	--	5
H₂O 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 :

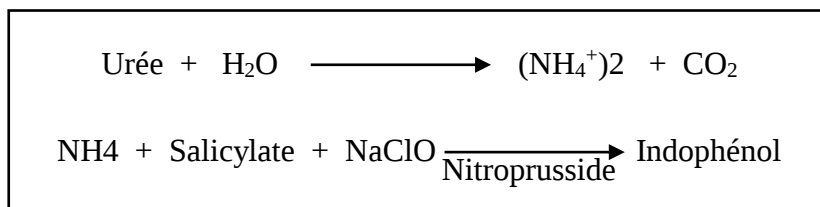
$$\text{Albumine (g/dL)} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO étalon}} \times \text{concentration de l'étalon (5 g/dL)}$$

5.3.5 - Dosage de l'urée plasmatique :

Le dosage de l'urée a été réalisé par la méthode cinétique enzymatique à l'uréase.

- Principe :

L'urée est hydrolysée enzymatiquement en ions d'ammoniac (NH_4^+) et dioxyde de carbone (CO_2). Les ions d'ammoniac formés réagissent avec le salicylate et l'hypochlorite (NaClO) en présence du catalyseur nitroprusside pour former l'indophénol vert (Kaplan, 1984), selon les réactions suivantes :



L'intensité de la coloration formée est proportionnelle à la concentration de l'urée dans l'échantillon.

- **Réactif du travail** : Dissoudre une tablette de réactif 3 (enzymes) dans une bouteille de réactif 1 (tampon) et mélanger légèrement. Le réactif 2 (NaClO) est préparé pour l'utiliser.

- Mode opératoire :

Le réactif de travail est mélangé aux échantillons dans les proportions suivantes :

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (mL)	1.0	1.0	1.0
Etalon (μL)	--	10	--
Echantillon (μL)	--	--	10

Puis, les mélanges réactionnels sont mixés et incubés 5 min à 37 °C ou 10 min à la température ambiante (15-25°C). Les absorbances des échantillons et de l'étalon sont lues contre le blanc réactif à 340 nm. La coloration finale est stable au moins 30 minutes.

- Calcul de la concentration :

La concentration de l'urée est calculée par la formule suivante :

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

5.3.6 - Dosage de la créatinine plasmatique :

- Principe :

L'essai est basé sur la réaction de la créatinine avec le picrate sodium : c'est la réaction de JAFFE. 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 de l'échantillon (Murray, 1984).

- **Réactif de travail** : mélanger un volume de réactif 1 avec un volume de réactif 2.

- **Mode opératoire** :

Le réactif de travail est mélangé aux échantillons selon les proportions suivantes :

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (mL)	1.0	1.0	1.0
Etalon (µL)	--	100	--
Echantillon (µL)	--	--	100

La lecture des densités optiques se fait à 492 nm : La densité optique (DO1) après 30 secondes et la densité optique (DO2) après 90 secondes.

- **Calcul de la concentration** :

La concentration de l'urée est calculée par la formule suivante :

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

$$\Delta \text{ DO} = (\text{DO 2} - \text{DO 1})$$

5.6 – Dosage des paramètres su stress oxydant :

5.6.1- Dosage des protéines :

- **Principe** :

Le dosage des protéines est déterminé selon la méthode de Bradford (1976), qui utilise le Bleu Brillant de Coomassie G250 comme réactif. Ce dernier, réagit avec les groupements amines (-NH) 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 à 595nm (à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible Jenway 6305).

- **Mode opératoire** :

Un volume de 5 mL de bleu brillant de Coomassie (G250) est ajouté à 0,1 ml de l'homogénat, après agitation, le mélange est laissé à température ambiante pendant 5 min pour la stabilisation de la couleur. L'absorbance de l'échantillon est mesurée à 595 nm 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 préalablement réalisée dans les mêmes

conditions, en utilisant une solution mère d'albumine bovine sérique (1mg/mL de BSA) comme standard (annexe 1).

5.6.2 - Détermination de la peroxydation lipidique par la mesure du taux du malondialdéhyde (MDA) au niveau tissulaire :

Le MDA est l'un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés médiée par les radicaux libres. Le niveau de peroxydation lipidique a été évalué en mesurant le malondialdéhyde avec le test TBARS (Thiobarbituric reactive species) selon la méthode de Buege et Aust (1978).

- Principe :

Le principe de ce dosage est basé sur la condensation de MDA en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbiturique. La réaction entraîne la formation d'un complexe, de couleur rose entre deux molécules d'acide thiobarbiturique, qui peut être donc mesuré par spectrophotométrie d'absorption à 530 nm (Figure 20).

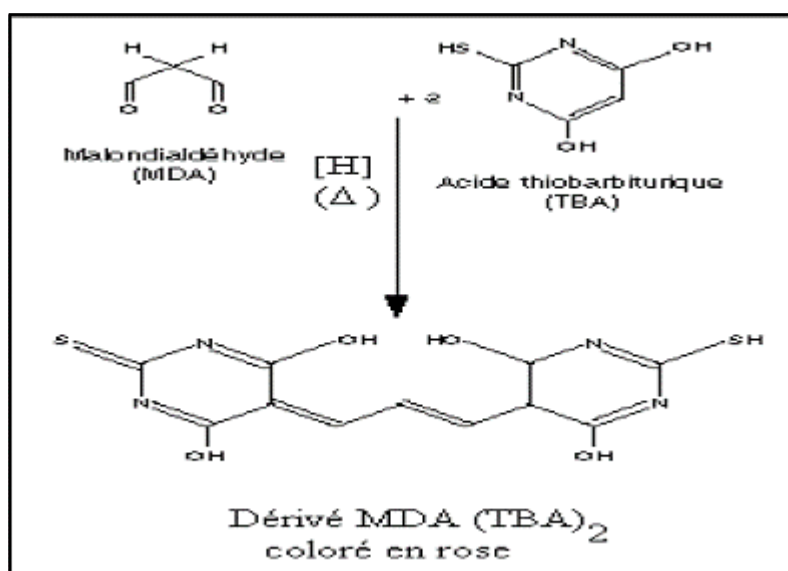


Figure 20 : Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique.

- Mode opératoire :

Un volume de 375 μ L de l'homogénat (surnageant) est ajouté à 150 μ L de la solution tampon TBS (Tris 50mM, NaCl 150mM pH 7.4) et 375 μ L de la solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%). Après agitation et centrifugation à 1000 tours/min pendant 10 min à 4°C, 400 μ L du surnageant sont prélevés et ajoutés à 80 μ L du HCl (0.6 M) et puis 320 μ L de la solution Tris-TBA (Tris 26 mM, TBA 120mM). Le milieu réactionnel est mélangé et incubé au bain

marie à une température de 80°C pendant 10 min. Enfin, les densités optiques sont mesurées à 530 nm contre le blanc réactif.

- Calcul de la concentration :

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

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

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).

F_d : Facteur de dilution : $F_d = 0.2083$.

5.6.3 - Détermination du taux des protéines carbonylées :

La mesure des protéines carbonyles à la suite de leur réaction covalente avec DNPH a été initiée par Levine et al. (1990) et est devenue la mesure la plus largement utilisée de l'oxydation des protéines dans plusieurs maladies humaines.

- Principe :

Les protéines carbonylées (marqueurs de l'oxydation protéique) sont donc mesurées selon la méthode de Levine et al. (1990), qui se base sur la dérivation du groupe carbonyle avec la 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH), ce qui conduit à la formation d'un produit 2,4-dinitrophényl (DNP) hydrazone stable (figure 21).

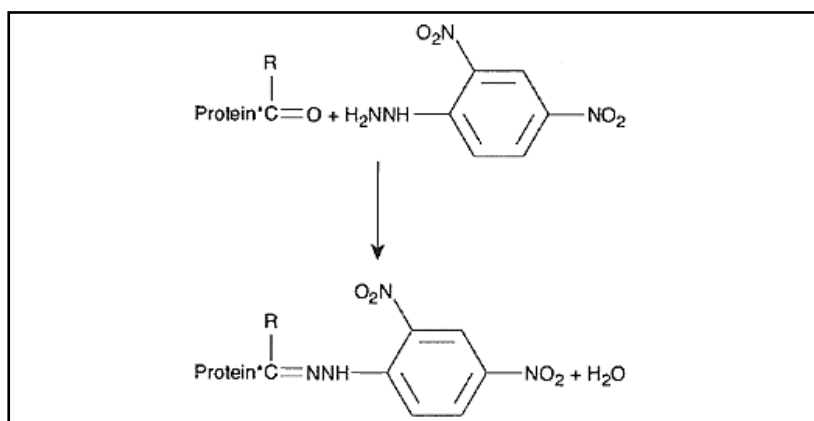


Figure 21 : Réaction entre les protéines carbonylées et le DNPH.

- Mode opératoire :

L'échantillon (le plasma ou le lysat érythrocytaire ou l'homogénat d'organes) est incubé 1h à température ambiante en présence de la dinitrophénylhydrazine (DNPH). Les protéines sont, par la suite, précipitées avec l'acide trichloroacétique (TCA) et lavées par l'éthanol : Acétate d'éthyle 1:1 (v/v) et par le TCA. Le culot est solubilisé dans la guanidine 6 M. L'absorbance de la solution est mesurée au spectrophotomètre à 370nm.

- Calcul de la concentration :

La concentration des groupements carbonylés exprimée en micromoles par milligramme de protéines ($\mu\text{mol}/\text{mg prot.}$) selon la formule suivante :

$$\text{Protéines carbonylées } (\mu\text{mol}/\text{mg prot.}) = \frac{\text{DO}}{\epsilon \times L \times X} \times 10^6 \times F_d$$

DO : Densité optique lue à 370 nm.

ϵ : Coefficient d'extinction molaire de DNPH = $2.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

L : Longueur du trajet optique = 0.779 cm.

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

F_d : Facteur de dilution.

5.6.4 - Détermination du taux de glutathion réduit :

- Principe :

Le dosage du glutathion réduit (GSH) est réalisé selon la méthode d'Ellman (1959), avec quelques modifications apportées par Jollow et al., (1974). La réaction consiste à couper la molécule d'acide 5,5' dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par le GSH, ce qui libère l'acide thionitrobenzoïque (TNB) (figure 22) lequel présente une absorbance à 412nm.

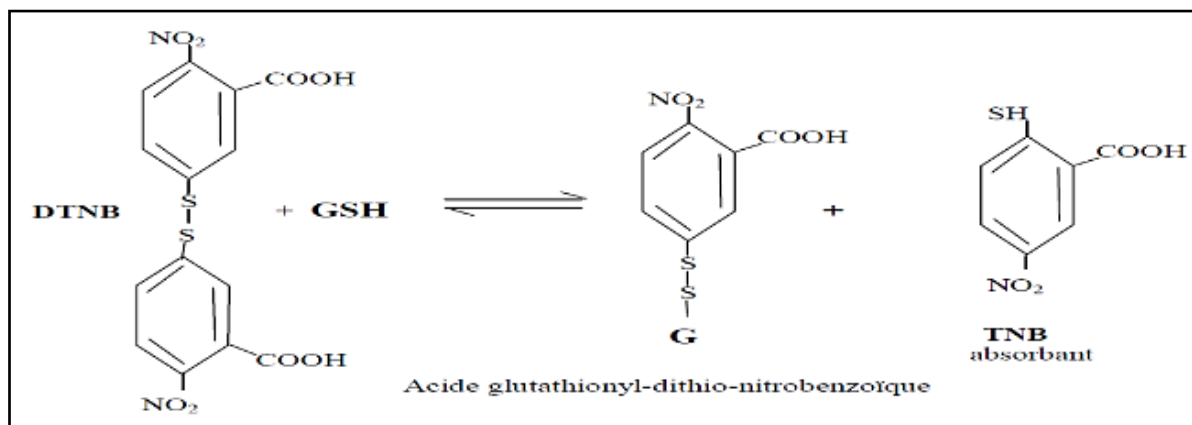


Figure 22 : Principe de dosage du glutathion.

- Mode opératoire :

Un volume de 0.8 mL de l'homogénat est ajouté à 0.2 mL de la solution d'acide sulfosalicylique (0.25%) et laissé pendant 15 min dans un bain de glace. Après centrifugation à 1000 tours/min pendant 15 min, 0.5 mL du surnageant sont prélevés et ajoutés à 1ml du tampon Tris-EDTA (contenant 0,02M d'EDTA, pH 9.6) et 0.025 mL de l'acide 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) à 0.01 M. Après agitation et incubation pendant 5 min à une température ambiante, les densités optiques sont mesurées à 412nm contre le blanc réactif.

- Calcul de la concentration :

On calcule la concentration du GSH exprimée en micromoles par milligramme de protéines ($\mu\text{mol}/\text{mg prot.}$) selon la formule suivante :

$$\text{GSH } (\mu\text{mol}/\text{mg protéines}) = \frac{\text{DO} \times \text{L} \times 1,525}{13,1 \times 0,8 \times 0,5 \times \text{mg prot}}$$

5.6.5 - Dosage des thiols non-protéiques :

- Principe :

Le dosage des thiols non-protéiques (NPSH) est réalisé selon la méthode d'Ellman (1959), qui est basée sur la réduction de 5,5'-Dithio-bis (2-nitrobenzoic acid), connu en DTNB ou réactif d'Ellman, par les groupements thiols (SH) en une mole de 2-nitro-5-mercaptobenzoic acide par mole de SH (figure 23).

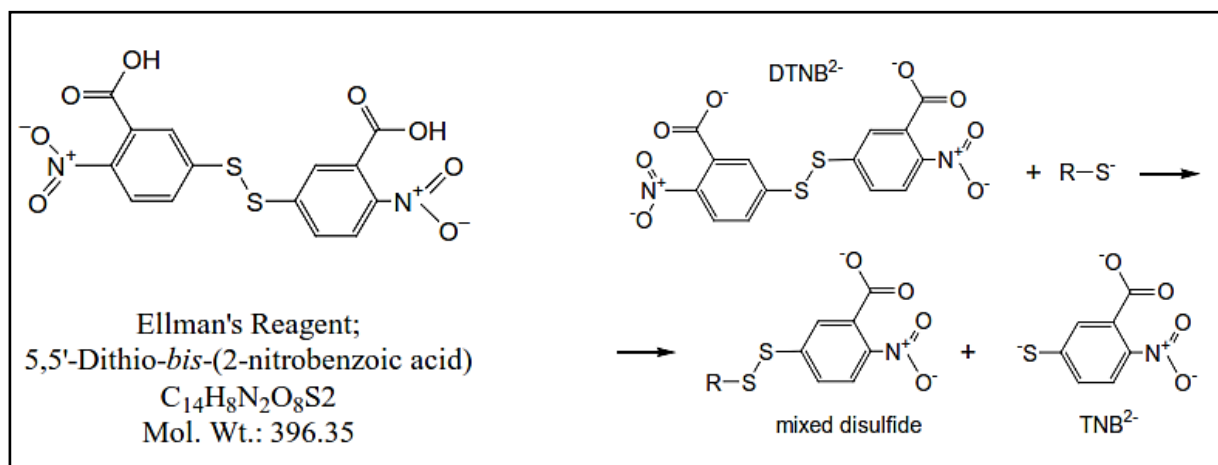


Figure 23 : Réduction du réactif d'Ellman.

- Mode opératoire :

Un volume de 250 μL de l'échantillon est ajouté à 50 μL de solution de réactif d'Ellman (DNTP 2 mM/ phosphate de sodium 0,1 M, pH 8,0, avec 1 mM d'EDTA) et 2,5 mL de tampon de réaction. Comme un blanc, 250 μL de tampon de réaction sont ajoutés au lieu de

l'échantillon. Après agitation et incubation à température ambiante pendant 15 minutes, l'absorbance est mesurée à 412 nm.

- Calcul de la concentration :

On calcule la concentration des thiols non-protéiques exprimée en micromoles par milligramme de protéines ($\mu\text{mol}/\text{mg prot.}$) selon la formule suivante :

$$\text{NPSH } (\mu\text{mol}/\text{mg prot.}) = \frac{\text{DO}}{\epsilon \times L \times X}$$

DO : Densité optique lue à 412 nm.

ϵ : Coefficient d'extinction molaire de TNB = $14,150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

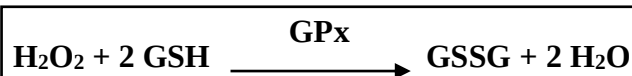
L : Longueur du trajet optique = 0.779 cm.

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

5.6.6 - Détermination de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (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 :

Un volume de 0.2 mL de l'homogénat est ajouté à 0.4 mL de GSH (0.1mM) et 0.2 mL de la solution tampon TBS (Tris 50mM, NaCl 150mM pH 7.4). Après incubation au bain marie à 25°C, pendant 5 min, 0.2 mL de H_2O_2 (1.3 mM) sont ajoutés pour initier la réaction et laissés agir pendant 10min. Ensuite, 1ml de TCA (1%) sont ajoutés pour arrêter la réaction et laissés pendant 30 min dans un bain de glace. Après centrifugation à 3000 tours/min durant 10 min, 0.48 mL du surnageant sont ajoutés à 2.2 mL de la solution tampon TBS (Tris 50mM, NaCl 150mM pH 7.4) et 0.32 mL de DTNB (1.0mM), mélangés et après 5 minutes les densités optiques sont mesurées à 412 nm.

- Calcul de l'activité enzymatique :

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

$$\text{GPx (nmol/mg prot.)} = \frac{(\text{DO échantillon} - \text{DO étalon}) \times 0,04}{\text{DO étalon}} \times \frac{5}{\text{mg prot.}}$$

DO : Densité optique lue à 412 nm.

0.04 : Concentration de substrat (GSH).

5.6.7 - Dosage de l'activité de la superoxyde dismutase (E.C.1.15.1.1) :

L'activité de la superoxyde dismutase (SOD) est déterminée à partir de sa capacité à inhiber la réduction du nitro blue tetrazolium (NBT). Ainsi le milieu réactionnel contient une molécule photosensibilisatrice (la riboflavine) ainsi que le NBT, molécule capable d'être réduite par O_2^- généré par la riboflavine.

L'éclairage intense du milieu réactionnel induit l'oxydation de cette dernière qui cède un électron au dioxygène pour former un anion superoxyde qui interagit avec le NBT. Ce dernier incolore forme alors le bleu de formaseu (Beyer et Fridovich, 1987).

- Mode opératoire :

Un volume de 1mL d'EDTA (0.1mM)/Méthionine (13 mM), 1830 μL de Tampon phosphate (pH 7,8), 85 μL de NBT (75 μM) et 22 μL de riboflavine (2 μM) sont mélangés dans un volume final d'environ 3 mL (tube Blanc). A ce même milieu réactionnel sont additionnés 50 μL d'homogénat ou de surnageant (tube Echantillon). Ces deux tubes sont incubés à moins de 20 cm d'un tube néon pendant 20 minutes à température ambiante avant la lecture des absorbances à 560 nm contre un blanc stocké à l'obscurité.

- Calcul 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 :

L'activité SOD = % d'inhibition /mg de protéine.

$$Y = \frac{(\text{DO B} - \text{DO E})}{\text{DO B}} \times 100 \times \frac{20}{\text{mg prot.}} \times \text{Facteur de dilution}$$

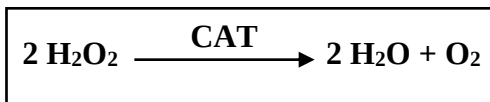
Activité spécifique SOD = Y/50 unité de SOD/mg de protéine.

5.6.8 - Dosage de l'activité enzymatique de la catalase (E.C.1.11.1.6) :

- Principe :

Les catalases sont présentes dans un grand nombre de tissus. Ce sont des enzymes tétramériques, où chaque unité porte une molécule d'hème et une molécule de NADPH. Ces enzymes interviennent dans la défense de la cellule contre le stress oxydant en éliminant les espèces réactives et en accélérant la réaction spontanée de l'hydrolyse du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) toxique pour la cellule en eau et en oxygène (Aebi, 1984).

La réaction se fait en deux étapes. La réaction bilan est :



L'activité de la CAT est mesurée à 240nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible suite à la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

- Mode opératoire :

L'activité de la catalase (CAT) est mesurée à 240 nm par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en faisant réagir dans 780 μL de tampon phosphate (100 mM) (pendant 1 minute à pH 7.4) 200 μL de H_2O_2 (500 mM) sur 20 μL d'homogénat ou de lysat, à une température de 25°C. Les résultats sont exprimés en μmoles de H_2O_2 par minute et par mg de protéines.

La quantité de surnageant est déterminée en fonction de la quantité de protéine qui doit être comprise entre 1 et 1,5 mg/mL, soit une quantité de 10 à 20 μL de surnageant dilué. Ensuite, la lecture de l'absorption à 240 nm se fait après 15 secondes de délais et du durant 60 secondes de mesure.

- Calcul de l'activité enzymatique :

L'activité enzymatique de la catalase est exprimée en micromoles de H_2O_2 par minute par milligramme de protéines ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg prot}$) selon la formule suivante :

$$\text{Catalase } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg protéines}) = \frac{\Delta\text{DO}/\text{min}}{\epsilon \times L \times \text{mg prot}}$$

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

L : Trajet optique de la cuve = 1 cm.

5.7 - Dosage ELISA de l'interleukine-4 :

Le dosage de l'interleukine-4 (IL-4), au niveau du sérum et du liquide du LBA, est réalisé par la méthode ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) sandwich en phase solide, grâce au kit Invitrogen Rat Interleukin-4 (Invitrogen REF : KRC0041 ; Lot : 1260054A1). Un anticorps monoclonal spécifique pour l'IL-4 de rat produit et purifié à partir d'ascites de souris par le fabricant a été prédéposé sur les puits des barrettes fournies. La fixation de l'IL-4 dans les puits est révélée par des anticorps marqués à la biotine qui, par la suite, vont se lier au complexe streptavidine-peroxydase (peroxydase de raifort ou HRP, de l'anglais HorseRadish Peroxidase). La révélation est réalisée grâce au substrat de la peroxydase, le TétraméthylBenzidine (TMB) qui se colore en bleu en présence de l'enzyme. L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration d'IL-4 à doser (Figure 24).

- Mode opératoire :

La réaction ELISA sandwich se réalise en trois temps. Huit puits de la plaque serviront pour la réalisation de la courbe du standard à différentes concentrations (500 ; 250 ; 125 ; 62,5 ; 31,2 ; 15,6 ; 7,8 et 0 pg/mL).

Dans le 1^{er} temps, 100 µL du Tampon diluant standard ainsi que 100 µL de chaque échantillon (sérum/LBA) sont ajoutés dans tous les puits de la plaque (sauf le puits réservé au chromogène). Par la suite, 50 µL de la solution de l'anticorps anti-IL-4 conjugué à la biotine ont été déposés dans l'ensemble des puits sauf celui du témoin négatif. Après homogénéisation, la plaque est incubée pendant 2 heures à température ambiante ; puis, lavée quatre fois par la solution de lavage.

Dans le 2^{ème} temps, on ajoute 100 µL de solution de Streptavidin-HRP dans chaque puits (à l'exception du puits chromogène). Après homogénéisation, la plaque est incubée pendant 30 minutes à température ambiante ; puis, lavée quatre fois par la solution de lavage.

Enfin, dans le 3^{ème} temps, on ajoute 50 µL du chromogène stabilisé dans tous les puits. Le mélange commencera à virer au bleu, et la plaque est alors incubée pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité.

Pour finir, 100 µL de la solution d'arrêt ont été ajoutés dans tous les puits. L'ajout de cette solution dans les puits va faire changer la coloration du bleu en jaune, et la lecture de l'absorbance est alors réalisée à 450 nm (Lecteur Mindray MR-96A). L'intensité de la couleur est directement proportionnelle à la concentration de l'IL-4 qui est déterminée par comparaison à la gamme étalon du standard et exprimée en pg/mL.

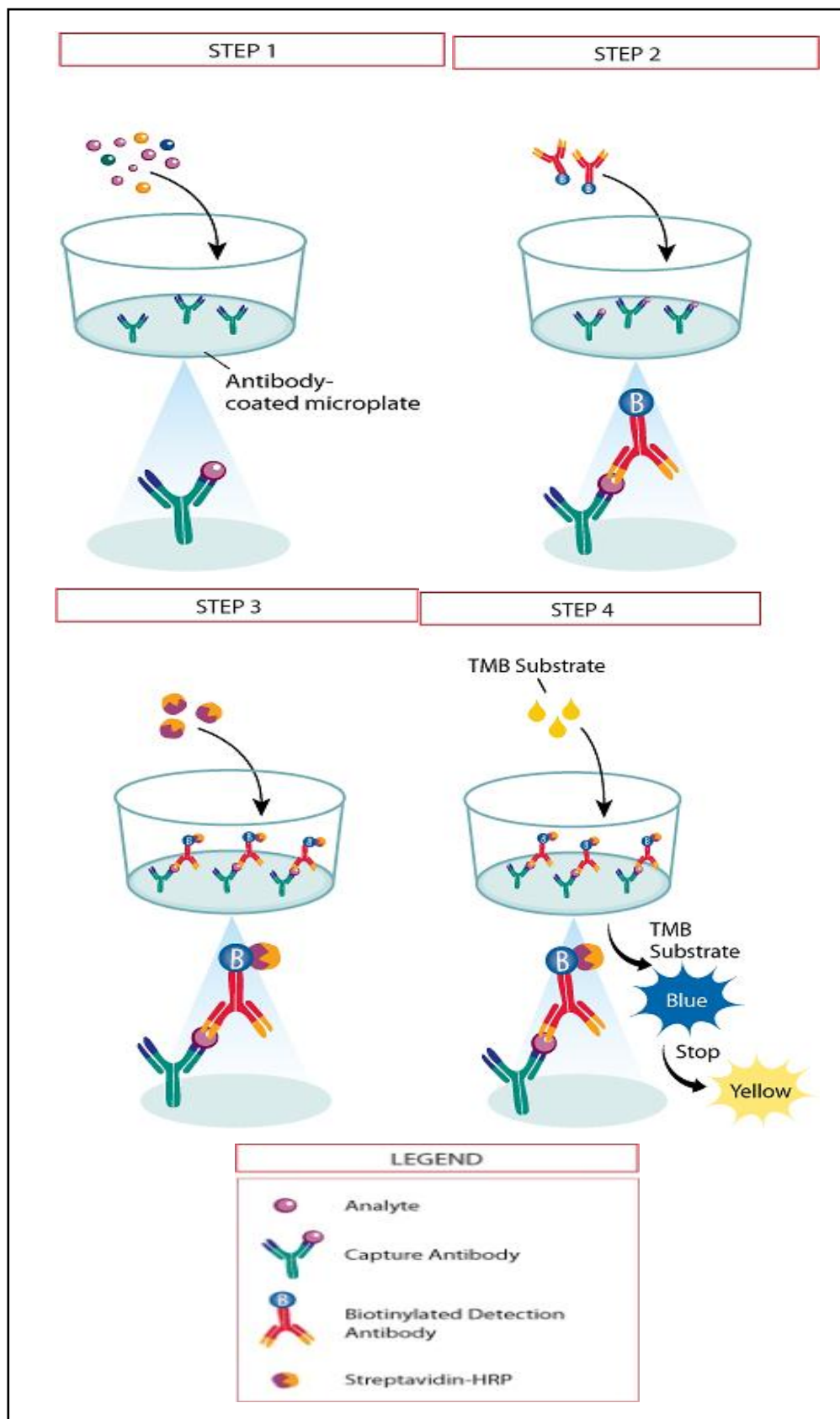


Figure 24 : Schéma du principe de la technique ELISA sandwich utilisée.

5.8 – Dosage de l'oxyde nitrique :

- Principe :

La détection colorimétrique des NO_2^- par les réactifs de Griess (1879) est la méthode de mesure la plus simple et, pour cette raison, la plus utilisée. Cette réaction dite de diazotation se réalise en deux étapes. Le N_2O_3 généré par l'acidification du NO_2^- est un dérivé du $\text{NO}\cdot$ ayant un grand potentiel nitrosant. Il réagit avec la sulfanilamide pour produire un ion diazonium qui permet le couplage au N-(1-naphtyl) éthylènediamine dihydrochlorure (NEDD), comme l'illustre la figure 25. Le produit azo ainsi formé est un chromophore stable qui absorbe fortement à 543 nm. L'absorbance est donc linéairement proportionnelle à la quantité de NO l'échantillon (Oswald et al., 1992).

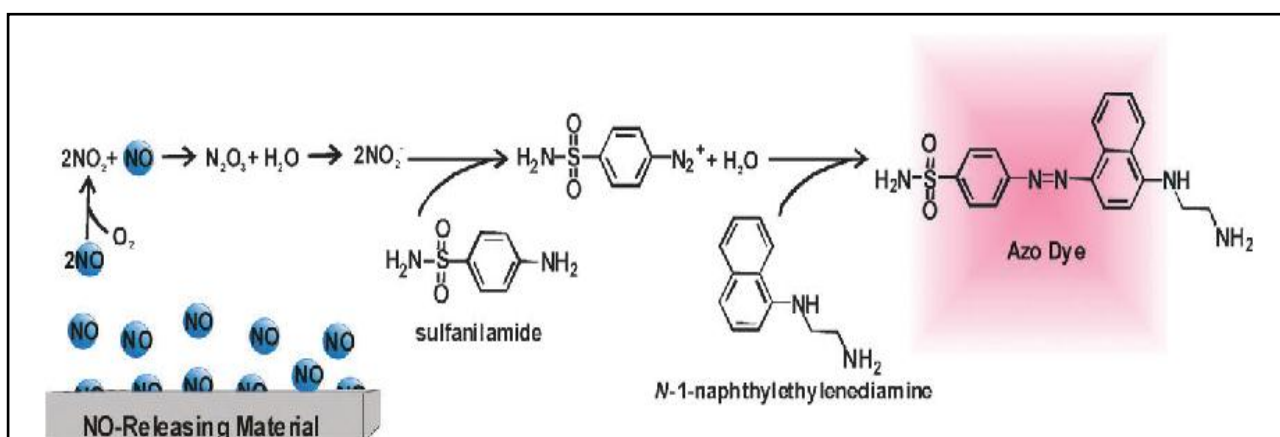


Figure 25 : Détection des NO_2^- par les réactifs de Griess.

- Mode opératoire :

Dans une microplaque (capacité de l'échantillon d'au moins 300 μL par puits), et dans chaque puits, 100 μL de l'échantillon sont mélangés avec 50 μL de réactif Griess A et 50 μL de réactif Griess B (annexe 17). Après incubation à l'obscurité pour 20 minutes dans une température ambiante, l'absorbance des échantillons contenant du nitrite par rapport à l'échantillon de référence est mesurée dans un lecteur de microplaques (Mindray MR-96A). La densité optique obtenue est rapportée sur la courbe d'étalonnage préalablement réalisée dans les mêmes conditions, en utilisant le nitrite de sodium (NaNO_2) comme standard (annexe 2).

5.9 - Etude histologique :

Elle a été réalisée à l'hôpital Ibn Rochd d'Annaba, Service d'anatomie pathologique. La technique utilisée est celle décrite par Hould (1984). Elle comporte les étapes suivantes :

5.9.1 - Fixation :

La fixation des échantillons (foie, rein et poumon) a été faite dans une solution de formol à 10%. Les prélèvements réalisés sont mis dans des cassettes spéciales à parois retournées afin de permettre le passage des liquides.

5.9.2 - Enrobage et obtention des blocs :

La réalisation de coupes fines et régulières nécessite l'inclusion des échantillons dans un bloc de paraffine, comme suit :

- **Déshydratation** : Les échantillons sont déshydratés dans un automate (Leica TP1020) qui permet leurs passages automatiques et progressifs dans des bains d'alcools pendant 24h : un bain de formol et six bains d'éthanol.
- **Eclaircissement** : L'éthanol est remplacé par un solvant miscible à la paraffine. Il s'agit du xylène qui élimine l'éthanol et clarifie les tissus (trois bains de 30 minutes chacun).
- **Inclusion** : Les tissus sont tout d'abords maintenus et imbibés dans des bains de paraffine liquide (portée à 56/58°C). Ensuite, le tissu imprégné est enrobé par inclusion dans un bloc de paraffine fondue (Leica EG1160).

5.9.3 - Confection des coupes :

La réalisation des coupes minces de quelques microns (5µm en moyenne) est possible grâce à un microtome (Leica RM2125RT). Ces dernières sont étalées sur des lames porte-objet, dépliées et fixées par l'utilisation d'une eau gélatineuse chauffée.

5.9.4 - Coloration et montage :

La technique à l'hématoxyline-Eosine (Hématéine-Eosine) a été utilisée par un automate (Leica ST4040) en suivant les étapes suivantes :

Le déparaffinage et l'hydratation des lames sont effectués par l'eau du robinet, suivie par un rinçage à l'eau distillée. La coloration en bleu violacée des basophiles (noyaux) est obtenue après incubation des lames dans un bain d'hématoxyline de Harris pendant 15 minutes. Ensuite, les coupes sont immergées dans l'alcool acide (1 à 2 plongées) afin de les différencier. Un rinçage avec un bain d'eau est effectué et l'observation par le microscope permet la vérification de la différenciation des lames.

Le bleuissement des lames dans un bain d'eau ammoniacale et l'immersion dans un bain d'éosine (10 minutes) qui colore en rose les structures acidophiles (cytoplasme). Tous ces bains sont séparés par des rinçages à l'eau.

Les préparations ont ensuite été montées par EUKITT (kindler GmbH et Co, lot n°: c70), séchées puis observées au microscope optique (LEICA DM-750) et photographiées par un appareil photo numérique (Canon Elph shot-305).

5.9 - Traitement statistique :

Tous les résultats des tests effectués sont exprimés, selon les paramètres classiques utilisés en biométrie, en moyenne $\pm$ SEM pour les six rats de chaque groupe. Ces calculs ont été effectués à l'aide du logiciel Microsoft Excel (2016). Les comparaisons de données entre les différents groupes traités ont été effectuées par le test one-way ANOVA en utilisant le logiciel XLSTAT, suivi par le test "t" de student et les différences ont été considérées comme statistiquement significatives à $p < 0,05$.

CHAPITRE 6 : RESULTATS ET DISCUSSION

1- Variation du poids corporel :

Tout au long du protocole expérimental, les rats ont été pesés un jour sur deux. Ceci nous a permis de calculer l'évolution du poids corporel dans les différents lots (tableau 7).

Ainsi, nos résultats montrent une diminution très hautement significative du gain de poids corporel chez les trois lots traités par *Nigella sativa* : NS seule (- 29,13%), par la combinaison TSF/NS (- 28,61%) et par Ova/TSF/NS (- 34,40%), et ce comparativement au lot témoin.

Tout comme, on enregistre une diminution significative du gain de poids corporel chez le lot traité par la combinaison Ova/NS (- 28,61%), comparativement au lot témoin (T).

Tandis qu'on note une diminution hautement significative et même significative du gain de poids corporel chez les lots traités par la combinaison Ova/TSF/NS et Ova/NS respectivement, comparativement au lot sensibilisé par l'ovalbumine (Ova).

Aussi, on constate une diminution significative du gain de poids corporel chez les lots traités par la combinaison : TSF/NS et Ova/TSF/NS comparativement au lot traité par le TSF.

2 - Variation de la consommation quotidienne d'aliment et de l'eau de boisson :

Les résultats obtenus pour le suivi de la consommation quotidienne d'aliment et de l'eau de boisson chez les rats témoins et les rats traités après 31 jours d'expérimentation sont représentés dans le tableau 8. En effet, on note une diminution très hautement de la consommation d'aliments chez tous les lots traités par Ns comparativement au lot témoin.

Ainsi, on enregistre une augmentation significative de la consommation d'aliments chez le lot traité par le TSF comparativement au lot témoin. Egalement, l'administration de Ns entraîne une diminution très hautement significative de la consommation de l'eau chez les lots Ns, Ova/Ns et TSF/Ns comparativement au lot témoin. Aussi, on note une diminution significative et hautement significative de la consommation de l'eau chez les lots TSF et Ova/TSF/Ns respectivement, comparativement au groupe témoin.

3- Poids absolu et relatif de certains organes :

Nous avons suivi l'évolution des poids absolu (PA) et relatif (PR) des organes suivants : le foie, les poumons et les reins (tableau 9).

Les résultats obtenus montrent une diminution significative et même hautement significative du poids relatif du foie chez les rats traités par la combinaison Ova/TSF comparativement avec les rats sensibilisés par l'ovalbumine (Ova) et traités par le tabac (TSF), respectivement.

Tableau 7 : Variation de poids corporel (g) chez les rats témoins et traités.

Paramètres	Lots expérimentaux							
	Témoin	Ova	TSF	NS	Ova/TSF	Ova/NS	TSF/NS	Ova/TSF/NS
Poids initial	155,50 ± 07,86	162,33 ± 20,04	163,16 ± 11,65	156,66 ± 18,55	169,00 ± 18,98	154,60 ± 20,11	147,42 ± 20,98	164,60 ± 15,86
Poids final	250,66 ± 11,29	259,83 ± 18,03	250,83 ± 11,77	226,16 ± 13,84	261,66 ± 21,51	229,20 ± 22,76	216,42 ± 17,10	228,00 ± 12,92
Gains de poids	+96,66 ± 10,13	+96,16 ± 17,08	+87,33 ± 19,66	+ 68,50 ± 12,75 (***)	+ 92 ± 13,06	+ 74,60 ± 21,19 (*) (#)	+69 ± 14,85 (***) (+)	+ 63,40 ± 13,27 (***) (§§)
%	--	- 00,51	- 09,65	- 29,13	- 4,82	- 22,82	- 28,61	- 34,40

* p ≤0.05 ; *** p ≤0,001 comparativement aux rats témoins ;

p ≤0.05 ; # # p ≤0,01 comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine ;

+ p ≤0.05 comparativement aux rats traités par le tabac.

§ § p ≤0,01 comparativement aux rats traités par la combinaison : ovalbumine / tabac.

Tableau 8 : Consommation quotidienne de l'aliment (g/jour/rat) et de l'eau de boisson (ml/jour/rat) chez les rats témoins et traités.

Paramètres	Lots expérimentaux							
	Témoin	Ova	TSF	N.s	Ova/TSF	Ova/N.s	TSF/N.s	Ova/TSF/N.s
Consommation d'aliment	19,62 ± 1,36	19,71 ± 1,83	19,05 ± 1,03 (*)	16,70 ± 1,41 (***)	20,29 ± 1,95 (+++)	16,13 ± 2,35 (***) (# # #)	15,60 ± 1,41 (***) (+++)	17,51 ± 2,14 (***) (# # #) (+++) (§§§)
Consommation d'eau de boisson	33,52 ± 3,42	34,12 ± 3,91	31,32 ± 4,05 (**)	26,92 ± 3,30 (***)	34,29 ± 4,80 (++)	28,36 ± 4,83 (***) (# # #)	27,60 ± 2,51 (***) (+++)	37,21 ± 10,49 (*) (+++)

* p ≤0.05 ; ** p ≤0,01 ; *** p ≤0,001 comparativement aux rats témoins ;

p ≤0.05 ; # # p ≤0,01 ; # # # p ≤0,001 comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine ;

+ p ≤0.05 ; + + p ≤0,01 ; + + + p ≤0,001 comparativement aux rats traités par le tabac.

§§§ p ≤0,001 comparativement aux rats traités par la combinaison : ovalbumine / tabac.

Tandis qu'on enregistre une nette amélioration du poids relatif du foie dans le lot OVA/TSF ayant reçu *Nigella sativa*, comparativement au lot Ova/TSF.

Concernant le poids relatif des poumons, l'analyse des résultats obtenus montre une diminution significative chez le lot traité par la combinaison Ova/TSF par rapport au lot traité par le tabac. Par contre, on enregistre une augmentation hautement significative chez le lot traité par la combinaison Ova/TSF/NS comparativement aux lots traités par l'ovalbumine et la combinaison : Ova/TSF (tableau 9).

Quant au poids relatif des reins, comparativement aux rats témoins, on note une diminution significative chez les lots traités par la combinaison Ova/TSF et Ova/TSF/NS, et une diminution hautement et même très hautement significative chez les lots traités par l'Ova et la combinaison Ova/NS respectivement. Par contre, on note une augmentation hautement significative du poids relatif des reins chez le lot traité par la combinaison Ova/TSF/NS comparativement avec celui qui a été sensibilisé par l'Ova.

Enfin, on enregistre aussi une diminution significative chez le lot traité par la combinaison Ova/TSF et Ova/TSF/NS comparativement avec le lot traité par le tabac (tableau 9).

Tableau 9 : Variation du poids absolu (PA) (g) et du poids relatif (PR) (g/100g du poids corporel)
des organes prélevés chez les rats témoins et traités.

Paramètres	Lots expérimentaux							
	Témoin	Ova	TSF	N.s	Ova/TSF	Ova/N.s	TSF/N.s	Ova/TSF/N.s
PA du foie	9,67 ± 1,30	9,79 ± 0,77	9,81 ± 0,69	9,26 ± 0,35	9,31 ± 0,88	8,82 ± 0,97 ^(#)	8,51 ± 0,83 ^{(*) (++)}	8,87 ± 0,48 ^{(#) (++)}
%	--	+ 01,24	+ 01,44	- 04,23	- 04,55	- 08,79	- 11,99	- 08,27
PR du foie	3,87 ± 0,66	3,77 ± 0,15	3,90 ± 0,15	4,11 ± 0,38	3,55 ± 0,21 ^{(#) (++)}	3,84 ± 0,05	3,93 ± 0,22	3,89 ± 0,18 ^(§ §)
%	--	- 02, 81	+ 00,77	+ 06,10	- 08,27	- 00,82	+ 01,44	+ 00,41
PA des poumons	2,03 ± 0,53	1,86 ± 0,36	2,24 ± 0,37	2,04 ± 0,52	1,87 ± 0,37 ⁽⁺⁾	1,68 ± 0,25	2,22 ± 0,58	2,27 ± 0,34 ^{(#) (§)}
%	--	- 07,88	+ 10,34	+ 00,49	- 07,88	- 17,24	+ 09,36	+ 11,82
PR des poumons	0,81 ± 0,23	0,72 ± 0,17	0,89 ± 0,15	0,90 ± 0,24	0,71 ± 0,14 ⁽⁺⁾	0,73 ± 0,04	1,02 ± 0,23	0,99 ± 0,10 ^{(# #) (§ §)}
%	--	- 11,53	+ 09,93	+ 11,41	- 12,02	- 10,06	+ 25,03	+ 21,84
PA des reins	1,63 ± 0,14	1,42 ± 0,14 ^(**)	1,61 ± 0,16	01,40 ± 0,17 ^(**)	1,51 ± 0,20	1,21 ± 0,10 ^{(***) (# #)}	1,36 ± 0,11 ^{(***) (++)}	1,35 ± 0,11 ^{(***) (++)}
%	--	- 12,88	- 01,22	- 14,11	- 07,36	- 25,76	- 16,56	- 17,17
PR des reins	0,65 ± 0,06	0,54 ± 0,03 ^(**)	0,64 ± 0,05	0,63 ± 0,08	0,57 ± 0,05 ^{(*) (+)}	0,53 ± 0,01 ^(***)	0,62 ± 0,03	0,59 ± 0,01 ^{(*) (# #) (+)}
%	--	- 16,05	- 01,68	- 02,29	- 11,92	- 18,96	- 03,97	- 09,63

* p ≤ 0.05 ; ** p ≤ 0,01 ; *** p ≤ 0,001 comparativement aux rats témoins ;

p ≤ 0.05 ; # # p ≤ 0,01 comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine ;

+ p ≤ 0.05 ; + + p ≤ 0,01 comparativement aux rats traités par le tabac ;

§ § p ≤ 0.05 ; § § p ≤ 0,01 comparativement aux rats traités par la combinaison : ovalbumine / tabac.

Discussion :

Au cours de notre travail de thèse, on rappelle que nous nous sommes attelés à déclencher un asthme expérimental chez le rat wistar afin d'évaluer dans un premier temps les effets de l'extrait de tabac sans fumée. En effet, beaucoup de travaux ont été réalisés dans les mêmes conditions afin d'étudier les effets du tabac à fumer, seulement aucune étude, à notre connaissance, n'a testé le tabac sans fumée sur un terrain d'asthme allergique. Pourtant, nous avons, dans le chapitre 2, évoqué l'importance de la consommation de cette forme de tabac (tout aussi toxique) à travers le monde mais aussi d'une façon alarmante en Algérie. De plus, Annaba est une ville côtière, humide et comporte une population à forte prédisposition pour l'asthme allergique (Meharzi et al., 2017). Ceci, nous a donc poussé à entreprendre des investigations combinant consommation de tabac sans fumée et pathologie d'asthme allergique.

Ainsi, comme dans toute expérimentation animale, nous avons mesuré, tout au long de notre protocole, le poids de l'animal, ainsi que le poids relatif des organes clés. D'ailleurs, la réduction de poids corporel est généralement utilisée comme indicateur de la détérioration de l'état de santé générale du rat (Djeffal et al., 2012). Ainsi, l'administration du tabac chez les rats a provoqué une légère diminution (09,65%) du gain de poids corporel par rapport au lot témoin (tableau 7). Ceci pourrait être expliqué par la diminution des prises quotidiennes en aliment. En effet, dans notre étude expérimentale, le tabac a induit une diminution significative et hautement significative de la consommation quotidienne en aliment et en eau de boisson respectivement par les rats (tableau 8).

Par ailleurs, la nicotine, étant l'alcaloïde prédominant dans la plante du tabac, représentant 90 à 95% de la teneur en alcaloïdes, selon Siminszky et al (2005), est probablement un élément clé modifiant le régime et peut avoir agi en tant que suppresseur d'appétit, tel qu'il a été rapporté dans la littérature (Liu et al 2018).

Concernant le poids des organes, nous remarquons une légère diminution du poids relatif du foie et des poumons (- 02,81% et - 11,53% respectivement) chez le lot sensibilisé comparativement au lot témoin (tableau 9). Ainsi, chez le même lot, on note une diminution hautement significative du poids relatif des reins, toujours comparativement au lot témoin (tableau 9). Ceci est dû aux altérations structurales résultantes du désordre inflammatoire provoqué par l'ovalbumine, en tant qu'allergène (Kandhare et al., 2013) (voir aussi plus loin, l'étude histologique).

L'administration du tabac chez les rats n'a provoqué aucune différence significative concernant le poids relatif des trois organes étudiés par rapport aux rats témoins. Par contre, la

combinaison Ova/TSF provoque chez les rats une diminution significative du poids relatif des reins comparativement au lot témoin (tableau 9). Ce résultat est en accord avec les travaux d'Eugenia et al. (2012), témoignant des dommages tissulaires enregistrés dans cet organe.

Egalement, la toxicité élevée de la combinaison Ova/TSF chez les rats, se traduit par une diminution significative et hautement significative du poids relatif du foie comparativement avec les rats sensibilisés à l'ovalbumine et avec les rats traités avec le tabac seul, respectivement (tableau 9). Cet effet est aussi expliqué par la destruction de l'intégrité structurale de cet organe cible de détoxification (Eugenia et al., 2012).

En fin, on note une diminution significative du poids relatif des poumons chez les rats traités par la combinaison Ova/TSF comparativement avec le lot traité par le tabac (tableau 9).

Par ailleurs, nous avons étudié non seulement l'effet du tabac sans fumée sur un terrain d'asthme expérimental, mais également, nous avons tenté une phytothérapie basée sur l'administration par gavage de l'huile de *Nigella sativa*.

En effet, parmi les graines condimentaires et médicinales les plus importantes cultivées en Algérie figure cette plante communément appelée "graine noire ou Sanoudj".

Cette plante, de la famille des Ranunculaceae, possède un très large spectre d'utilisation en médecine traditionnelle et même prophétique, récemment prouvé par des études pharmacologiques et biologiques. D'ailleurs, ce sont là les raisons pour lesquelles nous l'avons choisi.

Notre première constatation, quant à l'effet de cette plante concerne la variation du poids relatif des organes. En effet, l'administration de *Nigella sativa* au groupe traité par la combinaison Ova/TSF a entraîné une amélioration des poids absolu et relatif des organes (foie et poumons). Cette amélioration est probablement due à l'effet protecteur de *Nigella sativa* contre la toxicité induite par cette combinaison (Ova/TSF) (Mahmoud et al., 2002 ; Kandhare et al., 2013).

Il convient de souligner le fait que sur l'ensemble des lots ayant reçu NS (tableau 7), nous avons enregistré une diminution significative et même très hautement significative du poids corporel des rats.

Ces résultats sont confirmés par d'autres travaux qui ont démontré que *Nigella sativa* provoque une diminution du gain de poids corporel suite à une réduction de consommation d'aliment, sans que la moindre toxicité soit mentionnée (Labhal et al., 1997, 1999 ; Zaoui et al., 2002 ; Meddah et al., 2009 ; Balaha et al., 2012 ; Raza-Asim et al., 2012). Nos travaux corroborent l'utilisation traditionnelle de la graine de nigelle comme traitement de la dyslipidémie, l'hyperglycémie et autres maladies associées (Lim, 2013). Les composants

bioactifs de *N. sativa*, y compris la thymoquinone, le thymol, les composants inhibiteurs de la lipase et les acides gras insaturés seraient impliqués dans ces mécanismes qui demeurent non encore élucidés, (Datau et al., 2010, Heshmati et al., 2015).

4- Action sur les biomarqueurs plasmatiques des fonctions hépatique et rénale :

4-1- Les protéines totales plasmatiques :

D'après les résultats obtenus (tableau 10), on observe une augmentation hautement significative de la concentration plasmatique en protéines totales chez le groupe Ova, sensibilisé à l'ovalbumine, chez le groupe Ova/NS sensibilisé à l'ovalbumine et traité par *Nigella sativa*, ainsi que le groupe traité par la combinaison Ova/TSF/Ns comparativement au groupe témoin.

Aussi, on note une augmentation très hautement significative chez le groupe TSF administré par le tabac, chez le groupe sensibilisé et traité par la combinaison Ova/TSF et le groupe traité par TSF/NS comparativement au groupe témoin.

4-2- L'activité des transaminases :

L'administration du tabac sur un terrain sensibilisé Ova/TSF chez les rats induit une augmentation significative de l'activité enzymatique des transaminases, de l'aspartate aminotransférase (ASAT) et de l'alanine aminotransférase (ALAT) comparativement aux rats témoins, et une augmentation significative comparativement aux rats sensibilisés seulement par l'ovalbumine.

On observe aussi que l'administration du tabac chez les rats induit une augmentation significative de l'aspartate aminotransférase (ASAT) par rapport au groupe témoin (tableau 10).

4-3- L'activité de la phosphatase alcaline (PAL) : Aucune différence significative n'est enregistrée chez les rats des différents groupes expérimentaux (tableau 10).

4-4- L'albumine : La sensibilisation des rats par l'ovalbumine en combinaison avec le tabac (Ova/TSF) provoque une diminution hautement significative de la concentration plasmatique en albumine comparativement au groupe témoin.

Aussi, on note une diminution significative chez les rats des autres groupes expérimentaux comparativement aux rats témoins (tableau 10).

4-5- La créatinine : La sensibilisation des rats par l'ovalbumine en combinaison avec *Nigella sativa* (Ova/NS) induit une diminution hautement significative de la concentration plasmatique de la créatinine comparativement au groupe témoin.

Tableau 10 : Variation de quelques paramètres biochimiques chez les rats témoins et traités.

Paramètres	Lots expérimentaux							
	Témoin	Ova	TSF	N.s	Ova/TSF	Ova/N.s	TSF/N.s	Ova/TSF/N.s
Prot. totales (g/L)	59,16 ± 02,53	71,33 ± 3,49 ^(**)	79,50 ± 2,46 ^(***)	64,00 ± 5,10	74,33 ± 2,18 ^(***)	73,40 ± 4,50 ^(**)	77,14 ± 1,83 ^(***)	78,80 ± 5,72 ^(**)
%	--	+ 20,57	+ 34,38	+ 08,18	+ 25,64	+ 24,07	+ 30,39	+ 33,19
ASAT (UI/L)	263 ± 23,12	317,50 ± 28,57	362,16 ± 26,36 ^(**)	239 ± 11,12	447,33 ± 33,87 ^{(***)(#)(+)}	292,20 ± 23,63	289 ± 19,25 ⁽⁺⁾	280,20 ± 42,41 ^(§§)
%	--	+ 20,72	+ 37,70	- 09,12	+ 76,42	+ 11,10	+ 09,88	+ 06,54
ALAT (UI/L)	57,5 ± 03,14	64,16 ± 3,16	85,33 ± 11,54 ^(*)	55,66 ± 1,78	100,50 ± 16,37 ^{(**)(#)}	60,60 ± 5,76	62 ± 3,61 ⁽⁺⁾	66,60 ± 7,60 ^(§)
%	--	+ 11,58	+ 48,40	- 03,20	+ 74,78	+ 05,39	+ 07,82	+ 15,82
PAL (UI/L)	176,33 ± 06,65	187,83 ± 10,90	215 ± 13,08 ^(**)	179,66 ± 11,77	196,66 ± 04,24 ^(**)	178,40 ± 14,36	189,28 ± 02,56 ^{(*)(+)}	175 ± 11,42 ^(§)
%	--	+ 06,52	+ 21,93	+ 01,88	+ 11,53	+ 01,17	+ 07,34	- 00,75
Albumine (g/L)	17,16 ± 00,47	15,16 ± 0,60 ^(**)	15,33 ± 0,61 ^(*)	15,66 ± 0,42 ^(*)	15,16 ± 0,47 ^(**)	14,40 ± 0,59 ^(**)	15,57 ± 0,61 ^(*)	15,60 ± 0,51 ^(*)
%	--	- 11,65	- 10,66	- 08,74	- 11,65	- 16,08	- 09,26	- 09,09
Créatinine (mg/L)	06,66 ± 00,21	5,83 ± 0,16 ^(**)	6,16 ± 0,16 ^(*)	6,00 ± 0,25 ^(*)	6,16 ± 0,40	5,80 ± 0,20 ^(**)	6,42 ± 0,20	6,00 ± 0,44
%	--	- 12,46	- 07,50	- 09,90	- 07,50	- 12,91	- 03,60	- 09,90
Urée (g/L)	00,55 ± 00,01	0,52 ± 0,01	0,50 ± 0,02	0,49 ± 0,02 ^(*)	0,57 ± 0,02 ^{(#)(+)}	0,56 ± 0,02	0,56 ± 0,01 ⁽⁺⁾	0,56 ± 0,03
%	--	- 05,45	- 09,09	- 10,90	+ 03,63	+ 01,81	+ 01,81	+ 01,81

* p ≤ 0,05 ; ** p ≤ 0,01 ; *** p ≤ 0,001 comparativement aux rats témoins ;

p ≤ 0,05 ; ## p ≤ 0,01 ; ### p ≤ 0,001 comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine ;

+ p ≤ 0,05 ; ++ p ≤ 0,01 ; +++ p ≤ 0,001 comparativement aux rats traités par le tabac.

§ p ≤ 0,05 ; §§ p ≤ 0,01 comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine et traités par le tabac.

On observe également une diminution significative chez les rats administrés par le tabac, et les rats traités par *Nigella sativa* comparativement aux rats du groupe témoin (tableau 10).

4-6- L'urée : Nos résultats montrent que le traitement des rats par *Nigella sativa* induit une diminution significative de la concentration plasmatique de l'urée par rapport au groupe témoin et une augmentation significative chez les rats sensibilisés et administrés avec le tabac (Ova/TSF) par rapport aux rats sensibilisés seulement par l'ovalbumine. Enfin, on note une augmentation significative chez les rats recevant la combinaison Ova/TSF et la combinaison TSF/NS par rapport aux rats traités seulement avec du tabac (tableau 10).

Discussion :

Hormis les effets du tabac sur le poids des animaux et/ou de leurs organes, l'impact sur leur métabolisme a été abordé via la mesure de certains paramètres reflétant les fonctions hépatique et rénale.

Tout d'abords, étant donné que le foie, est considéré comme le principal organe de détoxification capable de neutraliser toutes les substances toxiques, et vu son rôle dans la transformation des xénobiotiques à savoir ceux contenus dans le tabac, il constitue la première cible de ces produits à fort potentiel toxique et risque donc d'être fortement endommagé (Breitling et al., 2011). Des études antérieures, réalisées sur des rats (Avti et al., 2005) (Shrestha et al., 2012 ; Velayutharaj et al., 2013), ont montré que le tabac sans fumée peut induire l'endommagement du foie par l'élévation des taux sanguins en transaminases (ASAT et ALAT), PAL et LDH sachant que ces dernières reflètent l'activité fonctionnelle du foie et sont principalement utilisées dans l'évaluation des dommages et du dysfonctionnement hépatique.

Nos résultats ont prouvé que l'administration du tabac sans fumée a en effet causé l'augmentation significative des niveaux plasmatiques des transaminases suggérant que l'excessive utilisation de cette drogue pourrait causer des dommages critiques à cet organe. Ceci étant en accord avec les résultats de plusieurs recherches suite à l'administration du tabac sans fumée (Shrestha et al., 2012 ; Velayutharaj et al., 2013).

Ceci peut être expliqué par l'induction (par les constituants du TSF) des enzymes microsomaux hépatiques qui participent à la rupture de la membrane plasmique des cellules du foie et ainsi à la libération de l'ALAT et l'ASAT au niveau de la circulation générale, tel qu'il a été rapporté par plusieurs auteurs (Burtis et al., 2006 ; Sallie et al., 1991).

En fait, en plus de la nicotine, plusieurs métaux lourds peuvent être incriminés, tels que le cadmium, le mercure et le plomb qui, en tant que xénobiotiques, participent à la libération des ROS, connus pour altérer les structures cellulaires au niveau des organes clés.

Par ailleurs, l'altération de l'intégrité structurale hépatique peut affecter les fonctions du foie, parmi lesquelles figure la synthèse de l'albumine (Shrestha et al., 2012). En effet, notre présente étude montre une diminution hautement significative de la concentration plasmatique en albumine chez les rats sensibilisés par l'ovalbumine seule et par la combinaison Ova/TSF, et une diminution significative chez les rats traités par le tabac seul et *Nigella sativa* seule. Ainsi le traitement des rats sensibilisés par l'ovalbumine et/ou le tabac par *Nigella sativa* n'aboutit pas au rétablissement de la valeur normale de l'albumine.

Quant au rein, il est également considéré comme un organe cible pour les composés xénobiotiques notamment les constituants du tabac sans fumée. Ainsi, l'urée et la créatinine sanguines des animaux d'expérience sont parmi les paramètres essentiels pour évaluer la fonction rénale et la filtration glomérulaire (Brunet, 2005 ; Fingo, 1997).

Dans notre présente étude, on a constaté une diminution hautement significative de la créatinine plasmatique chez les rats sensibilisés et les rats recevant la combinaison Ova/NS. De plus, on note une diminution significative chez les rats traités par le tabac seul et *Nigella sativa* seule comparativement au groupe témoin. Cette diminution pourrait être expliquée par un dysfonctionnement de la synthèse et/ou de la sécrétion de la créatinine par les cellules musculaires, car il s'agit d'une substance endogène produite par les muscles (Zaoui et al., 2002). Cette explication est particulièrement confortée par la diminution significative du poids corporel (donc de la masse musculaire) chez les rats traités par *Nigella sativa* par rapport au groupe témoin.

Par ailleurs, on constate dans notre présente étude une diminution de l'urée plasmatique chez les rats recevant la combinaison : Ova/TSF, comparativement au groupe témoin. Aussi on enregistre une augmentation significative de l'urée chez les rats de ce groupe comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine et ceux consommant le tabac respectivement. L'augmentation des taux sériques en urée et en acide urique qui sont considérés comme des biomarqueurs de la dysfonction rénale, la filtration glomérulaire et les dommages rénaux provoqués par les xénobiotiques (Finco, 1997). En effet, l'augmentation de l'urée est corrélée avec l'augmentation du catabolisme protéique, les protéines peuvent être dégradées en acides aminés puis en urée (l'urée étant le produit final de dégradation des protéines). Ceci est confirmé par l'augmentation très hautement significative des protéines totales au sein du même lot (Ova/TSF). Ainsi, l'augmentation de l'urée chez ces rats est due à l'effet néphrotoxique des xénobiotiques contenus dans le TSF (El-Demerdash et al., 2009 ; Nandi et al., 2005). Ces résultats sont confirmés par les altérations rénales provoquées par la combinaison Ova/T au niveau des coupes histologiques (voir plus loin).

Les résultats concernant la concentration plasmatique des protéines totales montrent une augmentation hautement significative chez les rats des groupes sensibilisés : Ova, Ova/NS et Ova/TSF/NS, comparativement au groupe témoin. De plus, on note une augmentation très hautement significative chez les rats des groupes traités avec du tabac : TSF, Ova/TSF et TSF/NS, par rapport au groupe témoin.

En fait, il est bien connu que lors d'une inflammation on observe une augmentation des alpha-globulines ainsi que des gammaglobulines, mais une diminution de l'albumine (Haddad et Mas, 2007). Ceci explique clairement les résultats obtenus dans notre étude et témoigne d'une inflammation provoquée par l'ovalbumine, et aggravée par la prise de tabac.

Par contre, chez les rats traités par *Nigella sativa* seule, il n'y a aucune différence enregistrée par rapport au le groupe témoin.

5- Etude des paramètres du stress oxydant :

Les variations des paramètres du stress oxydant (thiols non protéiques, MDA, protéines carbonylées, GSH, GPx, catalase et SOD), dans les érythrocytes et les organes (foie et poumons) des rats traités et témoins, sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM. Les pourcentages de diminution et d'augmentation sont également calculés.

5.1- Les paramètres non-enzymatiques :

5.1.1- Le malondialdéhyde :

Les taux de MDA dans les érythrocytes ont montré une augmentation très hautement significative pour les lots Ova et Ova/TSF et une augmentation hautement significative pour le lot TSF, comparativement au groupe témoin. Tandis que le traitement avec Ns se voit par une diminution hautement significative dans le lot Ova/Ns comparativement au groupe Ova, ainsi que dans le lot Ova/TSF/Ns comparativement au groupe Ova/TSF et une diminution significative dans le lot TSF/Ns comparativement au groupe TSF (figure 26a). Au niveau du foie, les taux de MDA ont montré une augmentation hautement significative pour les lots Ova et Ova/TSF et une augmentation très hautement significative pour le lot TSF, comparativement au groupe témoin. Ainsi, l'effet de Ns se traduit par une diminution significative dans le lot Ova/Ns comparativement au groupe Ova, ainsi que dans le lot Ova/TSF/Ns comparativement au groupe Ova/TSF et une diminution très hautement significative dans le lot TSF/Ns comparativement au groupe TSF (figure 26b). De même, les taux de MDA dans les poumons ont montré une augmentation très hautement significative pour les lots Ova et Ova/TSF et le lot TSF, comparativement au groupe témoin. Ainsi, l'effet de Ns se traduit par diminution très hautement significative dans le lot Ova/Ns comparativement au groupe Ova, ainsi que dans le lot Ova/TSF/Ns comparativement au groupe Ova/TSF et dans le lot TSF/Ns comparativement au groupe TSF (figure 26c).

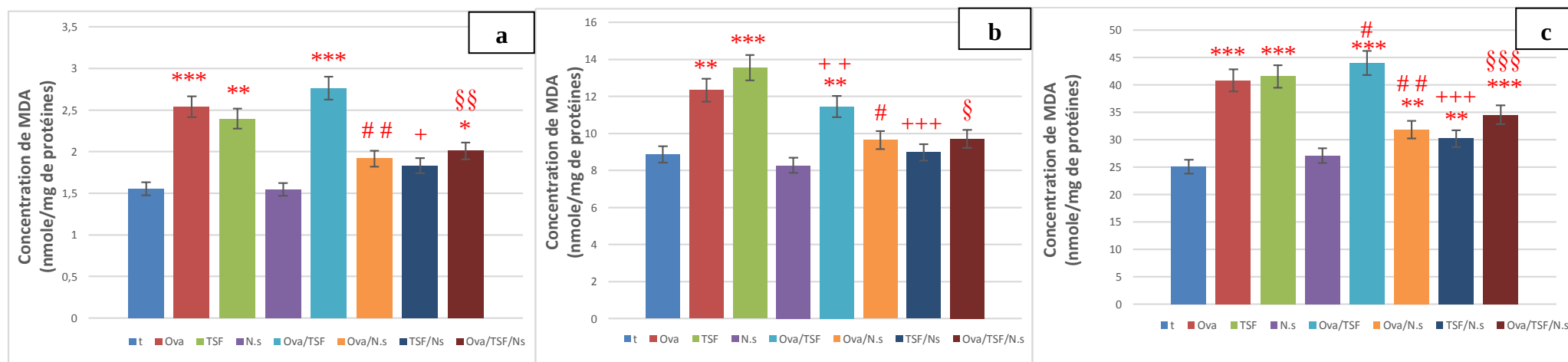


Figure 26 : Variation des taux de MDA dans les érythrocytes (a), le foie (b) et les poumons (c) chez les rats témoins et traités.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ comparativement aux rats témoins ;

$p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$ comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine ;

+ $p \leq 0.05$; ++ $p \leq 0.01$; +++ $p \leq 0.001$ comparativement aux rats traités par le tabac.

§ $p \leq 0.05$; §§ $p \leq 0.01$; §§§ $p \leq 0.001$ comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine et traités par le tabac.

5.1.2- Les protéines carbonylées :

En ce qui concerne les protéines carbonylées, au niveau des érythrocytes, on note une augmentation très hautement significative pour les lots TSF et Ova/TSF et une augmentation hautement significative pour le lot Ova, comparativement au groupe témoin. Quant à la supplémentation avec Ns, elle a donné les résultats suivants : une diminution significative dans le lot Ova/Ns comparativement au groupe Ova, ainsi que dans le lot TSF/Ns comparativement au groupe T et une diminution hautement significative dans le lot Ova/T/Ns comparativement au groupe Ova/TSF/Ns (figure 27a). Aussi, au niveau du foie, on enregistre une augmentation très hautement significative pour les lots Ova, TSF et Ova/TSF comparativement au groupe témoin. De même, le traitement avec Ns aboutit à une diminution significative dans le lot Ova/Ns comparativement au groupe Ova, ainsi que dans le lot TSF/Ns comparativement au groupe TSF et une diminution hautement significative dans le lot Ova/TSF/Ns comparativement au groupe Ova/TSF (figure 27b). Dans les poumons, on enregistre une augmentation très hautement significative des protéines carbonylées pour les lots Ova et Ova/TSF et une augmentation significative pour le lot TSF, comparativement au groupe témoin. Par contre, le traitement avec Ns montre une diminution hautement significative dans les lots TSF/Ns et Ova/TSF/Ns comparativement aux lots TSF/Ns et Ova/TSF respectivement (figure 27c).

5.1.3- Le glutathion réduit :

Concernant le glutathion réduit, on note une diminution significative, hautement significative et très hautement significative dans les lots TSF, Ova et Ova/TSF respectivement et comparativement au lot témoin dans les érythrocytes. Alors que le traitement avec Ns montre une amélioration significative dans le lot Ova/Ns comparativement au groupe Ova et une augmentation hautement significative dans le lot Ova/TSF/Ns comparativement au groupe Ova/TSF (figure 28a). Dans le foie, on enregistre une diminution significative, hautement et très hautement significative dans les lots TSF, Ova et Ova/TSF respectivement et comparativement au lot témoin. Alors que le traitement avec Ns montre une amélioration significative dans le lot Ova/Ns comparativement au groupe Ova et une augmentation hautement significative dans le lot Ova/TSF/Ns comparativement au groupe Ova/TSF (figure 28b). Au niveau pulmonaire, on note une diminution significative, hautement significative et très hautement significative dans les lots Ova, TSF et Ova/TSF respectivement et comparativement au lot témoin. Cette diminution est améliorée d'une façon hautement significative par le traitement avec Ns dans le lot Ova/TSF/Ns comparativement au groupe Ova/TSF (figure 28c).

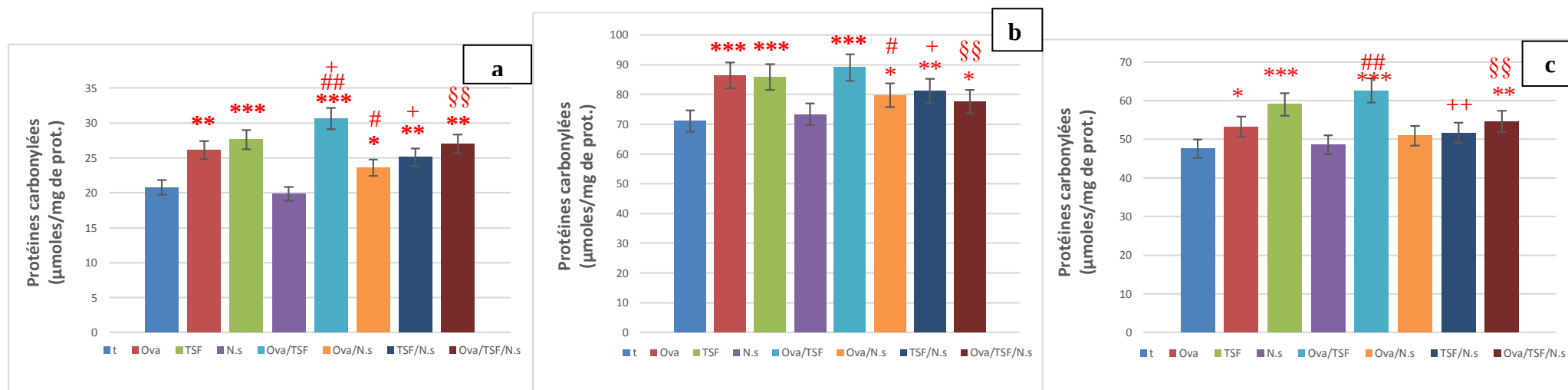


Figure 27 : Variation des taux des protéines carbonylées dans les érythrocytes (a), le foie (b) et les poumons (c) chez les rats témoins et traités.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ comparativement aux rats témoins ;

$p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$ comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine ;

+ $p \leq 0.05$; ++ $p \leq 0.01$ comparativement aux rats traités par le tabac.

§§ $p \leq 0.01$ comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine et traités par le tabac.

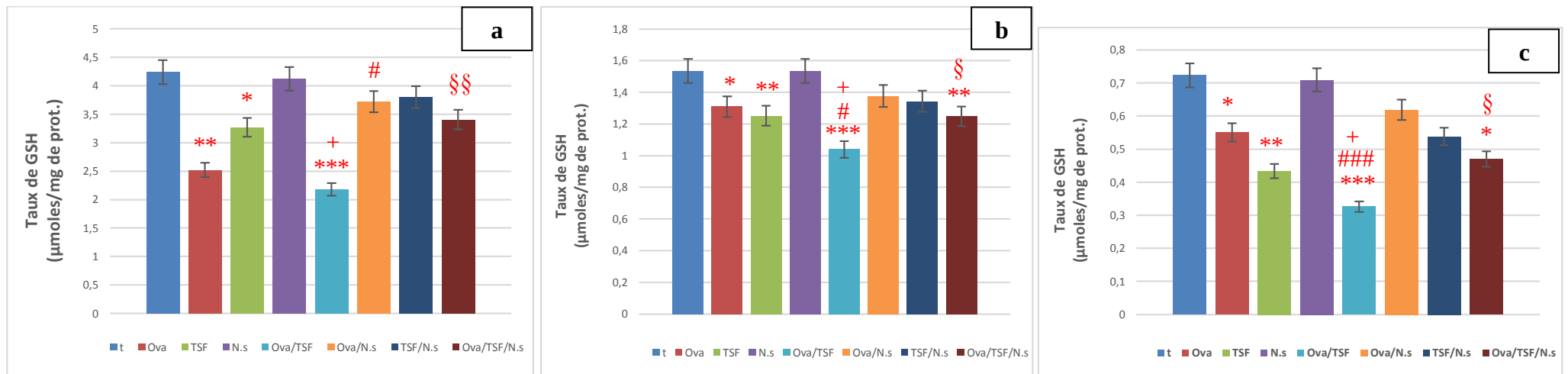


Figure 28 : Variation des taux du glutathion réduit dans les érythrocytes (a), le foie (b) et les poumons (c) chez les rats témoins et traités.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ comparativement aux rats témoins ;

$p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$ comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine ;

+ $p \leq 0.05$; ++ $p \leq 0.01$; +++ $p \leq 0.001$ comparativement aux rats traités par le tabac.

§ $p \leq 0.05$; §§ $p \leq 0.01$ comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine et traités par le tabac.

5.1.4- Les thiols non protéiques (NPSH) :

Les niveaux de NPSH ont montré une diminution très hautement significative dans les lots TSF et Ova/TSF et une diminution hautement significative dans le lot Ova comparativement au lot témoin dans les érythrocytes. Cependant, l'administration de NS a entraîné une augmentation significative chez les rats du lot Ova/Ns comparativement au groupe Ova, ainsi que chez les rats du lot TSF/Ns par rapport au groupe TSF et une augmentation hautement significative dans le lot Ova/TSF/Ns comparativement au groupe Ova/TSF. Dans le foie, on enregistre une diminution très hautement significative dans les lots Ova, TSF et Ova/TSF comparativement au lot témoin. Par contre, on note une augmentation très hautement significative dans le lot traité par Ns seule par rapport au lot témoin (figure 29a). Alors que le traitement avec Ns montre une amélioration très hautement significative dans le lot Ova/Ns comparativement au groupe Ova, ainsi que dans le lot Ova/TSF/Ns comparativement au groupe Ova/TSF et dans le lot Ova/TSF/Ns comparativement au lot Ova/TSF (figure 29b). Au niveau pulmonaire, on note une diminution significative dans le lot TSF et très hautement significative dans les lots Ova et Ova/TSF comparativement au lot témoin. Cette diminution est améliorée d'une façon très hautement significative par le traitement avec Ns dans le lot Ova/TSF/Ns comparativement au groupe Ova/TSF et d'une façon significative dans le lot Ova/Ns par rapport au lot Ova, de même dans le lot TSF/Ns par rapport au lot TSF (figure 29c).

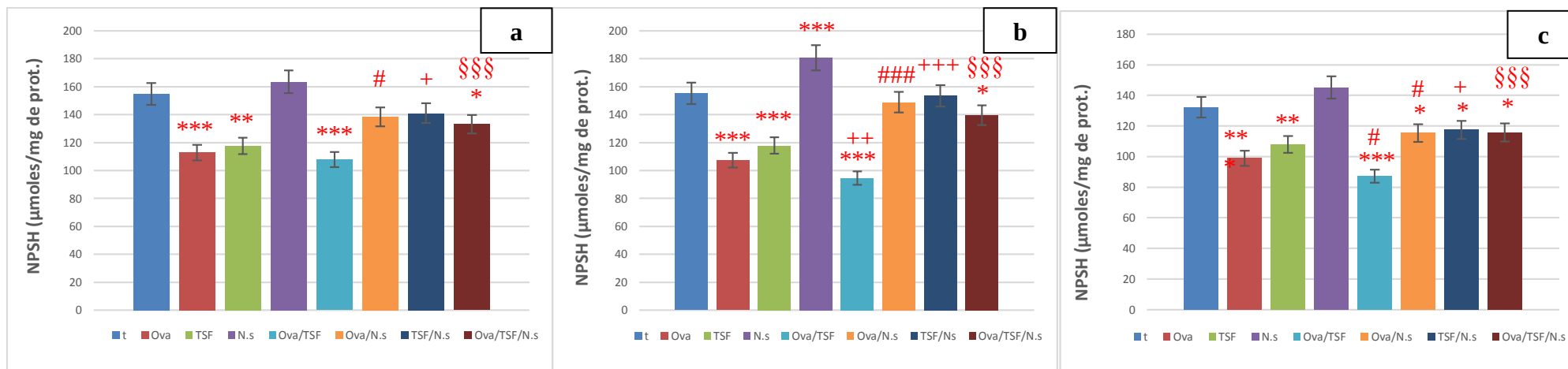


Figure 29 : Variation des taux des thiols non protéiques réduit dans les érythrocytes (a), le foie (b) et les poumons (c) chez les rats témoins et traités.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ comparativement aux rats témoins ;

$p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.001$ comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine ;

+ $p \leq 0.05$; ++ $p \leq 0.01$; +++ $p \leq 0.001$ comparativement aux rats traités par le tabac.

\$\$\$ $p \leq 0.001$ comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine et traités par le tabac.

5.2- Les enzymes :

5.2.1- La glutathion peroxydase :

L'activité de la GPx dans les érythrocytes montre une diminution très hautement significative dans les lots Ova et Ova/TSF et une diminution hautement significative dans le lot TSF comparativement au groupe témoin. Néanmoins, le traitement avec Ns se traduit par une augmentation hautement significative dans le lot Ova/Ns par rapport au lot Ova et également dans le lot Ova/TSF/Ns par rapport au groupe Ova/TSF (figure 30a). Dans le foie, on note une diminution très hautement significative dans les lots TSF et Ova/TSF et une diminution hautement significative dans le lot Ova comparativement au groupe témoin. Toutefois, le traitement par Ns montre une augmentation très hautement significative dans le lot Ova/TSF/Ns par rapport au lot Ova/TSF et une augmentation hautement significative dans le lot TSF/Ns comparativement au groupe TSF (figure 30b). Dans les poumons, on enregistre une diminution hautement significative dans les lots Ova, Ova/TSF et une diminution significative dans le lot TSF comparativement au lot témoin. Tandis que le traitement avec Ns montre une amélioration significative dans le lot TSF/Ns par rapport au lot TSF, ainsi que dans le lot Ova/TSF/Ns par rapport au lot Ova/TSF et une augmentation hautement significative dans le lot Ova/Ns par rapport au lot Ova (figure 30c).

5.2.2- La catalase :

Les résultats obtenus montrent une diminution hautement significative de l'activité de la catalase dans les érythrocytes chez les lots Ova, TSF et Ova/TSF comparativement au lot témoin. Cependant, le traitement avec Ns aboutit à une augmentation hautement significative dans le lot Ova/Ns par rapport au lot Ova, ainsi que dans le lot Ova/TSF/Ns par rapport au lot Ova/TSF et une augmentation significative dans le lot T/Ns comparativement au lot TSF (figure 31a). Dans le foie, on note une diminution très hautement significative dans les lots Ova, TSF et Ova/TSF comparativement au lot témoin. Ainsi, le traitement avec Ns montre une augmentation hautement significative dans le lot Ova/Ns par rapport au lot Ova, ainsi que dans le lot Ova/TSF/Ns par rapport au lot Ova/TSF et une augmentation significative dans le lot TSF/Ns comparativement au lot TSF (figure 31b). Au niveau pulmonaire, on enregistre une diminution hautement significative chez les lots Ova et Ova/TSF et une diminution significative dans le lot TSF comparativement au lot témoin. En outre, le traitement avec Ns montre une augmentation hautement significative dans le lot Ova/TSF/Ns par rapport au lot Ova/TSF et une augmentation significative dans le lot Ova/Ns comparativement au groupe Ova (figure 31c).

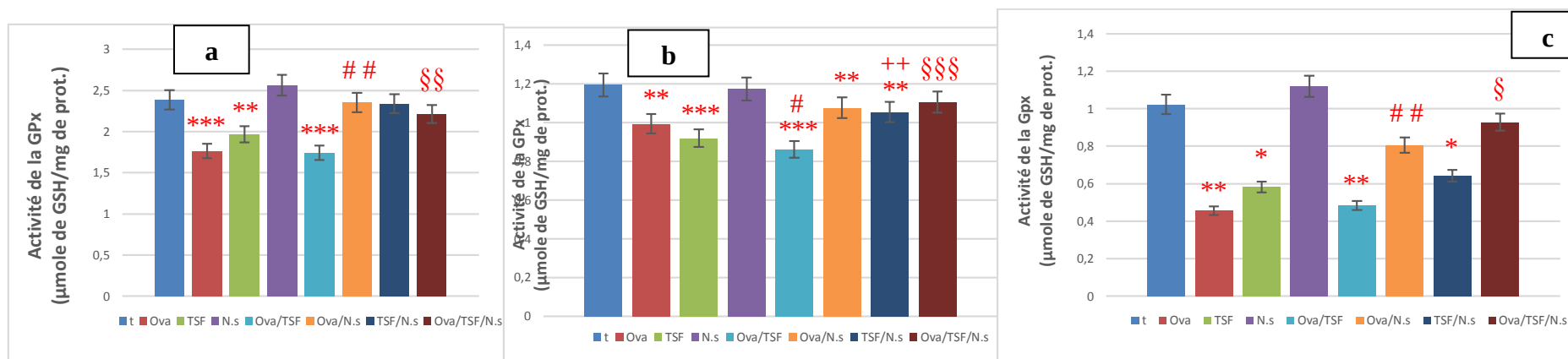


Figure 30 : Variation de la glutathion peroxydase dans les érythrocytes (a), le foie (b) et les poumons (c) chez les rats témoins et traités.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ comparativement aux rats témoins ;

$p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$ comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine ;

++ $p \leq 0.01$ comparativement aux rats traités par le tabac.

§ $p \leq 0.05$; §§ $p \leq 0.01$; §§§ $p \leq 0.001$ comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine et traités par le tabac.

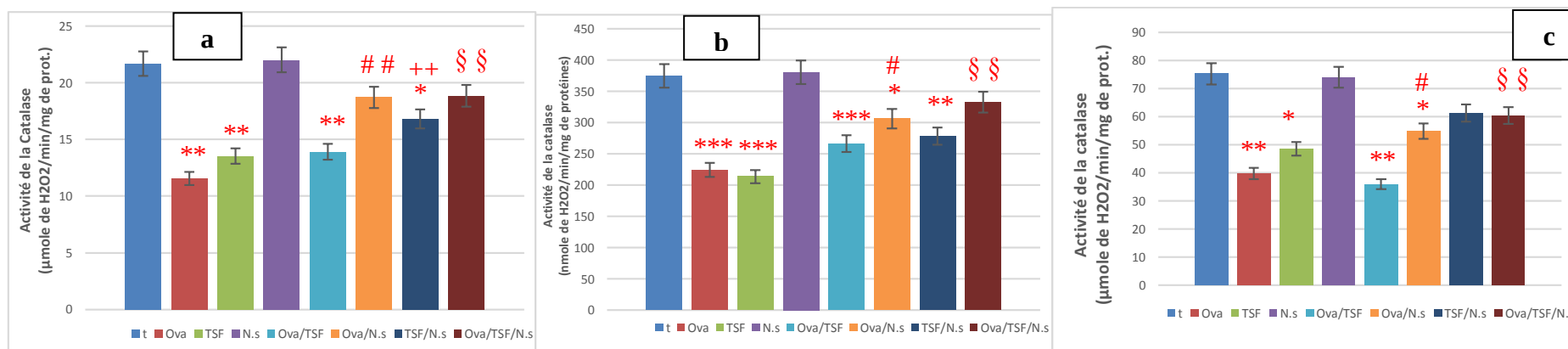


Figure 31 : Variation de la catalase dans les érythrocytes (a), le foie (b) et les poumons (c) chez les rats témoins et traités.

- * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ comparativement aux rats témoins ;
- # $p \leq 0.05$; ## $p \leq 0.01$ comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine ;
- ++ $p \leq 0.01$ comparativement aux rats traités par le tabac.
- §§ $p \leq 0.01$ comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine et traités par le tabac.

5.2.3- La superoxyde dismutase :

Nos résultats montrent une diminution hautement significative de l'activité enzymatique de la SOD dans les érythrocytes chez les lots Ova et Ova/TSF et une diminution significative dans le lot TSF, comparativement au groupe témoin. De plus, le traitement avec Ns aboutit à une amélioration significative dans le lot Ova/Ns par rapport au lot Ova, ainsi que dans le lot TSF/Ns par rapport au lot TSF et une augmentation hautement significative dans le lot Ova/TSF/Ns comparativement au groupe témoin (figure 32a). Dans le foie, on enregistre une diminution très hautement significative dans les lots Ova, TSF et Ova/TSF comparativement au groupe témoin. De même, le traitement avec Ns montre une amélioration hautement significative dans le lot TSF/Ns par rapport au lot TSF, ainsi que dans le lot Ova/TSF/Ns par rapport au lot Ova/TSF et une augmentation significative dans le lot Ova/Ns comparativement au lot Ova (figure 32b). Dans les poumons, on enregistre une diminution hautement significative dans les lots Ova et TSF et une diminution très hautement significative dans le lot Ova/TSF par rapport au lot témoin. Aussi, après le traitement avec Ns, on note une amélioration significative dans lot Ova/Ns par rapport au lot Ova, ainsi que dans le lot TSF/Ns par rapport au lot TSF et une augmentation hautement significative dans le lot Ova/TSF/Ns comparativement au lot Ova/TSF (figure 32c).

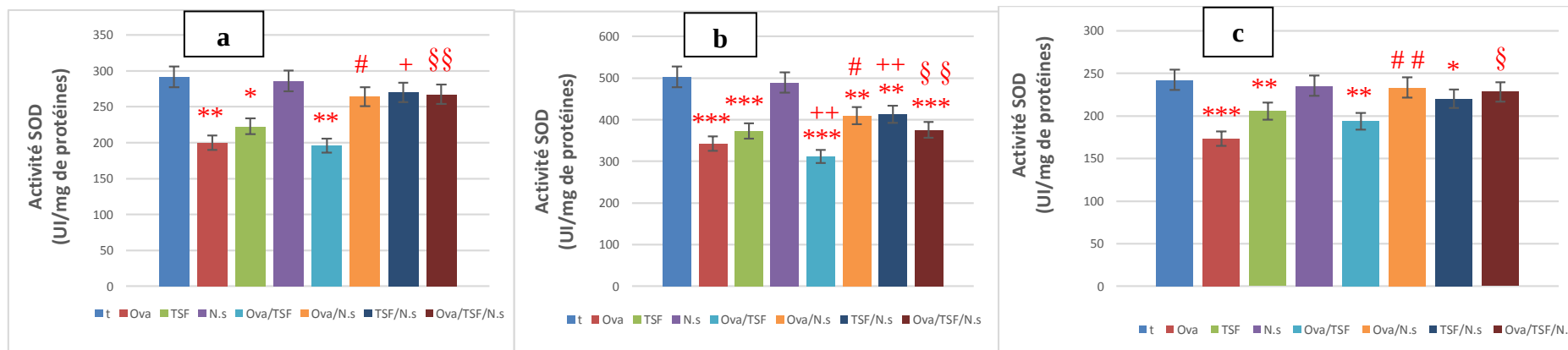


Figure 32 : Variation de la superoxyde dismutase dans les érythrocytes (a), le foie (b) et les poumons (c) chez les rats témoins et traités.

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ comparativement aux rats témoins ;

$p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$ comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine ;

+ $p \leq 0,05$; ++ $p \leq 0,01$ comparativement aux rats traités par le tabac.

§ $p \leq 0,05$; §§ $p \leq 0,01$ comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine et traités par le tabac.

- Discussion :

Les dommages constatés au niveau du foie et des reins, via les variations significatives des marqueurs hépatiques et rénaux, indiquent bien que le tabac sans fumée a altéré les structures et fonctions de ces deux organes. Certaines études ont expliqué le mécanisme par lequel le tabac à priser induit des lésions rénales et hépatiques et ceci en provoquant la synthèse des radicaux libres qui conduisent à la formation de lipides et de peroxydas protéiniques, puis à des dommages à l'ADN et finalement à l'apoptose (Al-Mukhaini et al., 2017).

En fait, le SO est le résultat des processus de multi-étapes causant un déséquilibre dans la balance entre les pro-oxydants et les antioxydants et menant aux dommages tissulaires au niveau des poumons (Kumari et al., 2013), du foie (Velayutharaj et al., 2013) et des reins (Avti et al., 2006), conduisant en premier lieu à de nombreuses maladies comme le cancer (Schivo et al., 2014), les maladies cardiovasculaires (Gupta et al., 2013), les maladies reproductives (Gupta et Sreevidya, 2004) et le diabète (Eliasson et al., 1996).

Au vu de ces implications, nous avons donc évalué le système antioxydant des rats au niveau de plusieurs compartiments (érythrocytes, foie et poumons).

La peroxydation lipidique (LPO) est l'une des manifestations principales des dommages oxydatifs et s'est avérée avoir un rôle important dans la toxicité et la cancérogénicité de plusieurs xénobiotiques. Il s'agit du processus de la dégradation oxydative des acides gras polyinsaturés et son occurrence dans les membranes biologiques causant des changements dans la structure et la fonction membranaires et menant à la diminution de la fluidité de la membrane et l'inactivation de plusieurs enzymes membranaires (Gutteridge et Halliwell, 2000). Les taux du malondialdéhyde (comme produit final de LPO) ont été mesurés pour indiquer la génération des ERO et des dommages tissulaires induits par la LPO dans les érythrocytes, le foie et les poumons.

Toutefois, l'organisme possède également tout un arsenal d'enzymes qui permettent de lutter contre le stress oxydant. Cependant, ces enzymes peuvent être affectées par l'exposition à un xénobiotique ou un allergène telle que l'ovalbumine, qui agissent en provoquant la décroissance des activités des enzymes antioxydantes telles que celles de la GPx, des SODs et de la CAT (Zhang et al., 2007). Ainsi il apparaît nécessaire de mesurer les activités de ces enzymes pour évaluer dans un premier temps l'impact de la sensibilisation par l'ovalbumine comme agent inducteur du stress oxydant.

Les résultats obtenus lors de la présente étude montrent que la sensibilisation des rats par l'ovalbumine induit une augmentation hautement significative des taux de MDA dans les

compartiments suscités comparativement à ceux retrouvés chez les rats non-sensibilisés. Ces observations sont en accord avec plusieurs études qui ont montré que l'administration subséquente de l'allergène, par inhalation, a induit une réponse inflammatoire des voies aériennes par la surproduction des radicaux libres, qui à leur tour peuvent initier la peroxydation lipidique (Missebukpo et al., 2013 ; Bulani et al., 2011).

Cette élévation des taux de MDA peut aussi être expliquée par l'augmentation du nombre de cellules inflammatoires activées infiltrant les alvéoles pulmonaires et qui libèrent de grandes quantités d'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène par divers mécanismes, sachant que l'anion superoxyde peut interagir avec le NO• pour générer des peroxynitrites (ONOOH) de toxicité élevée (Marie, 2002).

D'autre part, le glutathion réduit (GSH) représente l'une des nombreuses défenses antioxydantes potentielles impliquées dans la protection de divers organes contre les lésions induites par les oxydants lors du processus inflammatoire (Das et al., 2018). Par conséquent, le GSH, étant un nucléophile puissant, est capable d'inactiver les composés réactifs électrophiles soit par conjugaison directe non enzymatique, soit par catalyse enzymatique (Avti et al., 2006). En effet, Bhandarkar et Khan (2004) ont rapporté qu'une quantité suffisante de GSH est en mesure d'augmenter la détoxification des métabolites actifs grâce à l'implication de la GPx. Aussi, la diminution des niveaux de GSH augmente le fardeau des radicaux libres en raison de l'élimination inefficace des ROS dans les tissus.

Ainsi, les SODs fonctionnent comme première ligne de défense contre le stress oxydant et convertissent les radicaux superoxydes en peroxyde d'hydrogène. Cette fonction n'est efficace que si son activité est suivie par les actions de la CAT et la GPx, car le peroxyde d'hydrogène produit par la SOD est subséquemment nettoyé par ces dernières (Devaki et al., 2011). Cette coopération entre les enzymes antioxydantes est perturbée par la libération élevée des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (Larsen et al., 2000). Ceci explique le fait que nous retrouvons, dans notre présente étude, des diminutions hautement significatives pour les activités enzymatiques de la GPX, de la SOD et de la CAT et ce dans l'ensemble des compartiments tissulaires étudiés chez les rats sensibilisés par l'ovalbumine comparativement au groupe témoin.

En fait, la SOD étant une cible pour la nitration et l'oxydation de la tyrosine, ceci pourrait aussi être à l'origine de la déperdition de la fonction de cette enzyme (Janssen-Heininger et al., 2005). De plus, l'augmentation des taux des radicaux libres générés au cours du stress oxydant déstabilise la structure de la SOD et favorise ainsi le dégagement du Zn de son emplacement actif (Johnson et al., 2001 ; Crow et al., 1997).

Par ailleurs, la GPx est une enzyme antioxydante clé qui règle le niveau des ERO par sa capacité de réduire non seulement le peroxyde d'hydrogène en eau, mais aussi les hydroperoxydes résultant de l'oxydation des acides gras insaturés. De cette façon, cette enzyme parviendrait à protéger les cellules contre les dégâts générés par les agents étrangers comme l'ovalbumine (Bano et al., 2012). Ayant besoin du glutathion et du sélénium pour fonctionner correctement, sa diminution significative enregistrée dans la présente étude serait principalement due à une surproduction de peroxyde d'hydrogène et l'épuisement du sélénium et de GSH. D'ailleurs, on retrouve bien dans la littérature, des animaux traités par l'Ova, chez lesquels le taux du glutathion hépatique est significativement diminué en comparaison avec les témoins (Sackesen et al., 2008). En effet, selon plusieurs auteurs la conjugaison du GSH aux peptides antigéniques pourrait être la voie majeure de leur élimination. On suppose donc que le glutathion a été utilisé pour l'élimination et la détoxification de l'allergène administré, ce qui a engendré une baisse des taux de ce dernier (Tolando et al., 2000 ; Samuel et al., 2005 ; Misso et al., 2005).

La diminution significative de l'activité de la catalase chez les rats sensibilisés comparée à celle des rats non-sensibilisés indique la perte du pouvoir antioxydant de cette enzyme. Nos résultats confirment ceux de plusieurs auteurs (Sumoza-Toledo et al., 2013 ; Comhair et Erzurum, 2010 ; Reynaert et al., 2007), qui ont montré l'inactivation oxydante de la catalase dans leurs travaux expérimentaux chez les animaux, mais aussi dans les poumons des patients asthmatiques.

D'autre part, dans la présente étude, le profil du statut oxydant/antioxydant dans les différents organes après l'administration du tabac sans fumée révèle des altérations significatives de l'activité des enzymes antioxydantes et de la peroxydation lipidique. Des résultats similaires ont été également rapportés à travers la littérature dans différents organes et tissus suite à l'administration du TSF (Avti et al., 2006 ; Velayutharaj et al., 2013 ; Salunke et al., 2011 ; Bagchi et al., 1998).

La diminution significative de l'activité de la SOD enregistrée dans les érythrocytes, le foie et les poumons due à une surexploitation de cette enzyme pourrait mener à une insuffisance dans l'élimination des radicaux d'O₂⁻ du milieu cellulaire, ayant pour résultat final l'excès des ERO. La surproduction de ces radicaux a un effet inhibiteur sur les enzymes responsables de l'élimination des ERO tel que la GPx et la CAT (Koregol et al., 2017). En effet, il a été démontré que les radicaux superoxydes inhibent l'activité de la CAT et que le H₂O₂ supprime

l'activité de la SOD (Avti et al., 2006), ce qui pourrait expliquer l'inhibition de ces enzymes après l'administration du TSF dans la présente étude.

Ainsi, il a été rapporté dans la littérature qu'au cours du métabolisme du tabac, de nombreux électrophiles détoxifiés par l'utilisation du GSH sont générés (Das et al., 2018).

Cependant, l'excès des ERO résultant de la rupture de l'équilibre du statut antioxydant de l'organisme, ainsi que les substances toxiques contenues dans le TSF notamment la nicotine et les nitrosamines spécifiques du tabac aboutit à une inflammation locale et à des dommages tissulaires importants au niveau du foie (Velayutharaj et al., 2013 ; Bagchi et al., 1998 ; 1994) et des poumons (Schivo et al., 2014 ; Kumari et al., 2013 ; Boffetta et al., 2008).

Nos résultats prouvent que la co-exposition Ova/TSF a significativement diminué les niveaux de GSH et l'activité de la GPx dans le poumon par rapport au groupe sensibilisé à l'Ova. Ainsi, la toxicité du TSF dans divers organes, en particulier les poumons, pourrait être due à la formation de l'espèce radicale. La surproduction de ces radicaux a un effet inhibiteur sur les enzymes responsables de leur élimination, comme la GPx (Avti et al., 2006). Ainsi, sa diminution est le reflet de son utilisation intense dans les deux situations de stress cellulaire, à savoir celles de l'inflammation allergique et de l'administration du tabac.

L'administration de la combinaison Ova/TSF au cours de cette étude a provoqué une augmentation très hautement significative ($P < 0,001$) du taux de MDA dans les érythrocytes et les poumons et une augmentation hautement significative ($P < 0,01$) dans le foie en comparant au groupe témoin. Ainsi, on note une augmentation significative ($P < 0,05$) de la peroxydation lipidique dans les poumons par rapport aux rats sensibilisés par l'ovalbumine.

Cette élévation importante de la peroxydation lipidique est due à la surproduction des ERO qui sont responsables des lésions tissulaires notamment au niveau des poumons comme le montrent nos résultats (voir l'étude histologique plus loin). Ceci peut expliquer comment les nitrosamines du TSF entraînent des changements inflammatoires même lorsqu'ils ne sont pas brûlés ou volatilisés (Schivo et al., 2014 ; Boffetta et al., 2008).

Egalement, on enregistre une diminution hautement et très hautement significative des enzymes antioxydantes : GPx, SOD et CAT dans les érythrocytes, le foie et les poumons des rats recevant la combinaison Ova/TSF par rapport aux rats témoins. De même, on remarque surtout une diminution significative ($P < 0,05$) de l'activité de la GPx dans le foie par rapport aux rats sensibilisés par l'ovalbumine, et une diminution hautement significative ($P < 0,01$) de l'activité de la SOD dans le foie par rapport aux rats traités seulement par le TSF.

Plusieurs études ont montré que la co-exposition des rats à l'ovalbumine et à la fumée de cigarette facilite la sensibilisation et le développement de l'asthme (Lanckacker et al., 2013 ; Robays et al., 2007 ; Min et al., 2007 ; Moerloose et al., 2005). Ainsi, nos résultats suggèrent que le TSF peut aussi jouer un rôle important dans l'aggravation de l'inflammation allergique par l'amplification de l'état du stress oxydant cellulaire par rapport aux rats sensibilisés par l'ovalbumine.

Par ailleurs, le traitement des rats par l'huile de *Nigella sativa* a entraîné une amélioration importante, constatée via le taux du MDA, et les activités enzymatiques de la GPx, de la SOD et de la CAT dans les érythrocytes, le foie et les poumons qui reviennent à la normale. En fait, NS empêche la formation des ERO, entraîne la réduction de peroxydation lipidique et stimule le système de défense antioxydant (Tayman et al., 2013 ; Krishnan et Muthukrishnan, 2012 ; Yaman et Balikci, 2010). D'ailleurs, plusieurs études récentes ont attribué l'activité antioxydante de NS à sa teneur polyphénolique totale (Poursalehi et al., 2018 ; Bouasla et al., 2014). Ils ont signalé que l'activité antioxydante des polyphénols est liée à leur capacité de chélater les ions et d'éliminer les ERO (Ahmad et al., 2013 ; Bourgou et al., 2008).

Concernant le pouvoir antioxydant, *in vitro*, l'huile essentielle de NS et de ses composés (thymoquinone, carvacrol et trans-anéthol) ont démontré un grand pouvoir de réduire le radical DPPH• et d'inhiber la peroxydation lipidique et la dégradation du désoxyribose par le radical hydroxyle (Burits et Bucar, 2000). L'extrait méthanolique et ses fractions (hexane, acétate d'éthyle, et la fraction aqueuse) ont montré aussi un pouvoir antioxydant considérable vis-à-vis du DPPH• et dans le système de β -carotène/acide linoléique (Mariod et al., 2009). D'autre part, il a été établi que l'huile fixe brute et ses fractions chromatographiques (Phospholipides, glycolipides et lipides neutres) sont capables de piéger les radicaux libres DPPH• et galvinoxyl dans un ordre décroissant respectivement (Ramadan et al., 2003). *In vivo*, l'huile essentielle et la thymoquinone exercent des effets antioxydants protecteurs contre les lésions induites par l'ischémie /reperfusion, la toxicité de l'éthanol sur l'estomac, et aussi la toxicité du tétrachlorure de carbone (CCL₄) sur le foie et les globules rouges chez les rats (Al-Majed et al., 2006 ; Kanter et al., 2005 ; Ilhan et Seçkin, 2005).

En plus de son pouvoir antioxydant, plusieurs études sur des modèles d'asthme expérimental ont mis en évidence les propriétés anti-inflammatoires de *Nigella sativa* : par l'inhibition de la phase retardée de l'hypersensibilité ainsi que la prolifération des lymphocytes T (Shahzad et al., 2009) ; l'atténuation de l'inflammation dans les poumons par une diminution significative du nombre des éosinophiles dans le sang périphérique (Abdel-Aziz et al., 2014) ;

l'amélioration significative des altérations ultrastructurales des poumons qui se traduisent par une réduction de la taille alvéolaire, un épaississement des parois alvéolaires, une infiltration cellulaire et une congestion des capillaires sanguins, aussi bien qu'une augmentation significative du nombre des pneumocytes de type II et des corps lamellaires (Keyhanmanesh et al., 2014 ; Mahmoud, 2012).

Plusieurs études ont prouvé le potentiel immuno-modulateur de l'huile de NS chez les rats sensibilisés par l'ovalbumine. Balaha et al. (2012) ont noté une diminution significative de l'hyperréactivité des voies aériennes, du nombre des leucocytes totaux, des macrophages et des éosinophiles, des niveaux d'IL-4, IL-5 et IL-13 dans le liquide du lavage broncho-alvéolaire (LBA), des taux sériques des IgE totales, des IgE et IgG₁ spécifiques à l'ovalbumine. Il a également été montré par ces mêmes auteurs une augmentation significative du niveau d'IFN- γ dans le liquide du LBA, du taux sérique des IgG_{2a}, indiquant la restauration de la balance locale Th1/Th2.

Néanmoins, le prétraitement par NS chez des rats co-exposés Ova/TSF a entraîné une amélioration significative des niveaux de GSH dans les poumons. Tout comme le prétraitement avec NS a donné lieu à une augmentation significative de l'activité de GPx chez les rats exposés à l'Ova, au TSF et à la combinaison Ova/TSF. Ceci suggère que NS peut avoir un effet protecteur contre l'oxydation par la propriété de piégeage « scavenger » des radicaux libres due à son contenu en biomolécules actives, notamment en thymoquinone, connu pour ces effets antioxydants largement rapportés dans la littérature (Alenzi et al., 2013 ; Yaman et Balikci, 2010). En effet, il a déjà été rapporté dans la littérature que les substances phytochimiques stimulent la synthèse d'enzymes antioxydantes et des systèmes de détoxification au niveau transcriptionnel (Krishnan et Muthukrishnan, 2012).

Par ailleurs, le traitement des rats par l'huile de NS suite à l'administration du TSF induit un rétablissement du statut antioxydant qui se traduit par une diminution significative de la peroxydation lipidique dans les érythrocytes, le foie et les poumons comparativement aux rats traités seulement par le TSF. Ainsi, on note une augmentation significative de l'activité enzymatique de la GPx dans le foie, de la SOD dans le foie et les érythrocytes et de la CAT dans les érythrocytes.

Cette amélioration est due au pouvoir antioxydant de NS contre le stress oxydant provoqué par les xénobiotiques contenus dans le tabac. En effet, plusieurs études ont démontré le rôle protecteur de NS sur le stress oxydant et les dommages tissulaires causés par différentes substances toxiques comme le tabac à fumer (El-Sakkar et al., 2006 ; Keyhnamanesh et al.,

2014), l'hyperoxie (Tayman et al., 2013) ; le chlorure d'aluminium (Bouasla et al., 2014), l'éthanol (Develi et al., 2014), le soufre (Boskabady et al., 2011).

D'autre part, les propriétés anti-inflammatoires exercées par *Nigella sativa* aboutissent à la diminution du nombre des cellules inflammatoires dans les organes cibles (Keyhanmanesh et al., 2009 ; Salem et al., 2005). Ceci mène également à la diminution des ERO secrétés par ces cellules et donc empêche les lésions tissulaires engendrés par l'attaque des ERO aux constituants cellulaires (Sedgwick et al., 1990).

Enfin, le haut pouvoir antioxydant de l'huile de *Nigella sativa* est confirmé dans la présente étude par une diminution significative du taux de MDA et une augmentation significative de l'activité de la GPx, la SOD et la CAT dans les érythrocytes, le foie et les poumons des rats recevant la combinaison Ova/TSF et traités par NS comparativement aux rats recevant seulement la combinaison Ova/TSF.

Parmi les antioxydants retrouvés en cas de stress, les thiols non protéiques (NPSH) sont présents à forte concentration car ils jouent un rôle crucial dans la protection du poumon contre le stress oxydant par la détoxification des composés toxiques exogènes et endogènes, et l'extinction des ERO (Rahman et MacNee, 1999 ; Heffner et Rapine, 1989). Dans notre présente étude, les niveaux de NPSH diminuent significativement dans les poumons des rats co-exposés Ova/TSF par rapport aux rats sensibilisés à l'Ova. En effet, diverses études de recherche expérimentale (Luchese et al., 2007 ; Ardite et al., 2006 ; Ardite et al., 2006) ont démontré que l'exposition au tabac induit la déplétion de NPSH dans les poumons des rats. Cependant, l'administration de NS a entraîné une augmentation significative de NPSH chez les rats exposés à l'Ova, au TSF et co-exposés Ova/TSF. Les résultats sont en accord avec de nombreuses études antérieures qui ont démontré que la supplémentation en antioxydants tels que le diphenyle disélénium (Menezes et al., 2013), le sélénium (Elia et al., 2011) et la rutine (Pes et al., 2016) conduit à la restauration des taux de NPSH.

6 – L'oxyde nitrique (NO) :

Les concentrations sériques de NO ont révélé une augmentation significative chez les groupes Ova ($p<0,05$), TSF ($p<0,05$) et Ova/TSF ($p<0,01$) et une diminution significative du groupe traité par NS ($p<0,05$) par rapport au groupe témoin (figure 33a). Cependant, l'administration de NS a entraîné une amélioration significative chez les rats Ova-sensibilisés ($p<0,05$), TSF ($p<0,05$) et Ova/TSF ($p<0,001$) (figure 33a).

Concernant les niveaux de NO dans le liquide du LBA, on note une augmentation significative chez les lots Ova ($p<0,001$), TSF ($p<0,01$) et Ova/TSF ($p<0,001$) par rapport au groupe témoin. Ainsi, chez les rats co-exposés Ova/TSF, on note une augmentation significative ($p<0,05$) comparativement aux rats sensibilisés à l'Ova (figure 33b). Quant à l'administration de NS, elle a induit un rétablissement des niveaux de NO chez les groupes Ova ($p<0,001$), TSF ($p<0,05$) et Ova/TSF ($p<0,001$) (figure 33b).

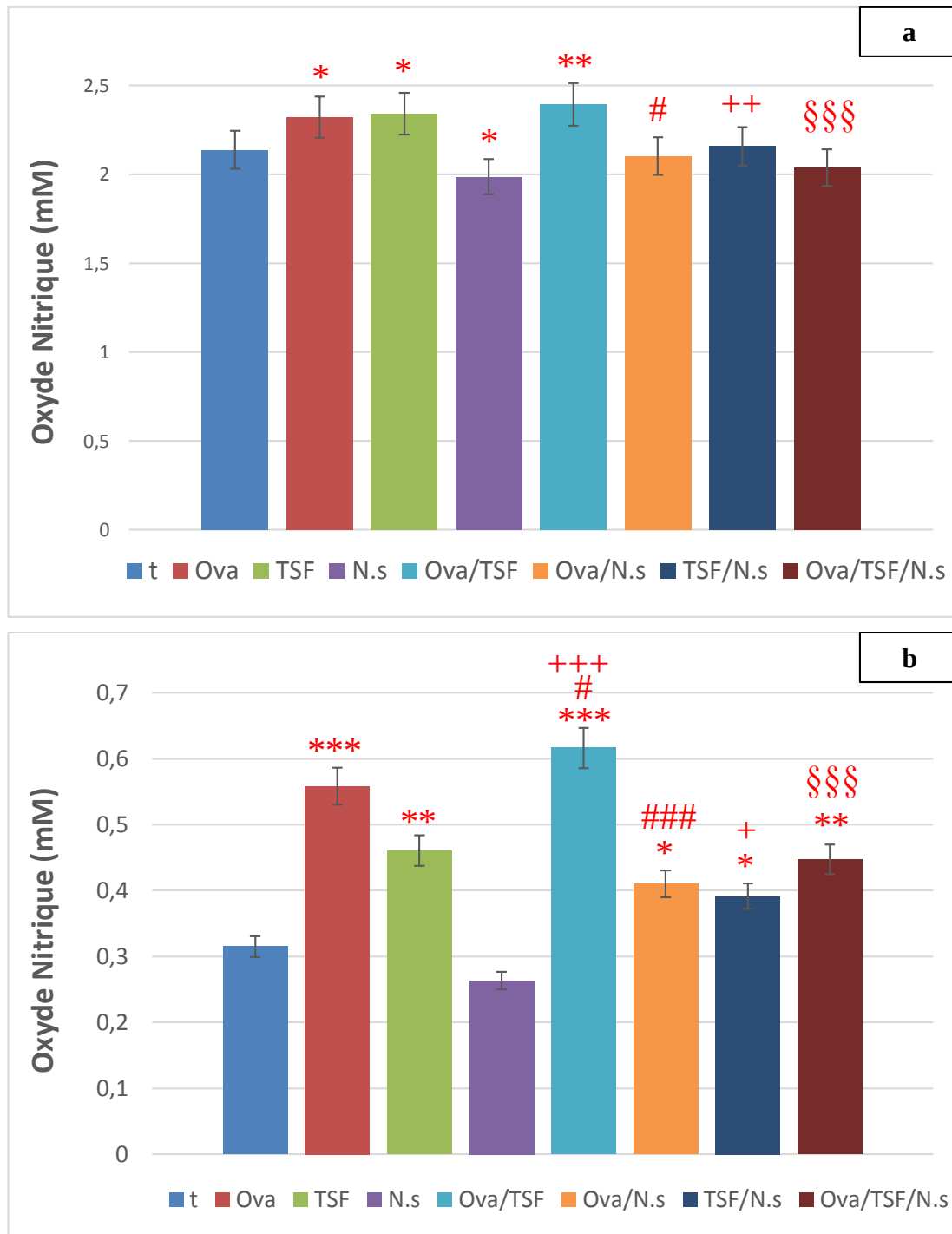


Figure 33 : Variation des taux de NO dans le sérum (a) et le liquide du LBA (b) chez les rats témoins et traités.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ comparativement aux rats témoins ;
 # $p \leq 0.05$; ### $p \leq 0.001$ comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine ;
 + $p \leq 0.05$; ++ $p \leq 0.01$; +++ $p \leq 0.001$ comparativement aux rats traités par le tabac ;
 §§§ $p \leq 0.001$ comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine et traités par le tabac.

7 - L'interleukine-4 (IL-4) :

Les taux sériques d'IL-4 indiquent une augmentation significative chez les groupes Ova ($p < 0,001$), TSF ($p < 0,01$) et Ova/TSF ($p < 0,001$) comparativement aux rats témoins (Figure 34a). Cependant, l'administration de NS aux animaux sensibilisés a entraîné une amélioration significative des taux d'IL-4 dans le groupe Ova/TSF ($p < 0,01$) et le groupe Ova ($p < 0,01$) (Figure 34a).

Les taux d'IL-4 dans le liquide du LBA ont également montré une augmentation significative chez les groupes Ova ($p < 0,001$), TSF ($p < 0,01$) et Ova/TSF ($p < 0,001$) comparativement aux rats témoins (Figure 34b). De plus, l'exposition combinée à l'Ova et au TSF a montré une augmentation significative par rapport aux rats sensibilisés par l'Ova ($p < 0,01$) et exposés au TSF ($p < 0,001$).

Cependant, l'administration de NS aux animaux sensibilisés a entraîné une amélioration significative des taux d'IL-4 dans le groupe sensibilisé Ova ($p < 0,01$), dans le groupe TSF ($p < 0,05$) et dans le groupe co-exposé Ova/TSF ($p < 0,001$) (Figure 34b).

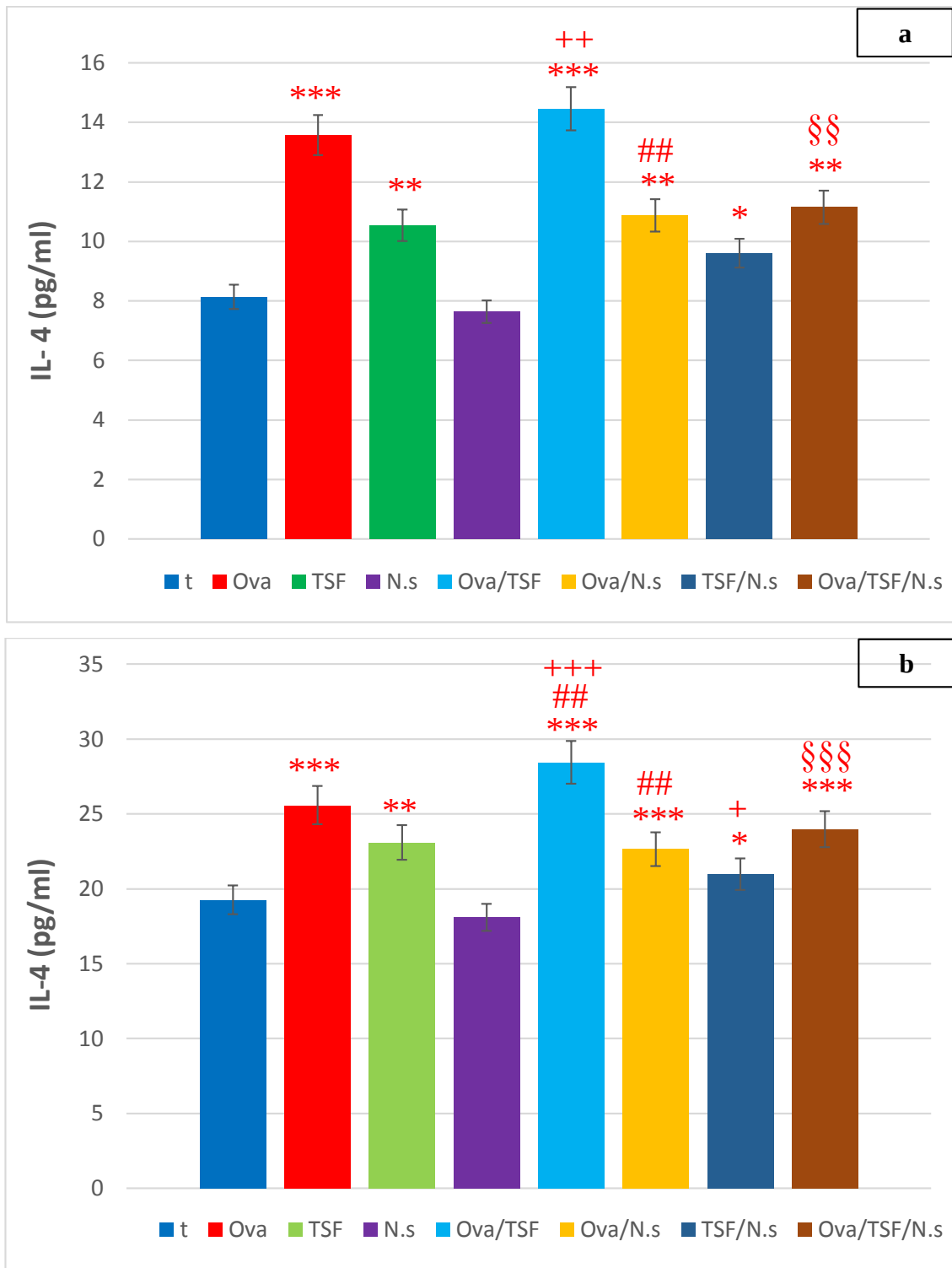


Figure 34 : Variation de taux de l'IL-4 dans le sérum (a) et le liquide du LBA (b) chez les rats témoins et traités.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ comparativement aux rats témoins ;

$p \leq 0.01$ comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine ;

+ $p \leq 0.05$; ++ $p \leq 0.01$; +++ $p \leq 0.001$ comparativement aux rats traités par le tabac ;

§§ $p \leq 0.01$; §§§ $p \leq 0.001$ comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine et traités par le tabac.

8 - Le nombre de cellules et les niveaux de protéines totales dans le liquide du LBA :

La numération cellulaire a révélé que le liquide du LBA des rats sensibilisés à l'Ova ou traités au TSF contient un nombre significativement diminué de cellules totales, de leucocytes et de monocytes, par rapport à celui des animaux témoins. Par contre, on note une augmentation significative du nombre de granulocytes dans les lots Ova, TSF et Ova/TSF par rapport au groupe témoin.

Il y a aussi une augmentation très hautement significative du nombre de lymphocytes chez les rats sensibilisés à l'Ova et Ova/TSF.

Quant à l'administration de NS aux animaux sensibilisés, elle a entraîné une amélioration hautement significative du nombre total de cellules dans le lot Ova/Ns comparativement au lot Ova, dans le lot TSF/Ns comparativement au lot TSF et une augmentation très hautement significative dans le lot Ova/TSF comparativement au lot Ova/TSF. Egalement, on note une amélioration hautement significative des leucocytes dans le lot Ova/Ns comparativement au lot Ova et dans le lot Ova/TSF/Ns comparativement au lot Ova/TSF. Ainsi, on enregistre une augmentation significative des monocytes dans le lot Ova/Ns comparativement au lot Ova et une augmentation hautement significative dans le lot Ova/TSF/Ns comparativement au lot Ova/TSF. Enfin, on note une augmentation hautement significative des monocytes dans le lot Ova/Ns comparativement au lot Ova et une augmentation significative des granulocytes dans le lot Ova/TSF/Ns comparativement au lot Ova/TSF, mais n'a pas affecté le nombre des lymphocytes (tableau 11).

Par ailleurs, on note une augmentation significative des niveaux de protéines totales dans le liquide du LBA chez les groupes Ova, TSF et Ova/TSF comparativement au groupe témoin.

L'administration de NS n'a révélé une amélioration significative que chez les rats du groupe Ova/TSF (Tableau 11), comparativement au groupe Ova/TSF.

Tableau 11 : Variation du nombre des cellules et des niveaux des protéines totales dans le LBA des rats témoins et traités.

Traitements	Paramètres					
	Cellules totales (x10 ³ /μl)	Leucocytes (x10 ³ /μl)	Lymphocytes %	Monocytes %	Granulocytes %	Protéines totales (mg/l)
T	01.63 ± 00.09	00.80 ± 00.05	36.66 ± 01.04	10.15 ± 00.63	53.18 ± 01.34	01.38 ± 00.07
Ova	00.92 ± 00.09***	00.47 ± 00.05***	43.36 ± 01.38***	03.80 ± 00.68***	59.30 ± 01.55**	01.84 ± 00.15***
TSF	01.20 ± 00.11**	00.60 ± 00.03**	34.88 ± 01.44	07.25 ± 00.70**	57.86 ± 01.45**	01.69 ± 00.13*
NS	01.71 ± 00.10	00.76 ± 00.04	37.10 ± 01.25	08.40 ± 00.44*	54.50 ± 01.66	01.47 ± 00.04
Ova/TSF	01.02 ± 00.05***	00.52 ± 00.04***	42.82 ± 01.47***++	03.40 ± 00.67***++	58.44 ± 01.47**	02.14 ± 00.13***+
Ova/NS	01.38 ± 00.10*##	00.65 ± 00.04*##	40.10 ± 00.96**	05.75 ± 00.48***#	54.74 ± 00.86##	01.56 ± 00.07*
TSF/NS	01.65 ± 00.10++	00.73 ± 00.03++	38.95 ± 01.27+	07.83 ± 00.62**	54.11 ± 01.52+	01.51 ± 00.06
Ova/TSF/NS	01.50 ± 00.10§§§	00.71 ± 00.05§§	40.21 ± 01.47*	05.42 ± 00.43***§§	55.06 ± 00.84§	01.76 ± 00.08***§

* p ≤ 0.05 ; ** p ≤ 0,01 ; *** p ≤ 0,001 comparativement aux rats témoins ;

p ≤ 0.05 ; ## p ≤ 0,01 ; ### p ≤ 0,001 comparativement aux rats sensibilisés à l'ovalbumine ;

+ p ≤ 0.05 ; ++ p ≤ 0,01 ; +++ p ≤ 0,001 comparativement aux rats traités par le tabac ;

§ p ≤ 0.05 ; §§ p ≤ 0,01 ; §§§ p ≤ 0,001 comparant aux rats sensibilisés à l'ovalbumine et traités par le tabac.

- Discussion :

Dans la présente étude, nous rappelons que nous avons sélectionné un modèle animal d'asthme montrant toutes les caractéristiques principales de l'inflammation des voies respiratoires chez l'homme avec : augmentation des taux des cytokines Th2, augmentation de la réactivité bronchique, inflammation éosinophilique des voies aériennes, hypertrophie des cellules caliciformes et hyperplasie (Balaha et al., 2012).

Dans ces conditions, l'IL-4 est nécessaire à la différenciation des lymphocytes T en Th2. C'est aussi un facteur clé de la substitution isotypique des IgE dans les cellules B (Boumendjel et al., 2006), de la régulation des chimiokines nécessaires à la migration des éosinophiles (Bochner et al., 1994), et peut augmenter la sécrétion de mucus dans les voies aériennes bronchiques (Temann et al., 1997). Il s'agit donc dans ce cas de la cytokine proinflammatoire par excellence. Tout comme, des études antérieures (Petro et Zhang, 1997 ; Goud et al., 1993) ont confirmé que les composants de l'extrait du TSF peuvent influencer la production de cytokines par le biais de l'activation des cellules T.

En effet, les résultats obtenus ont révélé que la co-exposition Ova/TSF induit une augmentation significative des niveaux d'IL-4 mais aussi ceux du NO dans le liquide du LBA par rapport aux rats sensibilisés. Cependant, l'administration de NS a montré une amélioration significative par rapport aux rats co-exposés Ova/TSF.

En effet, le NO est une molécule de signalisation responsable de plusieurs processus physiologiques et physiopathologiques. Les conditions respiratoires associées à l'inflammation, comme l'asthme, le syndrome de détresse respiratoire de l'adulte ou la bronchiectasie, sont généralement associées à l'induction de l'oxyde nitrique synthase et à la production accrue d'oxyde nitrique dans les poumons (Vliet et al., 2000). De nombreuses études antérieures ont associé l'expression de NO avec des patients souffrant d'asthme (Oh et al., 2003 ; Mahut et al., 2004) et ceux avec l'asthme induit par l'Ova chez les animaux de laboratoire (Suralkar et Kasture, 2013 ; Shahzad et al., 2009) avec un degré élevé chez les fumeurs de cigarettes ayant cette maladie (Jang et al., 2002).

Par ailleurs, Boskabady et al. (2011) ont rapporté que l'extrait hydroéthanolique de graines de *N. sativa* supprime la production d'IL-4 et améliore la production d'IFN- γ dans le sang des cobayes sensibilisés. De plus, Balaha et al. (2012) ont clairement démontré que le traitement oral par la NS inhibait la production de cytokines Th2 (IL-4, IL-5 et IL-13) et compensait la production réduite de cytokines Th1 (IFN- γ) dans le liquide du LBA après la sensibilisation antigénique des souris.

En outre, comme indiqué dans la littérature, la production de NO est également influencée par la présence de différents alcaloïdes (nigellidine, nigellimine et nigellicine) contenus dans l'huile de NS (Shahzad et al., 2009 ; Mahmood et al., 2003).

8 – Etude histologique :

8.1 – Le tissu pulmonaire :

L'examen histopathologique des poumons des rats sensibilisés à l'Ova, exposés au TSF et Ova/TSF-co-exposés, montré dans la figure 35, a révélé une infiltration cellulaire inflammatoire (flèche jaune), une hyperplasie des cellules caliciformes (flèche rouge) avec hypersécrétion de mucus (cercle).

Cependant, l'administration de NS a révélé une réduction de l'infiltration cellulaire inflammatoire (flèche blanche), un plus petit degré d'hyperplasie des cellules caliciformes (étoiles) et une morphologie normale des cellules par rapport aux groupes exposés à Ova, TSF et Ova/TSF-co-exposés. En outre, aucune altération histologique n'a été observée dans le poumon du groupe traité par NS par rapport au témoin.

8.2 – Le tissu hépatique :

L'examen histopathologique du foie des rats exposés à Ova, TSF et Ova/TSF, montré dans la figure 36, a révélé une infiltration cellulaire inflammatoire (flèche jaune) avec des modifications dégénératives des hépatocytes (cercle), une perte de l'organisation typique du cordon hépatique et une dilatation sinusoidale (flèche rouge).

En revanche, l'administration de NS a révélé une réduction de l'infiltration cellulaire inflammatoire (flèche blanche), un degré moindre de dilatation sinusoidale (étoile) et la morphologie des cellules normales par rapport aux groupes Ova-sensibilisés, TSF-exposés et Ova/TSF co-exposés. En outre, aucune altération histologique n'a été observée dans le foie du groupe traité par NS par rapport au témoin.

8.3 – Le tissu rénal :

L'examen histopathologique des reins des rats sensibilisés par l'Ova, TSF exposés et Ova/TSF co-exposés, montré dans la figure 37, a révélé un espace de Bowman réduit (flèche jaune), des glomérules de Malpighi atrophiés et effondrés (flèche rouge) et une congestion (cercle).

Cependant, l'administration de NS a révélé une réduction de l'espace de Bowman (flèche blanche), un moindre degré de congestion (étoile) et une morphologie normale des cellules par rapport aux groupes exposés Ova, TSF et Ova/TSF. En outre, aucune altération histologique n'a été observée dans le rein du groupe traité par NS par rapport au témoin.

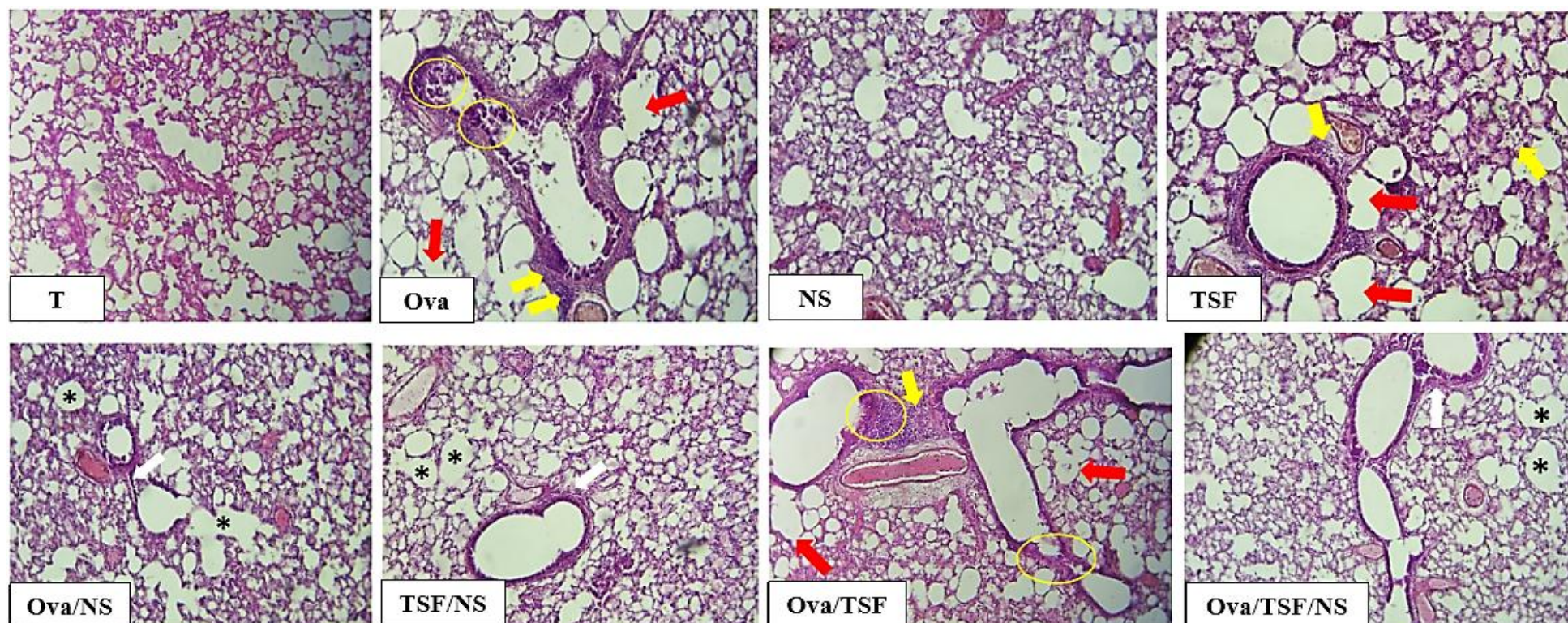


Figure 35 : Photomicrographies de sections colorées H & E du poumon ($\times 400$). Celle du rat témoin (T) ainsi que celle du rat traité uniquement avec NS montrent une structure histologique normale. Celles des rats Ova-sensibilisé et OVA/TSF co-exposés montrent une infiltration cellulaire inflammatoire (flèches jaunes), une hyperplasie des cellules caliciformes (flèches rouges), une hypersécrétion de mucus (cercles). Celles des rats traités avec NS montrent une réduction de l'infiltration cellulaire inflammatoire (flèches blanches), un plus petit degré d'hyperplasie des cellules caliciformes (étoiles) et une morphologie des cellules normales par rapport au groupe témoin.

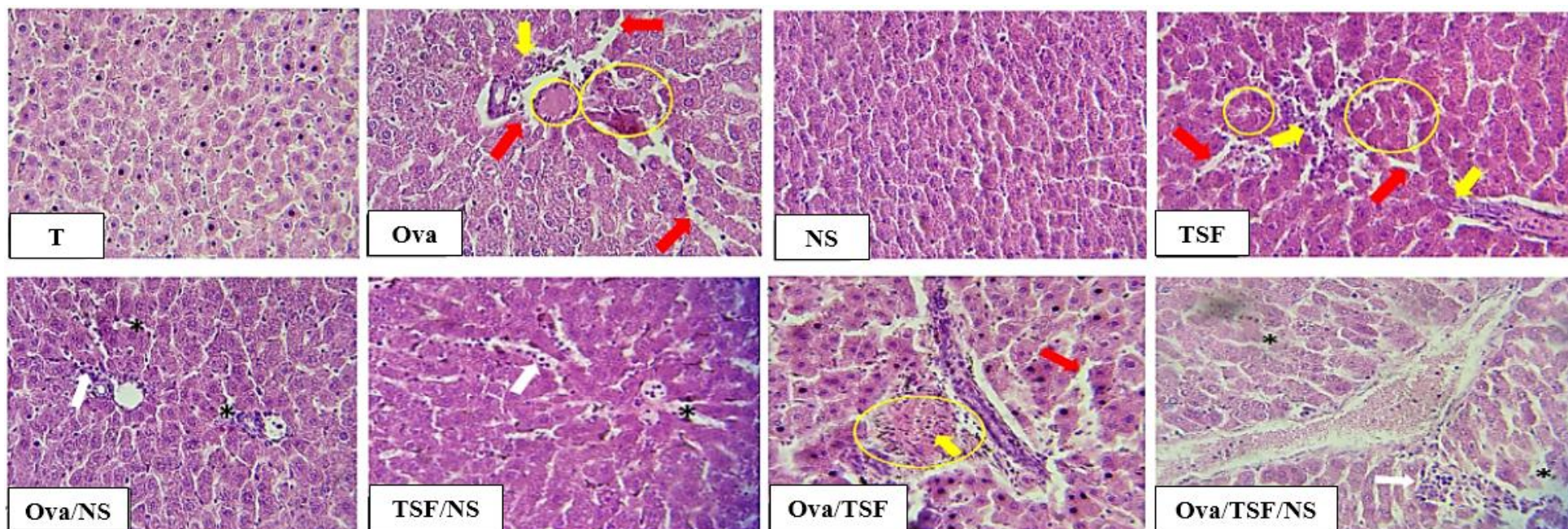


Figure 36 : Photomicrographies de sections colorées H & E du foie ($\times 400$). Celle du rat témoin (T) ainsi que celle du rat traité uniquement avec NS montrent une structure histologique normale. Celles des rats Ova-sensibilisé, TSF exposé et Ova/TSF co-exposé montrent l'infiltration des cellules inflammatoires (flèches jaunes) avec des changements dégénératifs dans les hépatocytes (cercles), une perte d'organisation des cordes hépatiques typiques et une dilatation sinusoidale (flèches rouges). Celles des rats co-administrés avec NS montrent une réduction de l'infiltration des cellules inflammatoires (flèches blanches), un degré moindre de dilatation sinusoidale (étoiles) et une morphologie normale des cellules par rapport au groupe témoin.

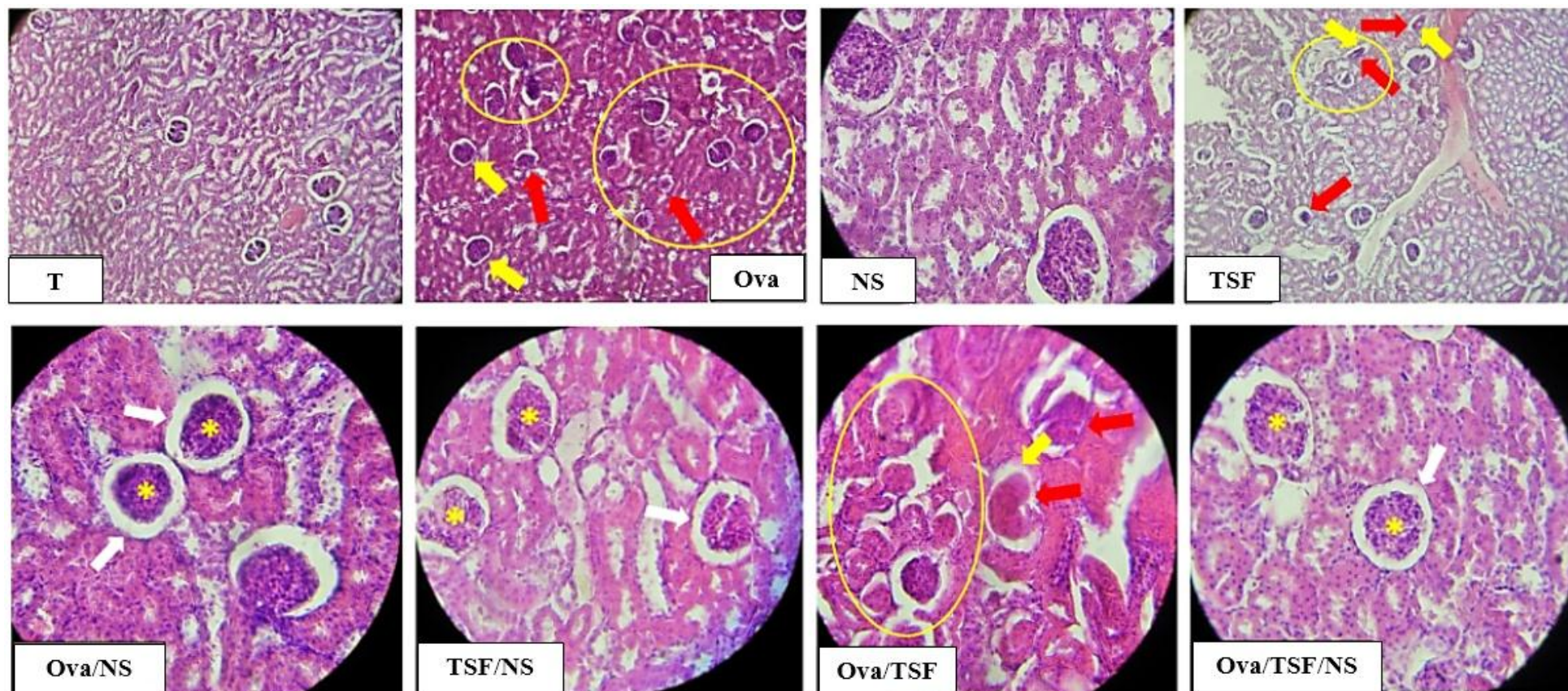


Figure 37 : Photomicrographies de sections colorées H & E du rein [$\times 100$ (t, Ova, Ns, TSF) et $\times 400$ (Ova/Ns, TSF/Ns, Ova/TSF, Ova/TSF/Ns)]. Celle du rat témoin (T) ainsi que celle du rat traité uniquement avec NS montrent une structure histologique normale. Celles des rats Ova-sensibilisé, TSF exposé et Ova/TSF co-exposé montrent l'espace de Bowman réduit (flèches jaunes), les glomérules de Malpighi atrophiés et effondrés (flèches rouges) et une congestion (cercles). Celles des rats co-administrés avec NS montrent une réduction de l'espace de Bowman (flèches blanches), un degré moindre de congestion (étoiles) et une morphologie normale des cellules par rapport aux groupes exposés Ova, SFT et Ova / TSF.

- Discussion :

C'est ainsi que nous avons terminé cette investigation par l'étude histopathologique des organes clés étudiés précédemment. Il en ressort qu'en ce qui concerne le poumon et d'une façon générale tous les résultats précédents sont en accord avec nos observations microscopiques. En fait, les données de la littérature ont permis de démontrer que la contraction, l'épaississement et l'anomalie du muscle lisse des voies aériennes sont principalement responsables de l'hyperréactivité des voies aériennes dans l'asthme (Balaha et al., 2012). Aussi, la provocation intranasale avec l'Ova est connue pour provoquer une hyperplasie des cellules caliciformes, une hypersécrétion de mucus et des cellules inflammatoires infiltrées dans les tissus pulmonaires (Chekchaki et al., 2017 ; Zemmouri et al., 2017).

C'est ainsi que l'exploration histopathologique pulmonaire dans cette présente étude a montré une infiltration cellulaire inflammatoire, une hyperplasie des cellules caliciformes et une hypersécrétion de mucus non seulement chez les rats traités par l'Ova mais aussi chez ceux traités par la combinaison Ova/TSF. De plus, la libération de divers médiateurs inflammatoires comme l'IL-4 a été confirmée comme jouant un rôle vital dans l'hypersécrétion de mucus et l'hyperplasie des cellules caliciformes (Kandhare et al., 2013).

Par ailleurs, les paramètres biochimiques sont compatibles avec les observations histopathologiques du foie dans la présente étude. En fait, l'histoarchitecture hépatique des rats exposés au TSF et co-exposés Ova/TSF ont présenté une infiltration de cellules inflammatoires avec des changements dégénératifs, la perte de l'organisation des cordes hépatiques typiques et la dilatation sinusoidale. En conséquence, les hydroperoxydes accumulés dans le foie ont assurément provoqué une cytotoxicité associée à la peroxydation des phospholipides membranaires. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par d'autres études qui ont démontré que le TSF produisait des changements histopathologiques et enzymatiques au niveau du tissu hépatique chez les rats (Avti et al., 2006).

Toutefois, les effets du TSF sont moins importants que ceux retrouvés dans la littérature et ce probablement car nous avons considéré dans notre présente étude une exposition à court terme contrairement aux travaux de Avti et al (2006) et Bagchi et al (1994).

Quant à l'activité hépato-protectrice de NS, elle a été démontrée chez les rats des lots auxquels une toxicité hépatique a été infligée soit sous l'effet de la sensibilisation allergénique soit sous l'effet du tabac, à savoir les lots Ova, TSF et Ova/TSF. Ceci suggère que NS, grâce à ses constituants phénoliques, peut protéger contre l'oxydation et les dommages membranaires cellulaires hépatiques via la propriété de piégeage des radicaux libres (Krishnan et al., 2012 ; Kim et al., 2007 ; Masella et al., 2005).

CONCLUSION

Conclusion :

Nos expérimentations ont été effectuées dans un premier temps dans le but d'évaluer les effets de l'administration d'un extrait aqueux de tabac sans fumée à une dose de 40 mg/kg pendant 15 jours sur l'état de l'inflammation allergique, du stress oxydant et la cytotoxicité chez des rats wistar préalablement sensibilisés à l'ovalbumine. Puis, il s'agissait de confirmer le potentiel protecteur et thérapeutique anti-inflammatoire, antioxydant et au final antiasthmatique de l'huile de *Nigella sativa* administrée à raison de 4 ml/kg/jour contre les effets délétères causés par la sensibilisation allergique et/ou le tabac sans fumée.

Dans ce contexte, nous avons appréhendé l'inflammation allergique via plusieurs paramètres parmi lesquels : le dosage de l'IL-4 et l'oxyde nitrique, aussi bien dans la circulation générale mais aussi au niveau des poumons (liquide du LBA). Les résultats obtenus ont démontré que le TSF aggrave le syndrome inflammatoire chez les rats sensibilisés, ce qui est traduit par l'augmentation de ces deux paramètres et surtout par l'envahissement des voies aériennes par les cellules inflammatoires. Aussi, nos résultats montrent clairement une perturbation du système de défense antioxydant avec un important état d'inflammation particulièrement au niveau hépatique et pulmonaire révélé par l'étude histologique mais aussi, d'une part, par l'augmentation de la peroxydation lipidique et de l'oxydation des protéines, et d'autre part, via l'épuisement du système de défense moléculaire et enzymatique. Ceci suggère que le déséquilibre de la balance entre les radicaux libres et les systèmes antioxydants, en faveur des premiers, est l'une des causes principales de l'installation et l'exacerbation de l'asthme allergique.

De plus, l'exploration fonctionnelle hépatique et rénale montre que ces deux organes sont des cibles privilégiées des substances toxiques contenues dans le TSF. Ceci est particulièrement confirmé par les résultats de l'étude histologique, qui montre un état inflammatoire et des changements structuraux importants. La consommation de TSF a donc des conséquences néfastes sur la santé, notamment chez les individus sensibilisés. Aussi, en extrapolant à l'humain, il nous semble capital de sensibiliser la population sur ses effets dangereux, particulièrement sur un terrain atopique.

En fin, la supplémentation en huile de *Nigella sativa* aux rats sensibilisés et/ou traités par le TSF a amélioré l'état inflammatoire par le rétablissement des niveaux de l'IL-4, de NO et par

une réduction de l'infiltration cellulaire inflammatoire dans les voies aériennes. De ce fait, on enregistre une restauration de l'état de stress oxydant après l'administration de NS, révélée d'une part par la diminution de la peroxydation lipidique et de l'oxydation protéique et d'autre part, par le renforcement du système de défense antioxydant moléculaire et enzymatique. Les effets anti-inflammatoires et antioxydants de NS sont affirmés par une réduction de l'infiltration cellulaire inflammatoire, un plus petit degré d'hyperplasie des cellules caliciformes et la morphologie normale des cellules. Ainsi, grâce à sa richesse en composés bioactifs, l'huile de nigelle a eu un effet bénéfique vis à vis de la sensibilisation allergénique et un effet protecteur contre la cytotoxicité du TSF.

En perspective, Il s'avère intéressant d'approfondir ces travaux de recherche par :

- L'identification par CPG-SM du contenu de l'extrait aqueux du tabac sans fumée commercialisé en Algérie.
- la purification et la caractérisation des principes actifs contenus dans l'huile fixe de nigelle (*Nigella sativa*) cultivée en Algérie.
- L'étude de l'effet du TSF sur une population humaine, tout en approfondissant 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...), mais aussi l'étude des effets cancérogènes au niveau de la sphère ORL, notamment au niveau de la muqueuse buccale chez des consommateurs du TSF.
- L'élucidation des mécanismes de signalisation impliqués dans le processus inflammatoire, ainsi que les enzymes impliquées dans la production des espèces réactives de l'oxygène avec l'étude de l'expression de certains gènes importants (le glutathion et les métallothionéines) responsables de l'adaptation vis-à-vis du stress oxydatif induit par l'ovalbumine et le TSF toujours (ou l'un de ses constituants) en présence de l'huile de *Nigella sativa* ou de l'un de ses composés bioactifs isolément.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques :

A

- Abdel-Aziz M, Abass A, Zalata K, Abd Al-Galel T, Allam U, Karrouf G. 2014. Effect of dexamethasone and *Nigella sativa* on inducible nitric oxide synthase in the lungs of a murine model of allergic Asthma. Iran J Allergy Asthma Immunol. 13(5): 324-334.
- Adias T C, Ajugwo A O, Erhabor T A, Adejumo B I, Azikiwe C C. 2014. Effect of Sub-Lethal Doses of Smokeless Tobacco (Snuff) on Some Haemato Rheological Parameters Using Albino Wistar Rats. American Journal of Medical Sciences and Medicine 2(3): 54.
- Adkinson J. "The behavior of bronchial asthma as an inherited character." Genetics 5.4 (1920): 363-418.
- Aebi H. 1984. Catalase in vitro. Method Enzymol. 105: 121.
- Aftab A, Asif H, Mohd M, Shah A K, Abul K N, Nasir A S, Zoheir A D, Firoz A. 2013. A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. Asian Pac J Trop Biomed 3(5): 337-352.
- Ahmad S, Ahsan-ul-Haq, Yousaf M, Kamran Z I, Ata-ur-Rehman, Sohail M U, Shahid-ur-Rahman, 2013. Effect of feeding whole linseed as a source of polyunsaturated fatty acids on performance and egg characteristics of laying hens kept at high ambient temperature. Rev. Bras. Cienc. Avic. 15: 1.
- Ahn K S, Aggarwal B B. 2005. Transcription factor NF- κ B: a sensor for smoke and stress signals. Annals of the New York Academy of Sciences, 1056(1): 218-233.
- Alemi M, Sabouni F, Sanjarian F, Haghbeen K, Ansari S. 2013. Antiinflammatory effect of seeds and callus of *Nigella sativa* L. extracts on mix glial cells with regard to their thymoquinone content. AAPS Pharm Sci Tech. 14(1): 160-167.
- Alenzi F Q, Altamimi M A, Kujan O, Tarakji B, Tamimi W, Bagader O, Al-Shangiti A, Talohi A N, Alenezy A K, Al-Swailmi F, Alenizi D, Salem M L, Wyse R K. 2013. Antioxidant Properties of *Nigella sativa*. J Mol Genet Med 7(3): 77.
- Al-Gaby A M A. 1998. Amino acid composition and biological effects of supplementing broad bean and corn proteins with *Nigella sativa* (black cumin) cake protein. Die Nahrung. 42: 290-294.
- Al-Jassir S M. 1992. Chemical composition and microflora of black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds growing in Saudi Arabia. Food Chemistry 45: 239-42.

- Al Mofleh I A, Alhaider A A, Mossa J S, Al-Sohaibani M. O, Al-Yahya M A, Rafatullah S, Shaik S A. 2008. Gastroprotective effect of an aqueous suspension of black cumin *Nigella sativa* on necrotizing agents-induced gastric injury in experimental animals. Saudi journal of gastroenterology: official journal of the Saudi Gastroenterology Association, 14(3): 128.
- Al-Mukhaini N, Ba-Omar T, Eltayeb E, Al-Shihi A, Al-Riyami N, Al-Belushi J, Al-Adawi K. 2017. Liver and kidney toxicity induced by Afzal smokeless tobacco product in Oman. Tissue and Cell, 49(2): 307-314.
- Amin B, Hosseinzadeh H. 2016. Black Cumin (*Nigella sativa*) and Its Active Constituent, Thymoquinone: An Overview on the Analgesic and Anti-inflammatory Effects. Planta Med 82: 8–16.
- Al-Saleh I A, Billedo G, El-Doush I I. 2006. Levels of selenium, DL- α -tocopherol, DL- γ tocopherol, all-trans-retinol, thymoquinone and thymol in different brands of *Nigella sativa* seeds. Journal of Food Composition and Analysis. 19: 167-175.
- Asplund K. 2003. Smokeless tobacco and cardiovascular disease. Progress in cardiovascular diseases, 45(5), 383-394.
- Ardite E, Peinado V I, Rabinovich R A, Fernandez-Checa J C, Roca J, Barberà J A. 2006. Systemic effects of cigarette smoke exposure in the guinea pig. Resp. Med. 100(7): 1186.
- Atta-ur-Rahman, Malik S, Cun-heng H, Clardy J. 1985a. Isolation and structure determination of nigellicine, a novel alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. Tetrahedron letters. 26: 2759-2762.
- Atta-ur-Rahman, Malik S, Ahmed S, Choudhary M I, Habib-ur-Rehman. 1985b. Nigellimine-Noxide-a new isoquinoline alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. Heterocycles. 23: 935-955.
- Atta-ur-Rahman, Malik S, Hasan S S, Choudhary M I, Ni C-Z, Clardy J. 1995. Nigellidine, a new indazol alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. Tetrahedron Letters. 36:1993-1996.
- Atta-ur-Rahman, Malik S, Zaman K. 1992. Nigellimine, a new isoquinoline from the seeds of *Nigella sativa*. Journal of natural products. 55: 676-678.
- Avti P K, Kumar S, Pathak C M, Vaiphei K, Khanduja K L. 2006. Smokeless Tobacco Impairs the Antioxidant Defense in Liver, Lung, and Kidney of Rats, Toxicological Sciences 89(2), 547-553.

B

- Babusikova E, Jurecekova J, Evinova A. (Page consultée le 01 février 2015) Oxidative damage and bronchial asthma. <http://www.intechopen.com/books/respiratory-diseases/oxidative-damage-andbronchial-asthma>.
- Bagchi M, Balmoori J, Bagchi D, Stohs S J, Chakrabarti J, Das D K. 2002. Role of reactive oxygen species in the development of cytotoxicity with various forms of chewing tobacco and pan masala, *Toxicology* 179: 247-255.
- Bagchi M, Bagchi D, Hassoun E A, Stohs S J. 1998. Subchronic effects of smokeless tobacco extract (STE) on hepatic lipid peroxidation, DNA damage and excretion of urinary metabolites in rats. *Toxicology* 127 (1–3), 29-38.
- Bakathir H A, Abbas N A. 2011. Detection of the antibacterial effect of *Nigella sativa* ground seeds with water. *Afr J Tradit Compl Altern Med* 8(2): 159-164.
- Balaha M F, Tanaka H, Yamashita H, Abdel Rahman M N, Inagaki N. 2012. Oral *Nigella sativa* oil ameliorates ovalbumin-induced bronchial asthma in mice. *International Immunopharmacology* 14(2): 224.
- Bano T, Kumar N, Dudhe R. 2012. Free radical scavenging properties of pyrimidine derivatives. *Organic and medicinal chemistry letters*, 2(1), 34.
- Banerjee E R, William R, Henderson Jr. 2011. NADPH oxidase has a regulatory role in acute allergic asthma. *Journal of advanced laboratory research in biology*. 2, pp: 80 - 97.
- Barnes P J. 2008. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease, *nature reviews immunology*, volume 8, pp: 183-192.
- Beloued A. 1998. Plantes médicinales d'Algérie (279ème Ed). Office des publications universitaires (Alger) pp : 144.
- Benkaci A F, Baaliouamer A, Meklati B Y, Chemat F. 2007. Chemical composition of seed essential oils from Algerian *Nigella sativa* extracted by microwave and hydrodistillation. *Flavour & Fragrance Journal*. 22: 148-153.
- Berger P, et Tunon de Lara J-M. 2007. Mastocytes et asthme. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), *Pneumologie*, 6-039-A43.
- Beyer W F, Fridovich I. 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal Biochem*. 161(2): 559.
- Bhandarkar M R, Khan A. 2004. Antihepatotoxic effect of *Nymphaea stellata* willd., against carbon tetrachloride-induced hepatic damage in albino rats. *Journal of Ethnopharmacology* 91(1): 61.

- Bittkau C, Comes H P. 2005. Evolutionary processes in a continental island system: molecular phylogeography of the Aegean *Nigella arvensis* alliance (*Ranunculaceae*) inferred from chloroplast DNA. *Molecular Ecology* (14), pp. 4065-4083.
- Bochner B S, Undem B J, Lichtenstein L M. 1994. Immunological aspects of allergic asthma. *Annu Rev Immunol.* 12: 295.
- Boffetta P, Hecht S, Gray N, Gupta P, Straif K. 2008. Smokeless tobacco and cancer, *Lancet Oncology* 9: 667-75.
- Bonnier G. 1990. La grande flore en couleur. Ed Belin, Paris. Tome 1. pp: 17.
- Boskabady M H, Keyhanmanesh R, Khameneh S, Doostdar Y, Khakzad M R. 2011. Potential immunomodulation effect of the extract of *Nigella sativa* on ovalbumin sensitized guinea pigs. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 12(3): 201.
- Boskabady M H, Shiravi N. 2000. Inhibitory effect of *Nigella Sativa* on histamine (H₁) receptors of isolated guinea pig tracheal chains. *Eur Respir J.* 16:461s.
- Boskabady M H, Shirmohammadi B, Jandaghi P, Kiani S. 2004. Possible mechanism(s) for relaxant effect of aqueous and macerated extracts from *Nigella sativa* on tracheal chains of guinea pig. *BMC Pharmacology.* 4: 3-8.
- Boskabady M H, Shahabi M. 1997. Bronchodilatory and anticholinergic effects of *Nigella sativa* on isolated guinea-pig tracheal chains. *Iranian Journal of Medical Sciences.* 22: 127-133.
- Boskabady M H, Shirmohammadi B. 2002. Effect of *Nigella sativa* on isolated guinea pig trachea. *Archives of Iranian Medicine.* 5: 103-107.
- Boskabady M H, Javan H, Sajady M, Rakhshandeh H. 2007. The possible prophylactic effect of *Nigella sativa* seed extract in asthmatic patients. *Fundam Clin Pharmacol* 21(5): 559-566.
- Bouasla I, Bouasla A, Boumendjel A, Messarah M, Abdenmour C, Boulakoud M S, El Feki A. 2014. *Nigella sativa* oil reduces aluminium chloride-induced oxidative injury in liver and erythrocytes of rats. *Biological trace element research*, 162(1-3), 252-261.
- Bouguerne B. 2012. Conception et synthèse de dérivés phénoliques hautement fonctionnalisés et étude de leurs propriétés biologiques vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (athérosclérose). Thèse de doctorat. Université Toulouse, Toulouse, 198p.
- Boulet L P. 1997. L'asthme : Notions de base – éducation – intervention. Presses Université Laval. 388p.

- Boumendjel A, Tridon A, Messarah M, Ughettod S, Meharzia S, Boulakoud M S. 2012. Eosinophilic activity and bronchial hyperresponsiveness within an asthmatic paediatric population. *Allergol immunopathol (Madr)*, 40(5), pp: 301-305.
- Boumendjel A, Tawk L, Malefijt R W, Boulay V, Yssel H, Pène J. 2006. IL-27 induces the production of IgG1 by human B cells. *European Cytokine Network* 17(4): 281.
- Bourdin A, Doble A, Godard P. 2009. The Asthma Insights and Reality in the Maghreb (AIRMAG) study: perspectives and lessons. *Respiratory Medicine*, 103(2), pp: S38-S48.
- Bourgoin F. 2012. La contribution du stress oxydatif et de médiateurs inflammatoires dans les complications vasculaires, métaboliques et moléculaires induites chez le rat soumis à une alimentation riche en gras et en sucre, un modèle de résistance à l'insuline. Thèse de doctorat. Université Laval, Québec, 238 p.
- Bourgou S, Ksouri R, Bellila A, Skandrani I, Falleh H, Marzouk B. 2008. Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *Comptes Rendus Biologies*, 331(1), 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 Biochemie*. 72, 248-254.
- Breitling L P, Yang R, Korn B, Burwinkel B, Brenner H. 2011. Tobacco-smoking-related differential DNA methylation: 27K discovery and replication. *The American Journal of Human Genetics*, 88(4), 450-457.
- Buege J A, Aust S D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 52: 302.
- Bulani V, Biyani K, Kale R, Joshi U, Charhate K, Kumar D, Pagore R. 2011. Inhibitory effect of *Calotropis gigantea* extract on ovalbumin-induced airway inflammation and Arachidonic acid induced inflammation in a murine model of asthma. *Int J Cur Bio Med Sci.*, 1(2), 19-25.
- Burits M, Bucar F. 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy research*, 14(5): 323-328.
- Burtis C A, Ashwood E R, Bruns D E. 2006. *TIETZ Textbook of Clinical Chemistry and Molecular diagnostics*. Elsevier Inc, 702-708.
- Burtis C A, Ashwood E R, Bruns D E. 1999. "Tietz." *Texbook of Clinical Chemistry*, 3rd Edition, WB Saunders, Philadelphia, PA. 104-105.

C

- Chaby R, Garcia-Verdugo I, Espinassous Q, Augusto LA. 2005. Interactions between LPS and lung surfactant proteins. *Innate Immunity* 11(3): 181-185.
- Chehl N, Chipitsyna G, Gong Q, Yeo C J, Arafat H A. 2009. Anti-inflammatory effects of the *Nigella sativa* seed extract, thymoquinone, in pancreatic cancer cells. *HPB (Oxford)* 11 (5): 373-381.
- Cho S Y, et Moon H B. 2010. The role of oxidative stress in the pathogenesis of asthma. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2(3), pp: 183-87.
- Comhair S A, Erzurum S C. 2010. Redox control of asthma: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxidants& Redox Signaling*, 12 (1), pp: 93 -124.
- Convention-cadre de l'OMS pour la lutte antitabac. 2005. téléchargeable sur <http://whqlibdoc.who.int/publications/2003/9242591017.pdf?ua=1>.
- Le Comité Permanent des Recherches Scientifiques et de la Délivrance des Fatwas (Al-Iftâ'). Fatwa numéro 21599, Numéro de la partie: 11, Numéro de la page: 170. Date 08/10/2000. <http://www.alifta.net/Fatawa/fatawaChapters.aspx?language=fr&View=Page&PageID=14524&PageNo=1&BookID=9> page consultée le 12/03/2018.
- Crow J P, Sampson J B, Zhuang Y, Thompson J A, Beckman J S. 1997. Decreased zinc affinity of amyotrophic lateral sclerosis-associated superoxide dismutase mutants leads to enhanced catalysis of tyrosine nitration by peroxynitrite. *Journal of neurochemistry*, 69(5), 1936-1944.

D

- D'Amato G, Holgate S T, Pawankar R, Ledford D K, Cecchi L, Al-Ahmad M, Al-Enezi F, Al-Muhsen S, Ansotegui I, Baena-Cagnani C E, Baker D J, Bayram H, Bergmann K C, Boulet L P, Buters J T, D'Amato M, Dorsano S, Douwes J, Finlay S E, Garrasi D, Gómez M, Haahtela T, Halwani R, Hassani Y, Mahboub B, Marks G, Michelozzi P, Montagni M, Nunes C, Oh J J, Popov T A, Portnoy J, Ridolo E, Rosário N, Rottem M, Sánchez-Borges M, Sibanda E, Sienra-Monge J J, Vitale C, Annesi-Maesano I. 2015. Meteorological conditions, climate change, new emerging factors, and asthma and related allergic disorders. A statement of the World Allergy Organization. *World Allergy Organisation Journal*, 8(25), pp: 1-52.
- Dandrea T. 2003. Altered gene expression in the human airways during oxidative stress. Institut of Environmental Medecine, Division of Biochemical Toxicology and Experimental Carcinogenesis. Kaarolinska Institut, Stockholm, p 64.

- Dar El- Iftâ Egyptienne. Fatwa numéro 3699 : Le tabagisme. Date : 25/11/2008. <http://www.dar-alifta.org/ViewFatwa.aspx?ID=3699&LangID=3> page consultée le 12/03/2018.
- Das S, Langthasa P, Barhoi D, Upadhaya P, Giri S. 2018. Effect of Nutritional Status on Arsenic and Smokeless Tobacco Induced Genotoxicity, Sperm Abnormality and Oxidative Stress in Mice In Vivo. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 00: 00-00.
- Datau E, Surachmanto E, Pandelaki K, Langi J. 2010. Efficacy of *Nigella sativa* on serum free testosterone and metabolic disturbances in central obese male. *Acta Medica Indonesiana* 42(3):130-134.
- Delgado J, Barranco P, Quirce S. 2008. Obesity and Asthma. *J investig Allergol Clin Immunol*, 18(6), pp: 420-425.
- Devaki M, Nirupama R, Yajurvedi H N. 2011. Reduced antioxidant status for prolonged period due to repeated stress exposure in rat. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 7 (2): 139-147.
- Djeffal A, Messarah M, Boumendjel A, Kadeche L, El Feki A. 2012. Protective effects of vitamin C and selenium supplementation on methomyl-induced tissue oxidative stress in adult rats. *Toxicology and Industrial Health*. 31(1): 31-43.
- Doumas B T. 1971. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim. Acta*. 31: 87-96.
- Dubé J, Boulet L-P. 1996. Rôle de l'inflammation et des modifications des structures bronchiques dans l'asthme allergique. *Médecine Science*, 12, pp: 351-357.
- Dworski R. 2000. Oxidant stress in asthma. *Thorax*. (55) Suppl 2: S51-3.

E

- El-Abhar H S, Abdallah D M, Saleh S. 2003. Gastroprotective activity of *Nigella sativa* oil and its constituent, thymoquinone, against gastric mucosal injury induced by ischaemia/reperfusion in rats. *J Ethnopharmacol* 84(2-3): 251-258.
- El-Demerdash F M, Yousef M I, Radwan F M E. 2009. Ameliorating effect of curcumin on sodium arsenite-induced oxidative damage and lipid peroxidation in different rat organs. *Food and Chemical Toxicology*. 47, 249–254.
- El Gazzar M, El Mezayen R, Marecki J C, Nicolls M R, Canastar A, Dreskin S C. Anti-inflammatory effect of thymoquinone in a mouse model of allergic lung inflammation. *Int Immunopharmacol*. 2006; 6(7): 1135.

- Elia A C, Prearo M, Pacini N, Dorr A J, Abete M C. 2011. Effects of selenium diets on growth, accumulation and antioxidant response in juvenile carp. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74(2): 166.
- Eliasson B, Taskinen M R, Smith U. 1996. Long-term use of nicotine gum is associated with hyperinsulinemia and insulin resistance. *Circulation*. 1;94(5):878-81.
- El-Mahmoudy A, Matsuyama H, Borgan M A, Shimizu Y, El-Sayed M G, Minamoto N, Takewaki T. 2002. Thymoquinone suppresses expression of inducible nitric oxide synthase in rat macrophages. *Int Immunopharmacol* 2: 1603-1611.
- Ellman G L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem.* 82(1): 70.
- El Mezayen R, El Gazzar M, Nicolls M R, Marecki J C, Dreskin S C, Nomiyama H. 2006. Effect of thymoquinone on cyclooxygenase expression and prostaglandin production in a mouse model of allergic airway inflammation. *Immunol Lett* 106(1): 72-81.
- El-Obeid A, Al-Harbi S, Al-Jomah N, Hassib A. 2006. Herbal melanin modulates tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 6 (IL-6) and vascular endothelial growth factor (VEGF) production. *Phytomedicine* (13): 324-333.
- Eum S-Y. 1996. Rôle des éosinophiles dans l'hyperréactivité bronchique chez la souris. Thèse de doctorat, Université Paris XII, Paris, 196 p
- Euromonitor International. Country report: smokeless tobacco in Algeria. August 2010. Available by subscription from: <http://www.euromonitor.com>.

F

- Fahy J V. 2015. Type 2 inflammation in asthma – present in most, absent in many. *Nat Rev Immunol*, 15(1), pp: 57-65.
- Finco D R. 1997. Kidney function. In: Kaneko J J, Harvey J W, Bruce M L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic press, San Diego, California. 462478.

G

- Ghedira K. 2006. La nigelle cultivée : *Nigella sativa* L. (*Ranunculaceae*). *Phytothérapie*, 4: 1-7.
- Ghosh D, Botturi K, Pinot D, Lacoeyille Y, Gernez Y, Vervloet D, Magnan A. 2007. Lymphocytes TCD8⁺ : Implication dans l'asthme. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, 47, pp: 219-223.
- Ghosheh O A, Houdi A A, Crooks P A. 1999. High performance liquid chromatographic analysis of the pharmacologically active quinones and related compounds in the oil of

- the black seed (*Nigella sativa* L.). Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 19(5), 757-762.
- Gilani A H, Aziz N, Khurram I M, Chaudary K S, Iqbal A. 2001. Bronchodilator, spasmolytic and calcium antagonist activities of *Nigella sativa* seeds (Kalonji). Journal of the Pakistan Medical Association. 51: 115-120.
- Girodet P-O, Tunon de Lara J-M. 2007. Immunoglobuline E et asthme. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Pneumologie, 6-039-A-44.
- Girodet P-O, Casset A, Magnan A. 2005. Immunoglobuline E et maladies respiratoires. Rev Mal Respir, 22, pp: 967-981.
- Global Initiative for Asthma (GINA). 2010. Global Strategy for Asthma Management and prevention. GINA report disponible sur: <http://www.ginasthma.org>.
- Global Initiative for Asthma (GINA). 2006. Global Strategy for Asthma Management and prevention. GINA report disponible sur: <http://www.ginasthma.org>.
- Global Initiative for Asthma (GINA). 2003. Global Strategy for Asthma Management and prevention. GINA report disponible sur: <http://www.ginasthma.org>.
- Global Initiative for Asthma (GINA). 2002. Global Strategy for Asthma Management and prevention. GINA report disponible sur: <http://www.ginasthma.org>.
- Gonzalez P K, Zhuang J, Doctrow S R, Malfroy B, Benson B F, Menconi MJ , Fink M P. 1996. Role of oxidant stress in the adult respiratory distress syndrome: evaluation of a novel antioxidant strategy in a porcine model of endotoxin-induced acute lung injury. Shock 6 : S23-S26.
- Goud S N, Zhang L, Kaplan A M. 1993. Immunostimulatory potential of smokeless tobacco extract in *in vitro* cultures of murine lymphoid tissues. Immunopharmacology 25(2): 95.
- Griess P. 1879. Notes on the paper of Weselsky and Benedikt. Some Azo Compounds. Ber Dtsch Chem Ges, 12, 426.
- Gupta P C, Sreevidya S. 2004. Smokeless Tobacco Use, Birth Weight and Gestational Age: Population Based Prospective Cohort Study of 1217 Women in Mumbai, India. BMJ, 328, 1538.
- Gupta R, Deedwania P C, Achari V, Bhansali A, Gupta B K, Gupta A. 2013. Normotension, prehypertension and hypertension in Asian Indians: Prevalence, determinants, awareness, treatment and control. AM J Hypertens. 26: 83-94.
- Gutteridge J, Halliwell B. 2000. Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. Annals of the New York Academy of Sciences, 899(1): 136-147.

H

- Haddad M F, Moumni S T. 2011. Tabagisme et sevrage tabagique. Rôle du pharmacien et situation en Algérie. Thèse pour le diplôme d'état en pharmacie. Université de Lille 2, Lille ,194p.
- Haddad V, Mas R. 2007. Biochimie clinique. p 101-107.
- Haleng J, Pincemail J, Defraigne J O. 2007. Le stress oxydant. Rev Med Liege, 62 (10), pp: 628-638.
- Hammad H, Lambrecht B N. 2006. Rôle des différentes populations des cellules dendritiques dans l'asthme allergique. Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique, 46, pp: 128-130.
- Holgate S T. 2008. Pathogenesis of Asthma. Clinical and Experimental Allergy, 38, pp: 872-897.
- Heffner J E, Rapine J E. 1989. Pulmonary strategies of antioxidant defense. Am. Rev. Respir. Dis. 140 (2): 531.
- Hegi G. 1975. Illustrierte Flora von Mitteleuropa. (IV. 2A, Rosa). - Verlag P. Parey, IV 2A pp 112
- Heshmati J, Namazi N, Memarzadeh M-R, Taghizadeh M, Kollahdooz F. 2015. *Nigella sativa* oil affects glucose metabolism and lipid concentrations in patients with type 2 diabetes: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Food Research International 70: 87-93.
- Hould R. 1984. Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. Ed Maloine 19(21): 225.
- Hulsmann A R, Raatgeep H R, Den Hollander J C, Stijnen T H, Saxena P R, Kerrebijn K F, Jongste J C. 1994. Oxidative epithelial damage produces hyperresponsiveness of human peripheral airways. American journal of respiratory and critical care medicine, 149(2), 519-525.
- Hye Y K, DeKruyff R H, Umetsu D. 2010. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. Nat Immunol, 11(7), pp: 577 – 584.

I

- IARC. 2007. monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 89: smokeless tobacco and some tobacco-specific nitrosamines. Lyon IARC Press pp: 37-370.

Institut National de Santé Publique. Enquête nationale de santé : projet TAHINA, novembre 2007, 125-38. (En ligne) www.sante.dz/insp/DOC_ENS_Novembre_2007_tahina.pdf

Institut numérique (Page consultée le 20/04/2016) Diabète et stress oxydant. <http://www.institut-numerique.org/3-diabete-et-stress-oxydant-526fce18a61ac>.

Institut National du Cancer. 2009. (Page consultée le 15 Mars 2016) « Risques de cancers et produits du tabac sans fumée » de l'INCa : direction santé publique, département prévention. fiche repère téléchargeable sur www.e-cancer.fr.

INPES. 2004. Tabac actualité n°47, mars 2004, <http://www.inpes.sante.fr/TA/pdf/Tabactu47.pdf>.

J

Jackson D J, Hartert T V, Martinez F D, Weiss S T, Fahy J V. 2014. Asthma: NHLBI Workshop on the Primary Prevention of Chronic Lung Diseases. Ann Am Thorac Soc. 11 Suppl 3: S139-45.

James K, Gebretsadik T, Escobar G J. 2013. Risk of Childhood Asthma Following Infant Bronchiolitis During RSV Season. J Allergy Clin Immunol. 132(1), pp: 227-229.

Jang A S, Choi I S, Jeong T K, Lee K Y. 2002. The effect of cigarette smoking on the levels of nitric oxide metabolites in the sputum of patients with acute asthma. J Asthma 39(3): 211.

Janssen-Heininger Y, Ckless K, Reynaert N, Van Der Vliet A. 2005. SOD Inactivation in Asthma: Bad News or NO News? The American journal of pathology, 166(3): 649.

Johnson M A, Macdonald T L, Mannick J B, Conaway M R, Gaston B. 2001. Accelerated S-nitrosothiol breakdown by amyotrophic lateral sclerosis mutant copper, zinc-superoxide dismutase. Journal of Biological Chemistry, 276(43): 39872-39878.

K

Kamal A, Arif J M, Ahmad I Z. 2010. Potential of *Nigella sativa* L. seed during different phases of germination on inhibition of bacterial growth. E3 J Biotech Pharm Res 1: 9–13.

Kandhare A D, Bodhankar S L, Singh V, Mohan V, Thakurdesai P A. 2013. Anti-asthmatic effects of type-A procyanidine polyphenols from cinnamon bark in ovalbumin-induced

- airway hyperresponsiveness in laboratory animals. *Biomedicine & Aging Pathology*, 3(1): 23-30.
- Kaplan A. 1984. Urea. In: Kaplan A, Kaplan A. Clin Chem. The C.V Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton; 1257-1260.
- Kapoor S. 2009. Emerging clinical and therapeutic applications of *Nigella sativa* in gastroenterology. *World J Gastroenterol* 7: 2170-2171.
- Keyhanmanesh R, Boskabady M H, Khamneh S, Doostar Y. 2010. Effect of thymoquinone on the lung pathology and cytokine levels of ovalbumin-sensitized guinea pigs. *Pharmacological reports*, 62(5): 910-916.
- Kirkham P, Rahman I. 2006. Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacology and Therapeutics*, 111, pp: 476-94.
- Koller A. 1984. Total serum protein. Clin. Chem. Toronto. Princeton. 1316-1324.
- Koregol A C, Kalburgi N B, Wagh A U K, Warad S. 2017. Gamma Glutamyl Transpeptidase, Smokeless Tobacco, Chronic Periodontitis: Exploring the Link. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 11(3): ZC17-ZC20.
- Krishnan N, Muthukrishnan S. 2012. Effects of *Nigella sativa* seed extract on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. *J Acute Med* 2(4): 107.
- Kumara S S, Huat B T. 2001. Extraction, isolation and characterization of antitumor principle, alphahederin, from the seeds of *Nigella sativa*. *Planta medica*. 67: 29-32.
- Kumari S, Verma A K, Rungta S, Mitra R, Srivastava R, Kumar N. 2013. Serum Prolidase Activity, Oxidant and Antioxidant Status in Nonulcer Dyspepsia and Healthy Volunteers. *ISRN Biochemistry* Article ID 182601, 6 pages.

L

- Labhal A, Settaf A, Zalagh F, Cherrah Y, Hassar M, Slaoui A. 1999. Propriétés anti-diabétiques des graines de *Nigella sativa* chez le merione shawi obese et diabétique. *Espérance médicale*, 6(47): 72-74.
- Labhal A, Settaf A, Bennani N, Cherrah Y, Slaoui A, Hassar M. 1997. Action anti-obésité et hypocholestérolémiant de *Nigella sativa* chez le rat des sables. *Caducée*, 27 : 26-28.
- Lanckacker E A, Tournoy K G, Hammad H, Holtappels G, Lambrecht B N, Joos G F, Maes T. 2013. Short cigarette smoke exposure facilitates sensitisation and asthma development in mice. *European Respiratory Journal*, 41(5): 1189-1199.
- Larsen G L, White C W, Takeda K, Loader J E, Nguyen D H, Joetham A, Gelfand E W. 2000. Mice that overexpress Cu/Zn superoxide dismutase are resistant to allergen-

- induced changes in airway control. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 279(2): L350-L359.
- Lemaoui A. 2011. Activités antioxydante et anticoagulante des huiles essentielles des graines de *Nigella sativa* L. Algérienne. Mémoire de magister, Université Ferhat Abbas, Sétif, p. 71.
- Levine R L, Garland D, Oliver C N, Amici A, Climent I, Lenz A G, Ahn B W, Shaltiel S, Stadtman E R. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods Enzymol, 186: 464.
- Lim T K, 2013. Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants: Fruits. Springer Science Business Media Dordrecht Volume 5, pp. 506-507.
- Liu M, Key C C C, Weckerle A, Boudyguina E, Sawyer J K, Gebre A K, Parks J S. 2018. Feeding of tobacco blend or nicotine induced weight loss associated with decreased adipocyte size and increased physical activity in male mice. Food and Chemical Toxicology 113, p. 287-295.
- Louis R, Schleich F, Corhay J-L. 2012. L'asthme : une maladie complexe mettant en jeu facteurs environnementaux et terrain génétique. Rev Med Liège, 67, pp: 286-291.
- Lukacs N W. 2001. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. Nature Reviews Immunology, 1(2): 108.
- Luchese C, Stangherlin E C, Ardais A P, Nogueira C W, Santos F W. 2007. Diphenyl diselenide prevents oxidative damage induced by cigarette smoke exposure in lung of rat pups. Toxicology 230(2-3): 189.

M

- Madore A-M, Laprise C. 2010. Immunological and genetic aspects of asthma and allergy. Journal of Asthma and Allergy, 3, pp: 107-121.
- Maduka S O, Osim E E, Nneli R O, Anyabolu A E. 2009. Effect of Occupational Exposure to Local Powdered Tobacco (Snuff) On Pulmonary Function in South Eastern Nigerians. Nigerian Journal of Physiological Sciences 24 (2): 195 -202.
- Mahmoud M R, El-Abhar H S, Saleh S. 2002. The effect of *Nigella sativa* oil against the liver damage induced by *Schistosoma mansoni* infection in mice. Journal of ethnopharmacology, 79(1): 1-11.
- Mahmood M S, Gilani A H, Khwaja A, Rashid A, Ashfaq M K. 2003. The in vitro effect of aqueous extract of *Nigella sativa* seeds on nitric oxide production. Phytother Res. 17(8): 921.

- Mahut B, Delacourt C, Zerah-Lancner F, De Blic J, Harf A, Delclaux C. 2004. Increase in alveolar nitric oxide in the presence of symptoms in childhood asthma. *Chest*. 125(3): 1012.
- Majdalawieh A F, Hmaidan R, Carr R I. 2010. *Nigella sativa* modulates splenocyte proliferation, Th1/Th2 cytokine profile, macrophage function and NK anti-tumor activity. *J Ethnopharmacol* 131 (2): 268-275.
- Marie J C, Astier A L, Rivallier P, Rabourdin-Combe C, Wild T F, Horvat B. 2002. Linking innate and acquired immunity: divergent role of CD46 cytoplasmic domains in T cell-induced inflammation. *Nature immunology*, 3(7): 659-666.
- Martinet Y, Bohadana A. 2004. Le tabagisme. De la prévention au sevrage. 2ème éd. Paris: Masson pp: 45-48.
- Massoud A, Rezaei N. 2013. Immunology of Aging. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg pp: 309-321.
- Meddah B, Ducroc R, Faouzi M E A, Eto B, Mahraoui, L, Benhaddou-Andaloussi, A, Haddad P S. 2009. *Nigella sativa* inhibits intestinal glucose absorption and improves glucose tolerance in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 121(3): 419-424.
- Meharzi S, Mansouri R, Chekchaki N, Bouchair N, Belgharssa A, Tridon A, Messarah M, Boumendjel A. 2017. Indoor Aeroallergens in Asthmatic Pediatric Population in Annaba (Algeria). *Aerosol and Air Quality Research*, 17: 2482–2490.
- Menezes C, Leitemperger J, Toni C, Santi A, Lopes T, Barbosa M B, Neto J R, Loro V L. 2013. Comparative study on effects of dietary with diphenyl diselenide on oxidative stress in carp (*Cyprinus carpio*) and silver catfish (*Rhamdia sp.*) exposed to herbicide clomazone. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36(2): 706.
- Merfort I, Wray V, Barakat H, Hussein S A M, Nawwar M A M, Willuhn G. 1997. Flavonol triglycosides from seeds of *Nigella sativa*. *Phytochemistry*. 46: 359-363.
- Missebukpo A, Metowogo K, Diallo A, Lawson-Evi P, Eklug-Gadegbeku K, Aklikokou K A, Messanvi G. 2013. Antioxidant effects of *Ixora coccinea* Linn. in a rat model of ovalbumin-induced asthma. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7(42): 2794-2800.
- Misso N L, Brooks-Wildhaber J, Ray S, Vally H, Thompson P J. 2005. Plasma concentrations of dietary and nondietary antioxidants are low in severe asthma. *European Respiratory Journal*, 26(2): 257-264.

- Moerloose K B, Pauwels R A, Joos G F. 2005. Short-Term Cigarette Smoke Exposure Enhances Allergic Airway Inflammation in Mice. *Am J Respir Crit Care Med* 172(2): 168.
- Minig V. 2009. Etude du mécanisme de régulation du gène et de l'importance biologique de la superoxyde dismutase à manganèse dans la croissance tumorale mammaire. Thèse de doctorat, Université Henri Poincaré, Nancy, 169 p.
- Montani D, Tcherakian C. 2009. *Pneumologie*. 2 éd, Elsevier Masson, Paris, 389p.
- Morikawa T, Xu F, Kashima Y, Matsuda H, Ninomiya K, Yoshikawa M. 2004a. Novel dollabellane-type diterpene alkaloids with lipid metabolism promoting activities from the seeds of *Nigella sativa*. *Organic letters*. 6: 869-872.
- Morikawa T, Xu F, Ninomiya K, Matsuda H, Yoshikawa M. 2004b. Nigellamines A3, A4, A5 and C, new dolabellane-type diterpene alkaloids, with lipid metabolism promoting activities from the Egyptian medicinal food black cumin. *Chemical & pharmaceutical bulletin*. 52: 494-497.
- Morissette M. 2010. Rôle de l'immunité et du stress oxydant dans l'augmentation de l'apoptose alvéolaire associée à la maladie pulmonaire obstructive chronique. Thèse de doctorat, Université Laval, Québec, 165 p.
- Murray R L. 1984. Aspartate aminotransferase. *Clin. Chem. Toronto. Princeton*. 1112-1116.
- Murray R L. 1984. Alanine aminotransferase. *Clin. Chem. Toronto. Princeton*. 1088-1090.
- Murray R L. 1984. Creatinine. Kaplan A et al. *Clin chem. The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton*. 1261-1266, 418.

N

- Nafti S, Taright S, El-Ftough M, Yassine N, Benkheder A, Bouacha H, Fakhfakh H, Ali-Khoudja M, Texier N, El Hasnaoui A. 2009. Prevalence of asthma in North Africa: The Asthma Insights and Reality in the Maghreb (AIRMAG) study. *Respiratory Medicine*, Volume 103, Supplément 2, pp: S2-S11.
- Nandi D, Patra R C, Swarup D. 2005. Effect of cysteine, methionine, ascorbic acid and thiamine on arsenic-induced oxidative stress and biochemical alterations in rats. *Toxicology*. 211: 26-35.
- National institute for occupational safety and health (NIOSH). 1986. Registry of toxic effects of chemical substances; 3A: 3060.
- Nergiz C, Otles S. 2003. Some characteristics of *Nigella sativa* L. seed cultivated in Egypt and its lipid profile. *Food Chemistry* (83), pp. 63-68.

O

- Ober C, Yao T-C. 2011. The Genetics of Asthma and Allergic disease: A 21st Century prespective. *Immunol Rev*, 242(1), pp: 10-30.
- Oberholzer H M, Pretorius E. 2009. Investigating lung remodeling in Modul8-treated BALB/c asthmatic animals. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 40(8): 775-782.
- Oh S J, Min Y G, Kim J W, Lee S J, Jarin P R. 2003. Expression of nitric oxide synthases in nasal mucosa from a mouse model of allergic rhinitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 112(10): 899.
- Oswald I P, Wynn T A, Sher A, James S L. 1992. Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation. *Proc Natl Acad Sci*. 15;89(18): 8676.
- Ozcan N S, Cubukcu K M. 2015. Evaluation of Air Pollution Effects on Asthma Disease: The case of Izmir. *Procedia–Social and Behavioral Sciences*, 202, pp: 448-445.

P

- Page A. 2012. Etude de la modulation de la réponse cellulaire au stress oxydatif par les protéines VP24 des virus Marburg et Ebola. Thèse de doctorat, Ecole normale supérieure de Lyon, Lyon, 160 p.
- Passeport Santé (Page consultée le 20/04/2016) vitamine E. http://www.passeportsante.net/fr/Solutions/PlantesSupplements/Fiche.aspx?doc=vitamine_e_ps.
- Pauly J L, Paszkiewicz G. 2011. Cigarette Smoke, Bacteria, Mold, Microbial Toxins, and Chronic Lung Inflammation. *J Oncol*. 2011: 819129.
- Pham-Van L. 2010. Modulation de la réponse immunitaire par des agonistes de la voie de signalisation TLR/IL-1R dans le modèle d'asthme. Thèse de Doctorat, Université Paris Descartes, Paris, 252p.
- Peng L, Liu A, Shen Y, Xu H Z, Yang S Z, Ying X Z. 2013. Antitumor and anti-angiogenesis effects of thymoquinone on osteosarcoma through the NFκB pathway. *Oncol Rep* 29(2): 571-578.
- Pes T S, Saccol E M, Ourique G M, Londero O P, Gressler L T, Finamor I A, Rotili D A, Llesuy S F, Neto J R, Baldisseroto B, Pavanato M A. 2016. Effect of diets enriched with

- rutin on blood parameters, oxidative biomarkers and pituitary hormone expression in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Fish Physiol Biochem*. 42(1): 321.
- Petro T M, Zhang S. 1997. The effect of smokeless tobacco extract on murine T cell cytokine production. *Immunopharmacology* 36(1): 17.
- Pons N. 1992. Régulation de la synthèse des IgE in vitro chez l'homme – Variations saisonnières de la synthèse des cytokines par les lymphocytes T – Rôle des β_2 agonistes. Thèse de Doctorat, Université Montpellier I, Montpellier. 71p.
- Poursalehi H R, Fekri M S, Far F S, Mandegari A, Izadi A, Mahmoodi R, Nematollahi H, Porgholamhosein F, Ghorani V, Fekri M S. 2018. Early and late preventive effect of *Nigella sativa* on the bleomycininduced pulmonary fibrosis in rats: An experimental study. *Avicenna J Phytomed*, 8 (3): 263-275.
- Prado C M, Milton A M, Iolanda F L. 2011. Nitric Oxide in asthma physiopathology. *International Scholarly Research Network*, pp: 1-13.

R

- Rahman I, MacNee W. 1999. Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 277(6): 1067.
- Rajkapoor B, Anandan A, Jayakar B. 2002. Anti-ulcer effect of *Nigella sativa* Linn. against gastric ulcers in rats. *Current Science*. 82: 177-179.
- Ramadan M F. 2007. Nutritional value, functional properties and nutraceutical applications of black cumin (*Nigella sativa* L.): an overview. *Int J Food Sci Technol* 42: 1208–1218.
- Ramadan M F, Mörsel J T. 2002. Direct isocratic normal-phase HPLC assay for fat soluble vitamins and β -carotene in oil seeds. *European food research and technology*. 214: 521-527.
- Raza-Asim M B, Shahzad M, Yang X, Sun Q, Zhang F, Han Y, Lu S. 2010. Suppressive effects of black seed oil on ovalbumin induced acute lung remodelling in E3 rats. *Swiss Med Wkly*; 140: w13128.
- Reynaert N L, Aesif S W, McGovern T, Brown A, Wouters E F, Irvin C G, Janssen-Heininger Y M. 2007. Catalase overexpression fails to attenuate allergic airways disease in the mouse. *The Journal of Immunology*, 178(6): 3814-3821.
- Rioux C. 2009. Stress oxydatif et prévention des maladies chroniques la supplémentation s'impose-t-elle ? Mémoire de maîtresses sciences, Université Laval, Québec, 76 p.

- Robays L J, Maes T, Lebecque S, Lira S A, Kuziel W A, Brusselle G G, Vermaelen K V. 2007. Chemokine receptor CCR2 but not CCR5 or CCR6 mediates the increase in pulmonary dendritic cells during allergic airway inflammation. *The Journal of Immunology*, 178(8): 5305-5311.
- Rogozhin E A, Oshchepkova Y I, Odintsova T I, Khadeeva N V, Veshkurova O N, Egorov T A. 2011. Novel antifungal defensins from *Nigella sativa* L. seeds. *Plant Physiol Biochem* 49(2): 131-137.
- Russell P, Bowler M D. 2004. Oxidative stress in the pathogenesis of asthma. *Current allergy and asthma reports*, 4, pp:116 -122.

S

- Sahiner U M, Birben E, Erzurum S. 2011. Oxidative stress in asthma. *WAO Journal*, 4, pp: 151-158.
- Sackesen C, Ercan H, Dizdar E, Soyer O, Gumus P, Tosun BN, Kalayci O. 2008. A comprehensive evaluation of the enzymatic and nonenzymatic antioxidant systems in childhood asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 122(1), 78-85.
- Salem M L. 2005. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. Seed. *International Immunopharmacology*. 5: 1749-1770.
- Salem M L, Hossain M S. 2000. Protective effect of black seed oil from *Nigella sativa* against murine cytomegalovirus infection. *International journal of immunopharmacology*. 22: 729-740.
- Salim E I. 2010. Cancer chemopreventive potential of volatile oil from black cumin seeds, *Nigella sativa* L., in a rat multi-organ carcinogenesis bioassay. *Oncol Lett* 1(5): 913-924.
- Sallie R, Tredger J M, Williams R. 1991. Drugs and the liver Part 1: Testing liver function. *Biopharmaceutics & drug disposition*, 12(4): 251-259.
- Salter H H. 1868. On asthma: its pathology and treatment. Churchill.
- Samuel S, Kathirvel R, Jayavelu T, Chinnakkannu P. 2005. Protein oxidative damage in arsenic induced rat brain: influence of DL- α -lipoic acid. *Toxicology letters*, 155(1): 27-34.
- Sedgwick J B, Geiger K M, Busse W W. 1990. Superoxide generation by hypodense eosinophils from patients with asthma. *Am Rev Respir Dis*, 142(1): 120-125.

- Servais S. 2004. Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone : effets de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, 128 p.
- Sethi G, Ahn K S, Aggarwal B B. 2008. Targeting nuclear factor-kappa B activation pathway by thymoquinone: role in suppression of antiapoptotic gene products and enhancement of apoptosis. *Mol Cancer Res* 6: 1059-1070.
- Shahzad M, Yang X, Raza Asim M B, Sun Q, Han Y, Zhang F, Cao Y, Lu S. 2009. Black seed oil ameliorates allergic airway inflammation by inhibiting T-cell proliferation in rats. *Pulm Pharmacol Ther*. 22(1): 37.
- Schivo M, Avdalovic M V, Murin S. 2014. Non-Cigarette Tobacco and the Lung, *Clinic Rev Allerg Immunol* 46(1): 34-53.
- Shrestha R, Nepal A K, Das B K L, Gelal B, Lamsal M. 2012. Non-enzymatic Antioxidant Status and Biochemical Parameters in the Consumers of Pan Masala Containing Tobacco. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 13 (9): 4353-4356.
- Siminszky B, Gavilano L, Bowen S W, Dewey R E. 2005. "Conversion of nicotine to nornicotine in *Nicotiana tabacum* is mediated by CYP82E4, a cytochrome P450 monooxygenase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102.41: 14919-14924.
- Singh S, Das S S, Singh G, Schuff C, de Lampasona M P, Catalan C A. 2014. Composition, in vitro antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and oleoresins obtained from black cumin seeds (*Nigella sativa* L.). *Biomed Res Int* 2014: 10.
- Sabokbar A, Millett P J, Myer B, Rushton N. 1994. A rapid, quantitative assay for measuring alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells in vitro. *Bone and Mineral* 27: 57-67
- Stepanov I, Jensen J, Hatsukami D, Hecht S. 2009. Tobacco-specific nitrosamines in new tobacco products. *Nicotine Tobacco Res*, 2006; 8: 309-313.
- Sumoza-Toledo A, Fleig A, Penner R. 2013. TRPM2 channels are not required for acute airway inflammation in OVA-induced severe allergic asthma in mice. *Journal of inflammation*, 10(1): 19.
- Suralkar A A, Kasture S B. 2013. Inhibitory effect of *Abrus precatorious* extract on bronchial hyperreactivity induced by ovalbumin in experimental animals. *Int J Pharm Sci*, 5(1): 403.
- Suzy A, Comhair A, Serpil C. 2002. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 283, pp: L246 - L255.

T

- Takruri H R H et Dameh M A F. 1998. Study of the nutritional value of black cumin seeds (*Nigella sativa* L.). J. Sci. Food Agric. 76: 404-410.
- Taskin M k, Caliskan A O, Anil H, Abou-gazar H, Khan A I, Bedir E. 2005. Triterpène saponins from *Nigella sativa* L. Turkish Journal of Chemistry. 29: 561-569.
- Tayman C, Cekmez F, Kafa I M, Canpolat F E, Cetinkaya M, Tonbul A, Sarici S U. 2013. Protective effects of *Nigella sativa* oil in hyperoxia-induced lung injury. Archivos de Bronconeumología (English Edition), 49(1): 15-21.
- Temann T, Prasad B, Gallup M, Basbaum C, Ho S B, Flavell R A, Rankin J A. 1997. A novel role for murine IL-4 in vivo: induction of MUC5AC gene expression and mucin hypersecretion. Am J Respir Cell Mol Biol. 16(4): 471.
- TheGoblin. *Nigella sativa*. Page consultée le 30 juil. 2017, sur Wikipedia: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Nigella_Sativa_Seed.jpg.
- Thimmulappa R K, Scollick C, Traore K, Yates M, Trush M A, Liby K T, Sporn M B, Yamamoto M, Kensler T W, Biswal S. 2006. Nrf2-dependent protection from LPS induced inflammatory response and mortality by CDDO-Imidazolide. Biochemical and Biophysical Research Communications 351; 4: 883–889.
- Thomsen S F. 2014. Exploring the origins of asthma: Lessons from twin studies. European Clinical Respiratory Journal, 1: 25535.
- Tolando R, Jovanović A, Brigelius-Flohé R, Ursini F, Maiorino M. 2000. Reactive oxygen species and proinflammatory cytokine signaling in endothelial cells: effect of selenium supplementation. Free Radical Biology and Medicine, 28(6): 979-986.
- Toparslan C. 2012. À propos de *Nigella sativa* L. Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en Pharmacie. Université de LORRAINE pp. 3-31.
- Tuter M, Aksoy H, Ustun G, Riva S, Secundo F, Ipekler S. 2003. Partial purification of *Nigella sativa* L. seed lipase and its application in hydrolytic reactions. Enrichment of γ -linolenic acid from borage oil. J Am Chem Soc (80): 273-241.

V

- Velayutharaj A, Ramesh R, Niranjana G, Kala C. 2013. Biochemical assessment of liver damage in smokeless tobacco users, Int J Cur Res Rev. 05(23): 63-69.

Vliet V D, Nguyen M N, Shigenaga M K, Eiserich J P, Marelich G P, Cross C E. 2000. Myeloperoxidase and protein oxidation in cystic fibrosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 279(3): L537.

W

Wardlaw A J, Dunnette S, Gleich G J, Collins J V, Kay A B. 1988. Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma. *Am Rev Respir Dis*, 137(62): 9.

Wenger C. 1984. Alkaline phosphatase: In Kaplan A et al. *Clin. Chem.* The C.V. Mosby Co. St Louis. Princeton, Toronto. 1094-1098.

World Health Organisation. 2017. WHO report on the global tobacco epidemic, 2017 Country Profile: Algeria pp. 2.

World Health Organization. WHO report on the global tobacco epidemic, 2011. Country profile: Algeria. Geneva: World Health Organization; 2011. Available from: http://www.who.int/tobacco/surveillance/policy/country_profile/dza.pdf.

World Health Organization. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 89: Smokeless Tobacco and Some Tobacco-Specific N-Nitrosamines. Lyon (France): World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, 2007 [accessed 2015 Oct 31].

Y

Yaman I, Balikci E. 2010. Protective effects of *Nigella sativa* against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* 62(2): 183.

Z

Zaoui A, Cherrah Y, Alaoui K, Mahassine N, Amarouch H, Hassar M. 2002. Effects of *Nigella sativa* fixed oil on blood homeostasis in rat. *Journal of ethnopharmacology*, 79(1): 23-26.

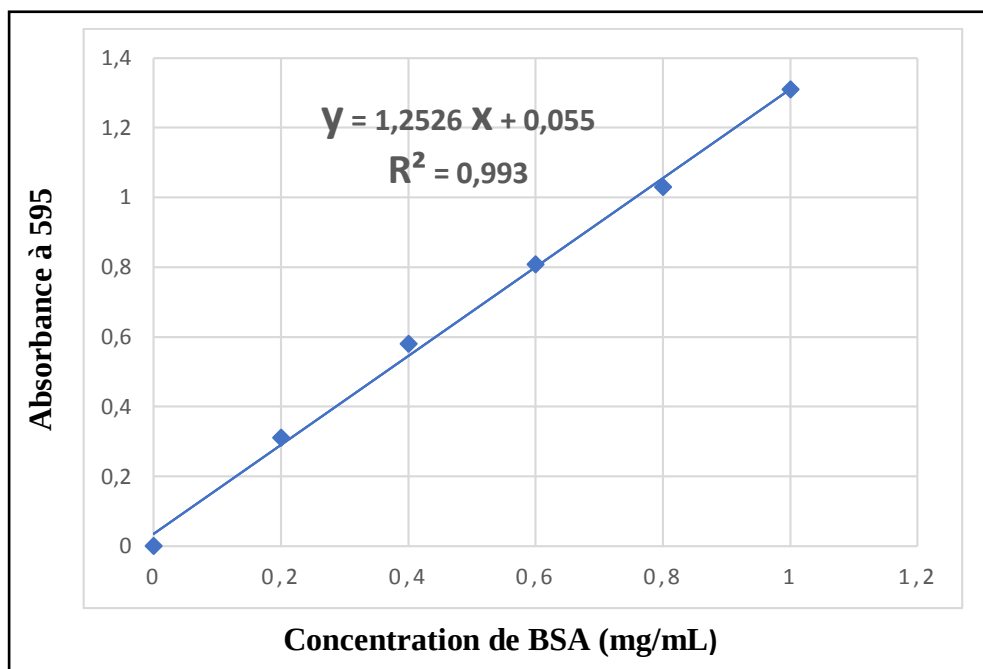
Zemmouri H, Sekiou O, Ammar S, El Feki A, Messarah M, Boumendjel A. 2017. *Urtica dioica* attenuates ovalbumin-induced inflammation and lipid peroxidation of lung tissues in rat asthma model. *Pharmaceutical Biology* 55(1): 1561.

Zhang Q F, Jiang Z T, Li R. 2007. Complexation of allyl isothiocyanate with β -cyclodextrin and its derivatives and molecular microcapsule of allyl isothiocyanate in β -cyclodextrin. *European Food Research and Technology*, 225(3-4): 407-413.

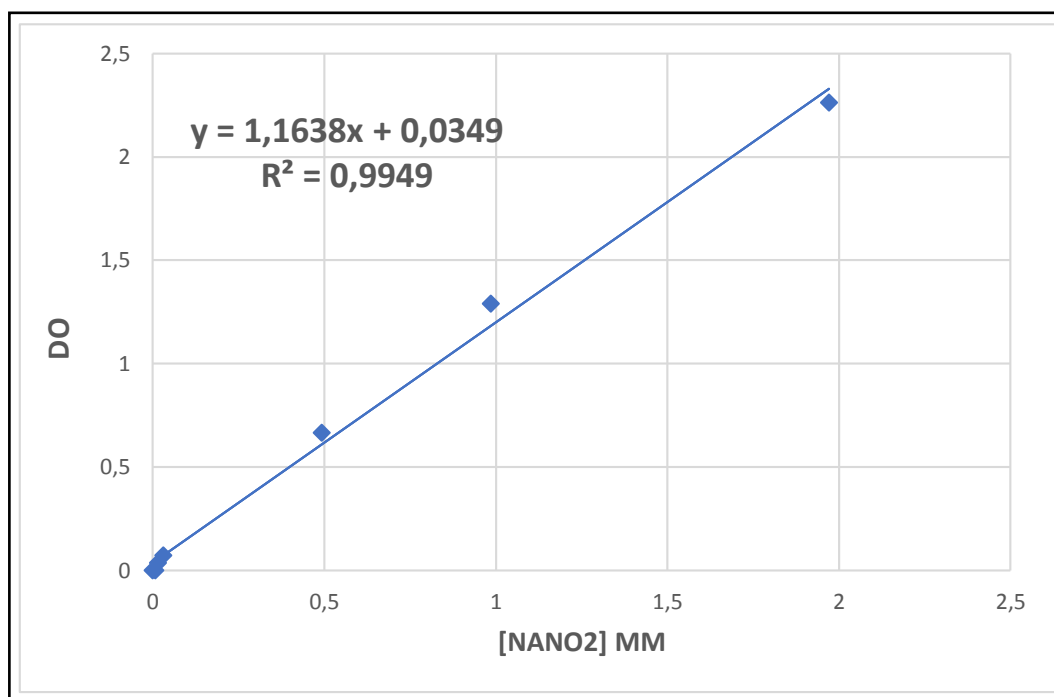
- Zhao J J, Shimizu Y, Dobashi K. 2008. The relationship between oxidative stress and acid stress in adult patients with mild asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 18(1): 41-45.
- Zhu X, Li Q, Chang R, Yang D, Song Z, Guo Q, Huang C. 2014. Curcumin alleviates neuropathic pain by inhibiting p300/CBP histone acetyltransferase activity-regulated expression of BDNF and cox-2 in a rat model. *PLoS One* 9: e91303.

ANNEXES

Annexes :



Annexe 1 : Courbe d'étalonnage de la BSA (1mg/mL).



Annexe 2 : Courbe d'étalonnage du nitrite de sodium (NaNO_2).

Annexe 3 : Composition de l'aliment pour 1 kilogramme de nourriture (ONAB, Bejaïa)

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

Annexe 4 : Liste des réactifs chimiques spécifiques utilisés.

Réactifs	Nom complet (code)	Firme
Acide ortho-phosphorique 85 %	-----	Sigma Aldrich
BHT	Hydroxy toluène butylé	Sigma Aldrich
Bleu de Coomassie	-----	MERCK
BSA	Bovine Serum Albumine lyophilized	Fluka
DTNB	Acide 5-5'-dithiobis-2-nitro benzoïque	Sigma Aldrich
GSH	Glutathion	Sigma Aldrich
Methionine	L-Méthionine	Biochem. Chemopharma
NBT	Nitro Blue Tetrazolium	Sigma Aldrich
Riboflavine	-----	Biochem. Chemopharma
TBA	Acide thiobarbiturique	Sigma Aldrich
TCA	Acide trichloracétique	Sigma Aldrich
DPPH	2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl	ALDER
Riboflavine	-----	Biochem. Chemopharma
NBT	Nitro Blue Tetrazolium	Sigma Aldrich

Annexe 5 : Solutions utilisées pour le dosage des paramètres du stress oxydant.

Solutions	Composition	Quantités
Solution de lavage (pH=7,4)	- KH_2PO_4 - NaCl - Eau distillée	1,36 g 9 g 1 L
Solution de BRADFORD	- Bleu de Coomassie (G-250) - Ethanol 95% - Acide ortho-phosphorique - Eau distillée	100 mg 50 mL 100 mL 1 L
Tampon phosphate (pH=7,4)	- Tris 50 mM - NaCl 150 mM	6,057 g 8,775 g
TCA-BHT	- TCA - BHT - Eau distillée	20 g 1 g 100 mL
Tris-TBA	- Tris - TBA - Eau distillée	0,315 g 1, 729 100 mL
Tampon TBS (pH=7,4)	- NaCl 150 mM - Tris 50 mM - Eau distillée	4,387 g 3,028 g 500 mL
GSH	- GSH - Eau distillée	0,491 g 16 mL
DTNB	- DTNB - Eau distillée	5,151 g 13 mL
TCA	- TCA - Eau distillée	0,4 g 40 mL
H_2O_2 (30V)	- H_2O_2 - Eau distillée	130 μL 1 L

Annexe 6 : Réactifs utilisés pour le dosage des protéines totales.

Réactif (Biuret)	Tartrate de potassium sodium	15 mmol/L
	Iodure de sodium	100 mmol/L
	Iodure de potassium	5 mmol/L
	Sulfate de cuivre	19 mmol/L
Etalon	Sérum albumine bovine	7 g/dL

Annexe 7 : Réactifs utilisés pour le dosage de l'aspartate aminotransférase.

Réactif R1 : Tampon	Tris pH 7.8	80 mmol/L
	L- Aspartate	200 mmol/L
Réactif R2 : Substrat	NADH	0.18 mmol/L
	Lactate déshydrogénase (LDH)	800 U/L
	Malate déshydrogénase (MDH)	600 U/L
	α -Cétooglutarate	12 mmol/L

Annexe 8 : Réactifs utilisés pour le dosage de l'alanine aminotransférase.

Réactif R1 : Tampon	Tris pH 7.8	100 mmol/L
	L- Alanine	500 mmol/L
Réactif R2 : Substrat	NADH	0.18 mmol/L
	Lactate déshydrogénase (LDH)	1200 U/L
	α -Cétooglutarate	15 mmol/L

Annexe 9 : Réactifs utilisés pour le dosage de la phosphatase alcaline.

Réactif R1 : Tampon	Diéthanolamine (DEA) pH 10.4	1mmol/L
	Chlorure de magnésium	0.5 mmol/L
Réactif R2 : Substrat	p-Nitrophénylphosphate (pNPP)	10 mmol/L

Annexe 10 : Réactifs utilisés pour le dosage de l'albumine.

Réactifs	Composition	Concentration
R₁	Vert de bromocrésol pH 4.2	0.12 mmol/L.
Étalon	Albumine	5 g/dL

Annexe 11 : Réactifs utilisés pour le dosage de l'urée.

Réactif R1 : Tampon	Phosphate pH 6.7	50 mmol/L
	EDTA	2 mmol/L
	Sodium salicylate	400 mmol/L
	Sodium nitroprusside	10 mmol/L
Réactif 2 : NaClO	Sodium hydrochlorite (NaClO)	140 mmol/L
	Sodium hydroxyde	150 mmol/L
Réactif 3 : Enzymes	Uréease	30000 U/L
Urée calibrant	Urée aqueux (Standard)	50 mg/dL

Annexe 13 : Réactifs utilisés pour le dosage de la créatinine.

Réactif 1	Acide picrique	17.5 mmol/L
Réactif 2	Hydroxyde de sodium	0.29mol/L
créatinine calibrant	Créatinine aqueux (standard)	2 mg/dL

Annexe 14 : Réactifs utilisés pour le dosage des protéines carbonylées.

Réactif R1 : Tampon	Acide trichloroacétique (TCA)	20% (P/V)
	50% d'éthanol absolu	50% d'acétate d'éthyle
Réactif 1	DNPH	0.2% dans HCl 2 M
Réactif 2	Guanidine HCl	6.0 M

Annexe 15 : Réactifs utilisés pour le dosage de la superoxyde dismutase.

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

Annexe 16 : Réactifs utilisés pour le dosage de la catalase.

Réactifs	Blanc (µL)	Échantillon (µL)
Tampon phosphate (PBS) (0.1 M, pH 7.4)	800	780
H ₂ O ₂ (0.5 M)	200	200
Homogénat	--	20

Annexe 17 : Réactifs utilisés pour le dosage de l'oxyde nitrique.

Réactif A de Griess 0,5%	N-(1-naphthyl)éthylènediamine dihydrochloride	0.5 g
	Hcl 20%	100 mL
Réactif B de Griess 5%	Sulfamilamide	5 g
	Hcl 20%	100 mL
Solution standard NaNO₂	NaNO ₂	0.07 g
	Eau distillée	100 mL

**Publications
&
Communications scientifiques**

Publication internationale

In

Allergologia et Immunopathologia

Sociedad Espanola de Inmunologia Clinica,

Alergologia y Asma Pediatrica

**AMELIORATING EFFECTS OF *Nigella sativa* OIL ON AGGRAVATION
OF INFLAMMATION, OXIDATIVE STRESS AND CYTOTOXICITY
INDUCED BY SMOKELESS TOBACCO EXTRACT IN AN ALLERGIC
ASTHMA MODEL IN WISTAR RATS**

Taha KHALDI, Narimène CHEKCHAKI, Mahieddine BOUMENDJEL, Faiza
TAIBI, Mohamed ABDELLAOUI, Mahfoud MESSARAH, Amel
BOUMENDJEL.



Allergologia et immunopathologia

Sociedad Española de Inmunología Clínica,
Alergología y Asma Pediátrica

www.elsevier.es/ai



ORIGINAL ARTICLE

Ameliorating effects of *Nigella sativa* oil on aggravation of inflammation, oxidative stress and cytotoxicity induced by smokeless tobacco extract in an allergic asthma model in Wistar rats

T. Khaldi, N. Chekchaki, M. Boumendjel, F. Taibi, M. Abdellaoui,
M. Messarah, A. Boumendjel*

Laboratory of Biochemistry and Environmental Toxicology, Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar
University, Annaba, Algeria

Received 27 September 2017; accepted 9 February 2018

KEYWORDS

Smokeless tobacco;
Experimental asthma;
Nigella sativa;
Airway inflammation;
Oxidative stress;
Wistar rats

Abstract

Background: The comparison of smokeless tobacco (ST) exposure versus Ovalbumin (Ova) sensitized rats or asthmatic patients has hardly been studied in the literature. Thus, the present study aims to investigate the aggravation of inflammation, exacerbation of asthma, oxidative stress and cytotoxicity induced by ST.

Methods: ST was given at the dose of 40 mg/kg in an allergic asthma model in Wistar rats. Furthermore, the effects of oral administration of *Nigella sativa* oil (NSO), at a dose of 4 mL/kg/day, were investigated.

Results: The obtained results showed that ST clearly enhanced lung inflammation through interleukin-4 (IL-4) and Nitric oxide (NO) increased production. Actually, ST was found to intensify the oxidative stress state induced by Ova-challenge in rats, which was proven not only by augmenting lipid peroxidation and protein oxidation, but also by altering the non-enzymatic and enzymatic antioxidant status. Furthermore, the aggravation of inflammation and oxidative stress was obviously demonstrated by the histopathological changes observed in lung. In contrast, NSO administration has shown anti-inflammatory effects by reducing IL-4 and NO production, restoring the antioxidant status, reducing lipid peroxidation and improving the histopathological alterations by both protein oxidation and NSO treatment.

Abbreviations: AHR, airway hyperresponsiveness; b.w., body weight; BALF, BronchoAlveolar Lavage Fluid; CAT, catalase; DGRSDT, (in French Direction Générale de la Recherche Scientifique et du Développement Technologique) General Directorate for Scientific Research and Technological Development; DNPH, 2,4-dinitrophenylhydrazine; DTNB, 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid); ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; GPx, glutathione peroxidase; GSH, reduced glutathione; IFN- γ , interferon gamma; IgE, immunoglobulin E; IL-4, interleukin-4; LD50, median lethal dose; LPO, lipid peroxidation; MDA, Malondialdehyde; NBT, nitro blue tetrazolium; NO, nitric oxide; NPSH, non-protein thiols; NSO, *Nigella sativa* oil; ONAB, (in French Office National des Aliments de Bétails) National Livestock Feed Office; Ova, Ovalbumin; PBS, phosphate buffer solution; ROS, reactive oxygen species; SEM, standard error mean; SOD, superoxide dismutase; ST, smokeless tobacco; TE, smokeless tobacco extract; TBA, thiobarbituric acid; TBARS, thiobarbituric reactive species; Th1, T helper cell 1; Th2, T helper cell 2; TQ, thymoquinone.

* Corresponding author.

E-mail addresses: amelibis@yahoo.fr, amel.boumendjel@univ-annaba.org (A. Boumendjel).

<https://doi.org/10.1016/j.aller.2018.02.005>

0301-0546/Published by Elsevier España, S.L.U. on behalf of SEICAP.

Please cite this article in press as: Khaldi T, et al. Ameliorating effects of *Nigella sativa* oil on aggravation of inflammation, oxidative stress and cytotoxicity induced by smokeless tobacco extract in an allergic asthma model in Wistar rats. Allergol Immunopathol (Madr). 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2018.02.005>

Conclusions: Our data have proven that severe concurrent exposure to allergen and ST increases airway inflammation and oxidative stress in previously sensitized rats. They also suggest that the oral NSO treatment could be a promising treatment for asthma.
Published by Elsevier España, S.L.U. on behalf of SEICAP.

Introduction

Over the past two decades, toxicological research has been interested in the induction of oxidative stress after the consumption of smokeless tobacco (ST) as a possible mechanism of toxicity in liver, kidney and lung.^{1–3} Presumably, the direct contact of the respiratory epithelium with ST toxic compounds, even when it is not burned or volatilized, can cause inflammatory changes.¹

Allergic asthma affects about 300 million people of all ages worldwide. It is increasing by 50% per decade⁴ and is considered a very serious public health problem. Allergic inflammation is also frequently associated with an increased generation of reactive oxygen species (ROS),⁵ and the biochemical environment in the asthmatic airways is favorable for free radical mediated reactions. It has been shown that inflammation caused by increased oxidative stress occurs in the airways of patients with asthma.⁵

Moreover, it would be interesting to study the ST additive effects on an experimental asthma model, while seeking a natural way to remedy the two sources generating inflammation and oxidative stress. Therefore, we investigated the traditional remedies of pulmonary pathologies and chose *Nigella sativa*, since it is known in the prophetic writings that it heals all the evils.⁶ This plant, commonly known as black seed, is an annual herbaceous plant belonging to the Ranunculaceae family.

As previously mentioned, *N. sativa* is known for its pharmacological and therapeutic effects, namely due to its antibacterial, antifungal, antidiabetic, antioxidant, anti-inflammatory, anticancer and immunomodulatory properties.^{7,8} Many active compounds have been isolated and identified through phytochemical investigations such as phenolic acid, epicatechin, quercetin and flavones.⁹ Moreover, most of the therapeutic properties of this plant are related to the presence of thymoquinone (TQ) which is the main active chemical component cold-pressed black cumin seed oils¹⁰ when linoleic, oleic and palmitic acids were the main fatty acids in the oils tested. Otherwise, in Ramadan study,¹¹ the author showed that cold-pressed oils of *N. sativa* were healthy oils and had good anti-free radical properties and good oxidation stability, probably due to changes in the fatty acid profile and tocopherols.¹¹

The present study explores not only the effects of ST in the aggravation of inflammation, but also the preventive and ameliorating effects of *N. sativa* oil (NSO) on allergen-induced airway inflammation in a rat model of allergic asthma associated with taking ST.

Materials and methods

Animals

Forty-eight Wistar albino male rats weighing 160 ± 10 g (6–8 weeks old), obtained from the Pasteur Institute (Algiers, Algeria) were used. The animals were housed in polypropylene cages that were sanitized every 48 h. The rats were fed a standard laboratory diet (standard food, supplied by the "ONAB of Bejaia", Algeria) and clean tap water ad libitum. They were exposed to a natural photoperiod, at a temperature of $25 \pm 1^\circ\text{C}$ and a relative humidity of $40 \pm 5\%$ and allowed to acclimatize in this condition for two weeks prior to experimental use. All protocols in this study were used in accordance with the guidelines of the Committee on Use of Laboratory Animals and approved under the CNEPRU project (D01N01UN230120150006) by the Ethical Committee of DGRSDT at the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research.

Sensitization and aerosol exposure

The rats were immunized by an intraperitoneal injection of 10 mg Ovalbumin (Ova) adsorbed to 1 mg aluminum hydroxide in a volume of 1 mL phosphate buffered saline (PBS) on day 0 and boosted on day 7^{8,12} (Fig. 1).

At days 14, 16, 18, 21, and 24, the rats were placed in a plexiglass exposure chamber connected to the outlet of an ultrason aerosol generator (OMRON, NE-C29-E) for 30 min. Ovalbumin (1 g OVA in 100 mL PBS) (Grade III; Sigma Chemical Co., Poole, UK) challenges were performed with a mean particle size of $3.2 \mu\text{m}$ and with an output of 3 mL/min. The last aerosol exposure was done 72 h before the end of the experiment¹³ (Fig. 1). The animals in the other groups were challenged with PBS.

Administration of smokeless tobacco extract (STE)

Commercially-prepared ST was bought from the local market (Ets El-Nardjass Company zone 06, Sidi Chehmi-Oran, Algeria). The lethal dose (LD50) concentration of the ST was calculated as 50 mg/kg rat body weight (b.w.) using LD50 for nicotine in rats as standard.¹⁴ The used ST concentrations were calculated as 80% of the LD50, which is 40 mg/kg (b.w.).¹⁴

An amount of 1 mL from the stock solution was administered by oral gavage (force-feeding) once per day for fifteen (15) days.¹⁴ On the days of the challenge, STE was given 30 min after the aerosol exposure.⁸

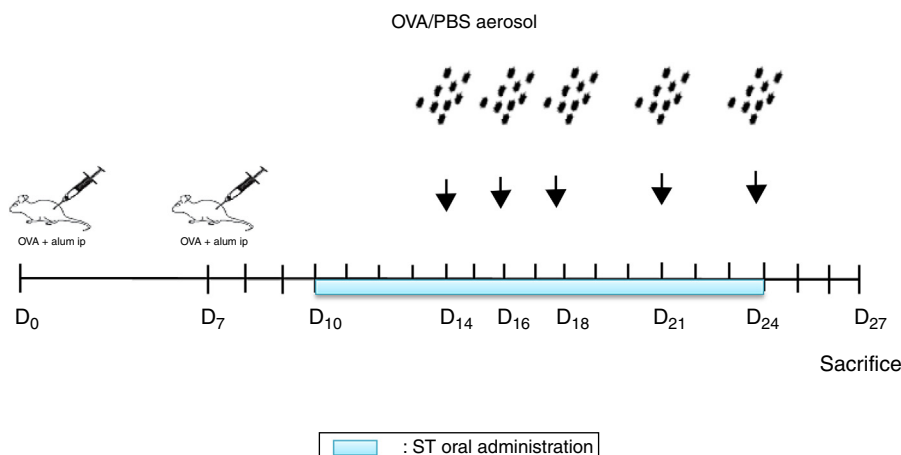


Figure 1 NSO was administered 4 days before the first injection. 2 Ovalbumin injections (IP) were performed on days 0 and 7. From days 14, 16, 18, 21 and 24, the animals were exposed to aerosolized OVA or saline. From days 10 to 24 ST were administrated. 72 h later, the rats were euthanized.

Plant

NSO was obtained from a local commercial market (Ets EL-BARAKA Company BPN° 302, Birkadem-Algiers, Algeria). The company produces NSO by cold pressing of fresh seeds without using chemicals. The NSO was administered orally by gavage for 31 days, at a dose of 4 mL/kg/day.¹² On the days of sensitization and challenge, NSO was given 30 min before the treatment.

Experimental protocol

The animals were assigned into eight groups of six rats:

Group 1: Control rats (C); Group 2: Ovalbumin challenged rats (Ova); Group 3: ST exposed rats; Group 4: NSO treated rats; Group 5: Ovalbumin challenged and ST treated rats (Ova/ST); Group 6: Ovalbumin challenged and NSO treated rats (Ova/NSO); Group 7: ST- and NSO-treated rats (ST/NSO); Group 8: Ovalbumin challenged, ST- and NSO-treated rats (Ova/ST/NSO).

Samples preparation

Animals were sacrificed by cervical decapitation. Blood samples were immediately collected in heparin tubes and plain vials, to obtain plasma and serum samples, respectively. Blood samples were centrifuged for 15 min at 3000 RPM and stored at -20°C prior to use.

The blood sediment after centrifugation containing erythrocytes, which were twice suspended in PBS (pH 7.4) and centrifuged at $3000 \times g$ for 15 min at 4°C for the first washing; and at $4000 \times g$ for 30 min at 4°C for the second washing. The lung was quickly removed, washed in 0.9% NaCl solution and weighed after the careful removal of the surrounding connective tissues, and then, about 1 g of tissue was homogenized in 2 mL of PBS at 1:2 (w/v), in ice-cold condition and pH 7.4. Homogenates were centrifuged at $3000 \times g$ for 35 min at 4°C . The hemolysates and tissues supernatants were then aliquoted and stored at -20°C prior to use.

The lungs of the rats concerned were lavaged by instillation with 2.0 mL PBS. The procedure was repeated three times before lavage fluid was pooled in Eppendorf tubes, and then centrifuged at $4000 \times g$ for 10 min. Cells were resuspended and enumerated using an improved Neubauer hemocytometer (Full Automatic Blood Cell Counter MODEL PCE-210N). Next, Eppendorf tubes containing BronchoAlveolar Lavage Fluid (BALF) were stored at -20°C prior to use for IL-4, NO and total proteins measurement.

Estimation of lipid peroxidation levels

The LPO was evaluated using the MalonDiAldehyde (MDA) level as final product in the lung and erythrocytes homogenates. MDA reacts with thiobarbituric acid (TBA) as a reactive substance (TBARS) to produce a red-colored complex.¹⁵ The absorbance was read at 530 nm.

Reduced glutathione (GSH) levels

GSH contents of lung and erythrocytes homogenates were estimated using a colorimetric technique¹⁵ based on the development of a yellow color when DTNB [5,5'-dithiobis-(2nitrobenzoic 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 at 420 nm by the Flohe and Gunzler method.¹⁵ Catalase (CAT) activity was measured according to the method of Aebi.¹⁵ 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. Superoxide dismutase (SOD) activity was determined using the method of Beyer and Fridovich.¹⁵ It was evaluated by measuring its ability to inhibit the photo-reduction of nitro blue tetrazolium (NBT). The reaction started by switching

the light on, and changes in absorbance were recorded at 560 nm after 20 min.

Protein assays

The proteins concentrations of supernatants of the lungs, erythrocytes and that of BALF were measured spectrophotometrically at 595 nm according to the method of Bradford,¹⁵ using bovine serum albumin as standard.

Non-protein thiols (NPSH) determination

NPSH levels were determined by the method of Ellman.¹⁶ The supernatant of the lung and erythrocytes was mixed (1:1) with 10% trichloroacetic acid. After centrifugation, the protein pellet was discarded and free -SH groups were determined in the clear supernatant. An aliquot of supernatant was added in 1 M potassium phosphate buffer pH 7.4 and 10 mM DTNB. The color reaction was measured at 412 nm.

Protein carbonyl groups determination

Protein carbonyl groups in the lung and erythrocytes homogenates were estimated by the method of Levine et al.,¹⁷ which is based on the derivatization of the carbonyl group with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH). This led to the formation of a stable 2,4-dinitrophenyl (DNP) hydrazone product. Absorbance was measured spectrophotometrically at 370 nm against a blank of a 6 M guanidine solution.

Nitric oxide (NO) measurements

The NO production in serum and BALF was determined by the detection of nitrite (NO_2^-) concentration from the Griess reaction.¹⁸ The absorbance was measured at 530 nm from an automatic microplate reader (Mindray MR-96A). Nitrite concentration was compared to a sodium nitrate standard curve.

Interleukin-4 (IL-4) measurement

Serum and BALF IL-4 levels were measured, according to the manufacturer's protocol, using Novex Rat IL-4 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) commercial kit purchased from Invitrogen (Camarillo, CA, USA). After measuring the optical density at 450 nm, the concentrations of IL-4 were determined by interpolation from a standard curve, with all data expressed in pg/mL.

Histopathological examination

Portions of lung were used for histopathological examinations. Tissues were fixed in 10% buffered formalin (pH 7.2) and dehydrated through a series of ethanol solutions, embedded in paraffin, and routinely processed for histological analysis.¹⁵ Sections of 5 μm in thickness were cut and stained with hematoxylin-eosin for examination. The stained tissues were observed through an optical

microscope (LEICA DM-750) and photographed by a digital camera (Canon Elph shot-305).

Statistical analysis

Values were presented as means $\pm$ standard error mean (SEM) for six rats of each group. Significant differences between the group's means were determined by one-way ANOVA followed by Student's *t* test. The statistical significance of difference was taken as $p < 0.05$.

Results

Cell counts and total protein levels in BALF

Cell counts revealed (in Table 1) that BALF of Ova-sensitized rats or ST contained a significantly decreased number of total cells, leucocytes and monocytes, compared with control animals, and a significant increase in the number of granulocytes. There was a substantial increase in the number of lymphocytes in Ova-sensitized rats. The administration of NSO to sensitized animals resulted in a significant improvement of the total cells, leucocytes, monocytes and granulocytes counts but did not affect the lymphocytes counts.

One-way ANOVA showed a significant increase in BALF total proteins levels in Ova-sensitized, ST exposed and Ova/ST co-exposure compared to the control group. The administration of NSO revealed a significant improvement only in combined Ova/ST exposed rats (Table 1).

IL-4 levels in serum and BALF

Serum IL-4 levels indicated a significant increase in Ova-sensitized, ST treated and Ova and ST co-exposed rats compared to control rats (Fig. 2a). However, the administration of NSO to sensitized animals resulted in a significant improvement of IL-4 levels in Ova-sensitized group and Ova/ST co-exposed group.

BALF IL-4 levels also showed a significant increase in Ova-sensitized, ST treated and Ova and ST co-exposed rats compared to control rats (Fig. 2b). In addition, combined Ova and ST exposure showed a significant increase compared to Ova-sensitized and ST exposed rats. However, the administration of NSO to sensitized animals resulted in a significant improvement of IL-4 levels in Ova-sensitized group, ST exposed group and Ova/ST co-exposed group.

NO levels in serum and BALF

Serum NO levels revealed a considerable increase in Ova-sensitized, ST exposed and Ova/ST co-exposed rats and a significant decrease in NSO-treated group compared to the control group (Fig. 2c). However, NSO administration resulted in a significant improvement in Ova-sensitized, ST exposed and Ova/ST co-exposed rats.

BALF NO levels showed a significant increase in Ova-sensitized, ST exposed and Ova/ST co-exposed rats compared to the control group (Fig. 2d). Nevertheless, NSO

Table 1 Cell numbers and total proteins levels in BALF of sensitized and treated rats.

Treatments	Parameters					
	Total cells ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Leucocytes ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Lymphocytes %	Monocytes %	Granulocytes %	Total proteins (mg/L)
C	01.63 $\pm$ 00.09	00.80 $\pm$ 00.05	36.66 $\pm$ 01.04	10.15 $\pm$ 00.63	53.18 $\pm$ 01.34	01.38 $\pm$ 00.07
Ova	00.92 $\pm$ 00.09***	00.47 $\pm$ 00.05***	43.36 $\pm$ 01.38***	03.80 $\pm$ 00.68***	59.30 $\pm$ 01.55**	01.84 $\pm$ 00.15**
ST	01.20 $\pm$ 00.11**	00.60 $\pm$ 00.03**	34.88 $\pm$ 01.44	07.25 $\pm$ 00.70**	57.86 $\pm$ 01.45**	01.69 $\pm$ 00.13*
NSO	01.71 $\pm$ 00.10	00.76 $\pm$ 00.04	37.10 $\pm$ 01.25	08.40 $\pm$ 00.44*	54.50 $\pm$ 01.66	01.47 $\pm$ 00.04
Ova/ST	01.02 $\pm$ 00.05***	00.52 $\pm$ 00.04***	42.82 $\pm$ 01.47****	03.40 $\pm$ 00.67****	58.44 $\pm$ 01.47**	02.14 $\pm$ 00.13****
Ova/NSO	01.38 $\pm$ 00.10**	00.65 $\pm$ 00.04**	40.10 $\pm$ 00.96**	05.75 $\pm$ 00.48**	54.74 $\pm$ 00.86**	01.56 $\pm$ 00.07*
ST/NSO	01.65 $\pm$ 00.10**	00.73 $\pm$ 00.03**	38.95 $\pm$ 01.27*	07.83 $\pm$ 00.62**	54.11 $\pm$ 01.52*	01.51 $\pm$ 00.06
Ova/ST/NSO	01.50 $\pm$ 00.10***	00.71 $\pm$ 00.05**	40.21 $\pm$ 01.47*	05.42 $\pm$ 00.43***	55.06 $\pm$ 00.84*	01.76 $\pm$ 00.08**

Values are given as mean $\pm$ SEM 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), compared to the Ova sensitized one (# p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001), compared to the ST treated one (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001), compared to the Ova/ST treated one (§ p < 0.05, §§ p < 0.01, §§§ p < 0.001).

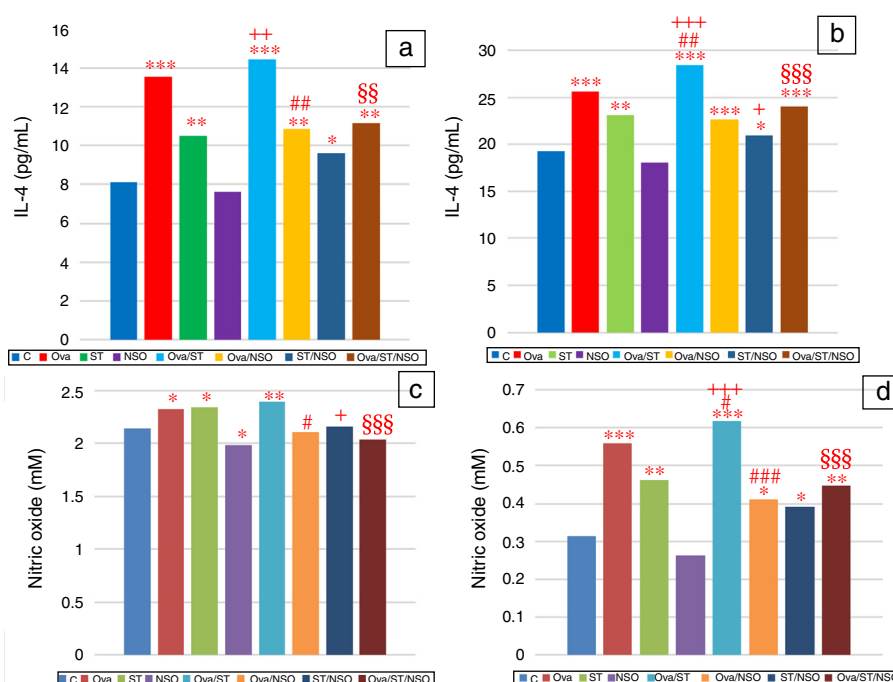


Figure 2 Significant difference: all treated groups compared to the control one (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001), compared to the Ova sensitized one (# p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001), compared to the ST treated one (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001), compared to the Ova/ST treated one (§ p < 0.01, §§ p < 0.001).

administration resulted in a significant improvement in Ova-sensitized, ST exposed and Ova/ST co-exposed rats.

Antioxidant defense status in the lung and erythrocytes

Ova-sensitization, ST exposure and Ova/ST co-exposure considerably increased the levels of MDA and protein carbonyl groups and decreased levels of GSH, GPx, CAT and SOD in the lung and erythrocytes of the sensitized group compared with the control group. Moreover, NSO administration resulted in a significant improvement of all these parameters in the studied organs (Table 2).

NPSH levels in the lung and erythrocytes

NPSH levels showed a significant decrease in Ova-sensitized, ST-exposed and Ova/ST-co-exposed rats compared to the control group in the lung and erythrocytes (Fig. 3). However, NSO administration brought about an important improvement in Ova-sensitized, ST-exposed and Ova/ST co-exposed rats.

Histopathological results

The histopathological examination of Ova-sensitized, ST-exposed and Ova/ST-co-exposed rats' lung revealed an

Table 2 Antioxidant defense status in lung and erythrocytes of treated and control rats.

Parameters	Compartment	Treatments							
		C	Ova	ST	NSO	Ova/ST	Ova/NSO	ST/NSO	Ova/ST/NSO
MDA (nmol/mg prot.)	Erythrocytes	01.55 ± 00.18	02.54 ± 00.13 ^{***}	02.39 ± 00.19 ^{**}	01.54 ± 00.27	02.76 ± 00.21 ^{***}	01.91 ± 00.22 ^{##}	01.83 ± 00.18 [*]	02.01 ± 00.06 ^{*§§}
	Lung	25.09 ± 00.90	40.82 ± 01.22 ^{***}	41.53 ± 01.00 ^{***}	27.07 ± 01.32	43.98 ± 01.22 ^{***#}	31.80 ± 02.77 ^{***##}	30.18 ± 01.03 ^{**+++}	34.54 ± 02.06 ^{***§§§}
Protein carbonyl groups (μmol/mg prot.)	Erythrocytes	20.78 ± 01.24	26.12 ± 01.14 ^{**}	27.61 ± 01.11 ^{***}	19.82 ± 00.66	30.64 ± 00.82 ^{***##}	23.58 ± 00.80 [#]	27.16 ± 00.94 ^{**+}	26.98 ± 01.12 ^{**§§}
	Lung	47.58 ± 01.88	53.21 ± 01.79 [*]	59.01 ± 01.95 ^{***}	48.52 ± 01.04	62.56 ± 01.98 ^{***##}	50.93 ± 01.24	51.66 ± 01.80 ⁺⁺	54.58 ± 01.96 ^{**§§}
GSH (μmol/mg prot.)	Erythrocytes	04.24 ± 00.34	02.52 ± 00.36 ^{**}	03.27 ± 00.29 [*]	04.12 ± 00.30	02.18 ± 00.08 ^{***+}	03.72 ± 00.51 [#]	03.80 ± 00.26	03.40 ± 00.36 ^{§§}
	Lung	00.72 ± 00.08	00.55 ± 00.03 [*]	00.43 ± 00.03 ^{**}	00.71 ± 00.11	00.32 ± 00.03 ^{***##+}	00.62 ± 00.04	00.54 ± 00.13	00.47 ± 00.07 [§]
GPx (μmol GSH/mg prot.)	Erythrocytes	02.38 ± 00.04	01.76 ± 00.14 ^{***}	01.96 ± 00.13 ^{**}	02.56 ± 00.35	01.74 ± 00.06 ^{***}	02.35 ± 00.17 ^{##}	02.33 ± 00.21	02.21 ± 00.19 ^{§§}
	Lung	01.02 ± 00.17	00.45 ± 00.06 ^{**}	00.58 ± 00.17 [*]	01.11 ± 00.30	00.48 ± 00.14 ^{**}	00.80 ± 00.09 ^{##}	00.64 ± 00.10 [*]	00.92 ± 00.20 [§]
CAT (μmol H ₂ O ₂ /mg prot.)	Erythrocytes	21.70 ± 02.92	11.57 ± 01.48 ^{**}	13.54 ± 00.99 ^{**}	22.02 ± 01.43	13.91 ± 01.15 ^{**}	18.73 ± 02.25 ^{##}	16.82 ± 00.73 ⁺	18.85 ± 01.42 ^{§§}
	Lung	75.30 ± 09.15	39.76 ± 03.24 ^{**}	48.61 ± 07.95 [*]	74.12 ± 06.10	35.98 ± 06.61 ^{**}	54.77 ± 05.84 [#]	61.35 ± 05.86	60.40 ± 05.67 ^{§§}
SOD (U/mg prot.)	Erythrocytes	291.64 ± 36.45	199.68 ± 04.55 ^{**}	222.82 ± 10.95 [*]	285.90 ± 25.73	195.95 ± 16.82 ^{**}	264.16 ± 35.95 [#]	270.01 ± 20.48 [*]	267.33 ± 22.47 ^{§§}
	Lung	242.38 ± 11.58	173.35 ± 06.23 ^{***}	205.58 ± 08.64 ^{**}	235.44 ± 11.56	193.77 ± 14.69 ^{**}	233.40 ± 24.82 ^{##}	220.08 ± 05.13 [*]	228.29 ± 04.92 [§]

Values are given as mean ± SEM for groups of six animals each. Significant difference: all treated groups compared to the control one (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$), compared to the Ova sensitized one ([#] $p < 0.05$, ^{##} $p < 0.01$, ^{###} $p < 0.001$), compared to the ST treated one (^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$, ^{***} $p < 0.001$), compared to the Ova/ST treated one ([§] $p < 0.05$, ^{§§} $p < 0.01$, ^{§§§} $p < 0.001$).

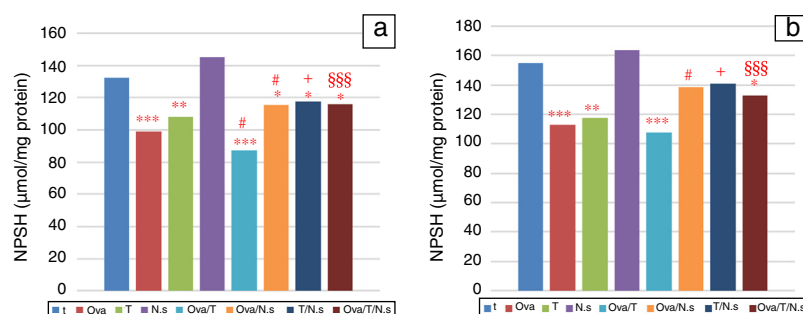


Figure 3 Significant difference: all treated groups compared to the control one (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$), compared to the Ova sensitized one (# $p < 0.05$), compared to the ST treated one (* $p < 0.05$), compared to the Ova/ST treated one (§§§ $p < 0.001$).

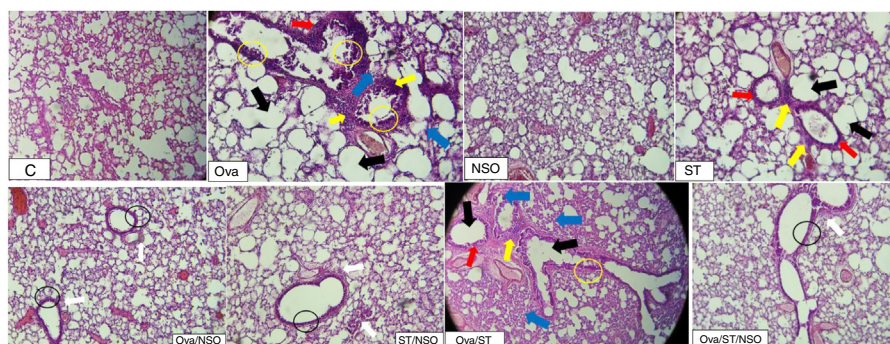


Figure 4 The control rat showing normal histological structure. Ova-sensitized, ST exposed and combined Ova/ST exposed rats' lung showing inflammatory cell infiltration (yellow arrow), goblet cells hyperplasia (red arrow), mucus hypersecretion (yellow circle), edema (black arrow) and fibrosis (blue arrow). The NSO-treated rat lung showing reduction of inflammatory cell infiltration (white arrow), a smaller degree of goblet cells hyperplasia (dark circle) and normal cells morphology compared to the control group. NSO-treated rat lung showing normal appearance of cells.

Table 3 Semi-quantitative scoring of architectural damage on histopathological examination of the rat lungs in the different treatment groups.

Features	Treatments							
	Control	Ova	NSO	ST	Ova/ST	Ova/NSO	ST/NSO	Ova/ST/NSO
Inflammatory cell infiltration	—	++	—	+	+++	+	+	+
Goblet cells hyperplasia	—	++	—	+	+++	+	—	+
Mucus hypersecretion	—	++	—	—	++	—	—	+
Edema	—	++	—	+	+++	—	—	+
Fibrosis	—	+	—	—	+++	—	—	+

(—) indicates none or without features, (+) indicates mild, (++) indicates moderate and (+++) indicates severe.

inflammatory cell infiltration (yellow arrow), goblet cells hyperplasia (red arrow) with mucus hypersecretion (yellow circle) edema (black arrow) and fibrosis (blue arrow) (Fig. 4). However, NSO administration revealed a reduction of inflammatory cell infiltration (white arrow), a smaller degree of goblet cells hyperplasia (dark circle) and normal cells morphology compared to Ova-sensitized, ST-exposed and Ova/ST-co-exposed groups. Furthermore, no histological alterations were observed in the lung of NSO-treated group when compared to the control (Table 3).

Discussion

It has been well proven that cigarette smoke causes the exacerbation of asthma as demonstrated by functional airway hyperreactivity and elevated levels of blood eosinophilia in Ova-sensitized mice.⁸ However, to the best of our knowledge, no study is available showing comparisons of ST exposure versus Ova-sensitized rats or asthmatic patients. In the present study, we selected an animal model of asthma showing all the salient features of allergic air-

way inflammation in humans, namely increased Th2 cytokine levels in BALF, enhanced airway responsiveness, airway eosinophilic inflammation, and goblet cell hypertrophy and hyperplasia.¹² Under these conditions, IL-4 is necessary for the differentiation of T cells to the Th2 type. It is also a key factor for isotype switching to IgE in B cells,¹⁹ regulation of chemokines required for eosinophil migration,²⁰ and may increase mucus secretion in the allergic airways.¹³ In fact, Mauser et al.²¹ suggested that the provocation with the allergen (in an animal model of asthma) induced increased microvascular infiltration and edema, thus the swelling of the inflamed organ. This inflammatory phenomenon, which is due to the penetration of the allergen (like Ovalbumin), results in the migration of inflammatory cells from the vascular compartment to the lungs. The ratio of leukocytes, attested by cytologic examination of blood and fluid of bronchoalveolar lavage, increase and represent an important regulator of the immune response. Thus, the migration of these inflammatory cells (especially the eosinophils) in the lungs, also attested by histopathological analysis of lung tissues, mainly contributes to the development of airway inflammation that induces epithelial damage leading to bronchial remodeling.²²

The results obtained revealed that Ova/ST co-exposure significantly increased IL-4 and NO levels in BALF when compared to Ova-sensitized rats. However, NSO administration showed a significant improvement compared to Ova/ST co-exposed rats. Indeed, NO is a signaling molecule responsible for several diverse physiological and pathophysiological processes. Up to now, the prevailing hypothesis about NO has been that it contributes to toxicant-induced lung inflammation and injury.²³ Many previous studies have associated the expression of NO with patients suffering from asthma²⁴ and those with Ova-induced asthma in experimental animals²⁵ with an elevated degree with cigarette smokers having this disease.²⁶ Moreover, previous studies²⁷ have corroborated that components within ST extract can influence the course of T cell cytokine production.

However, Boskabady et al.²⁸ have reported that the hydroethanolic extract of *N. sativa* seeds suppresses IL-4 production and enhances IFN- γ production in the blood of Ova-sensitized guinea pigs. Moreover, Balaha et al.¹² clearly demonstrated that the oral treatment with NSO dose dependently inhibited Th2 cytokine production (IL-4, IL-5 and IL-13) and recovered the decreased Th1 cytokine production (IFN- γ) in the BALF after antigen challenge in sensitized mice. Furthermore, as reported in the literature, the production of NO is also influenced by the presence of different alkaloids (nigellidine, nigellimine and nigellicine) in NSO.²⁵

NO is a free radical playing a pivotal role just as much as the LPO. It is one of the main manifestations of oxidative damages, which has proven to play an important role in the toxicity and carcinogenicity of several xenobiotics.²⁹ Moreover, protein carbonyls have a major advantage over lipid peroxidation products as oxidized proteins are generally more stable, form earlier and circulate in the blood for longer periods.³⁰ Actually, it is the most general indicator and by far the most commonly used marker of protein oxidation and the accumulation of protein carbonyls. The latter has been observed in several human diseases, including inflammatory and oxidative lung injury.³¹ In the present

study, the levels of malondialdehyde were measured to indicate the generation of ROS and tissue damage induced by the LPO in erythrocytes and lungs. We observed significantly high MDA levels in the lung of Ova/ST co-exposed rats compared to the Ova-sensitized group. This accumulation is an indicator of peroxidation of microsomal lipids.³² Furthermore, it has been shown that ST administration in rats induces oxidative stress resulting in the boosted levels of MDA,³ as well as in ST human consumers.² Moreover, we noticed a significant increase of protein carbonyl content in the erythrocytes and the lung of Ova/ST co-exposed rats compared to the Ova-sensitized group. The intracellular level of oxidized proteins reflects the balance between the rate of protein oxidation and that of oxidized protein degradation.³³ However, NSO supplementation causes a significant decrease of MDA levels and protein carbonyl content in Ova/ST co-exposed rats. This improvement could be explained by the fact that NSO possesses components such as polyphenols and flavonoids that prevent the formation of ROS.³⁴ It has also been demonstrated that NSO enhances the tissue capacity for detoxifying ROS.³⁵

On the other hand, reducing glutathione is only one among many potential antioxidant defenses involved in the protection of various organs against oxidant-induced injury in inflammation.³⁶ Therefore, GSH is a strong nucleophile that often inactivates electrophilic reactive compounds by either direct non-enzymatic conjugation or enzymatic catalysis.³ During the metabolism of tobacco, many electrophiles which are detoxified by the use of GSH are generated.³⁷ The decreased GSH levels increase the free radical burden due to ineffective removal of ROS from the tissues. Our results proved that Ova/ST co-exposure significantly decreased GSH levels and GPx activity in lung compared to the Ova-sensitized group. Thus, the toxicity of ST in various organs – especially the lung – might be due to the formation of the radical species. The overproduction of these radicals has an inhibitory effect on the enzymes responsible for the removal of ROS, such as GPx.³ Thus, its decrease is the reflection of its intense use in both situations of cellular stress, namely those of allergic inflammation and tobacco administration. Nonetheless, NSO pretreatment in Ova/ST co-exposed rats resulted in a significant improvement of GSH levels in lung, which suggests that NSO may be protective against the oxidation via free-radical scavenging property. Indeed, it has previously been reported in the literature that phytochemicals stimulate the synthesis of antioxidant enzymes and detoxification systems at the transcriptional level through antioxidant response elements.³⁸ The pre-treatment with NSO, in the present study, significantly increased GPx activity in Ova, ST- and Ova/ST-exposed rats. These findings extended the knowledge of the antioxidant effects of NSO extracts, which is certainly due to their content of thymoquinone.³⁹

Among the antioxidants found in the case of stress, non-protein thiol is present in high concentrations because it plays a crucial role in protecting the lung from oxidative stress by detoxifying exogenous and endogenous toxicants, and quenching ROS.⁴⁰ In this study, the levels of NPSH were found to significantly decrease in the lungs of Ova/ST co-exposed rats compared to the Ova-sensitized rats. Indeed, various experimental research studies⁴¹ have demonstrated that tobacco exposure induces the depletion of NPSH in the

lungs of rats. However, NSO administration resulted in the significant increase of NPSH in Ova, ST and Ova/ST exposed rats. The findings are in agreement with many previous studies that have demonstrated that supplementation with antioxidants such as diphenyl diselenide,⁴² selenium⁴³ and rutin⁴⁴ leads to the restoration of NPSH levels in oxidative stress injury.

All previous results are in accordance with the present histopathological study of lung. In fact, the contraction, thickening and abnormality of the smooth muscle of airways are mainly responsible for the AHR in asthma. The lung histopathological finding of this study showed inflammatory cell infiltration, goblet cells hyperplasia and mucus hypersecretion in the OVA and OVA/ST treated rats. The release of various inflammatory mediators like IL-4 has been confirmed to play a vital role in mucus hypersecretion and goblet cell hyperplasia.²²

Over a hundred different chemical constituents have been identified in *N. sativa*, attributing it therapeutic virtues. The black cumin seed is composed of fixed (stable) and essential (volatile) oil which is responsible for many of the beneficial effects. The fixed oil contains appreciable quantities of unsaturated fatty acids (linoleic, oleic, and inolenic acids) as well as saturated fatty acids in minor amounts (arachidonic and eicosenoic acids), all considered as powerful antioxidants.^{7,9} In addition to the fatty acid profile, other bioactive compounds have been reported, such as vitamin E (tocopherol α , β , and γ), retinol (vitamin A), carotenoids (β -carotene), and thymoquinone (2-isopropyl-5methyl-1,4-benzoquinone), fat-soluble vitamins. Some of the phytosterols which have a high beneficial effect on inflammation include β -sitosterol, avenasterol, stigmasterol, campesterol and TQ, 46% monoterpenes including p-cymene, α -pinene, thymol (THY), dithymoquinone (DTQ, nigellone), and thymohydroquinone (THQ).⁹

Finally, in harmony with the literature data showing the anti-inflammatory and antioxidant effects of NS,¹² the present study validates not only antiasthmatic traditional use of the *N. sativa* but in addition showed that NSO administration deleted the proinflammatory and oxidative stress changes caused either by OVA sensitization or ST administration or both at once. Actually, this is what offers the quality of originality to our study. Thanks to its well-documented anti-inflammatory and antioxidant properties *N. sativa* would protect against the adverse effects of ST and is more endowed with anti-asthmatic properties.

Conclusion

Overall, the findings of the present study demonstrated that the short-term administration of ST in a rat model of allergic asthma clearly contributed to the worsening of lung inflammation through the increase in the production of IL-4 and NO. Moreover, ST intensifies the oxidative stress state induced by Ova-challenge in rat, which was shown by augmenting lipid peroxidation, protein oxidation and by altering the non-enzymatic and enzymatic antioxidant status. Furthermore, the aggravation of inflammation and oxidative stress was obviously affirmed by the lung histopathological changes observed in the present study. In contrast, the NSO administration has shown anti-inflammatory and antiox-

idant effects by reducing IL-4 and NO production, restoration of the antioxidant status and reduction of lipid peroxidation and protein oxidation. Besides, the NSO treatment improved the histological alterations induced by Ova and ST co-exposure in rats.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

Acknowledgments

The authors would like to thank the DGSRTD (General Directorate for Scientific Research and Technological Development) and the ATRSS (Agence Thématique de Recherche en Sciences de la Santé) for the support of this research work, via PNR projects (33/DFPR/ATRSS). They also wish to extend their thanks to Mrs. Leila MAHFOUDHI, Major teacher of English at the Sfax Faculty of Science, for proofreading and polishing the language of the manuscript.

References

1. Schivo M, Avdalovic MV, Murin S. Non-cigarette tobacco and the lung. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2014;46:34–53.
2. Velayutharaj A, Ramesh R, Niranjana G, Kala C. Biochemical assessment of liver damage in smokeless tobacco users. *Int J Curr Res Rev*. 2013;5:63–9.
3. Avti PK, Kumar S, Pathak CM, Vaiphei K, Khanduja KL. Smokeless tobacco impairs the antioxidant defense in liver, lung, and kidney of rats. *Toxicol Sci*. 2006;89:547–53.
4. Abdel-Aziz M, Abass A, Zalata K, Abd Al-Galel T, Allam U, Karrouf G. Effect of dexamethasone and *Nigella sativa* on inducible nitric oxide synthase in the lungs of a murine model of allergic asthma. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2014;13:324–34.
5. Chekchaki N, Khaldi T, Rouibah Z, Rouag M, Sekiou O, Mes-sarah M, et al. Anti-inflammatory and antioxidant effects of two extracts from *Pistacia lentiscus* in liver and erythrocytes, in an experimental model of asthma. *Int J Pharm Sci Rev Res*. 2017;42:77–84.
6. Khan M. The translation of the meanings of Sahih Al-Bukhari (Arabic–English), vol. 7. Kingdom of Saudi Arabia: Darussalam Publishers and Distributors: Riyadh; 1997.
7. Aftab A, Asif H, Mohd M, Shah AK, Abul KN, Nasir AS, et al. A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: a miracle herb. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013;3:337–52.
8. Moerlose KB, Pauwels RA, Joos GF. Short-term cigarette smoke exposure enhances allergic airway inflammation in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172:168–72.
9. Amin B, Hosseinzadeh H. Black cumin (*Nigella sativa*) and its active constituent, thymoquinone: an overview on the analgesic and anti-inflammatory effects. *Planta Med*. 2016;82:8–16.
10. Lutterodt H, Luther M, Slavin M, Yin J-J, Parry J, Gao J-M, et al. Fatty acid profile, thymoquinone content, oxidative stability, and antioxidant properties of cold-pressed black cumin seed oils. *Food Sci Technol*. 2010;43:1409–13.
11. Ramadan MF. Healthy blends of high linoleic sunflower oil with selected cold pressed oils: functionality, stability and antioxidant characteristics. *Ind Crops Prod*. 2013;43:65–72.
12. Balaha MF, Tanaka H, Yamashita H, Abdel Rahman MN, Inagaki N. Oral *Nigella sativa* oil ameliorates ovalbumin-induced bronchial asthma in mice. *Int Immunopharmacol*. 2012;14:224–31.
13. Temann T, Prasad B, Gallup M, Basbaum C, Ho SB, Flavell RA, et al. A novel role for murine IL-4 in vivo: induction of MUC5AC

- gene expression and mucin hypersecretion. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997;16:471–8.
14. Adias TC, Ajugwo AO, Erhabor TA, Adejumo BI, Azikiwe CC. Effect of sub-lethal doses of smokeless tobacco (snuff) on some haemato rheological parameters using albino Wistar rats. *Am J Med Sci Med*. 2014;2:54–7.
 15. Barkat L, Boumendjel A, Abdenour C, Boulakoud MS, El Feki A, Messarah M. Methidathion-induced hematological, biochemical and hepatohistological alterations in rat: ameliorative effects of selenium and zinc. *Afr J Biotechnol*. 2015;14:1796–806.
 16. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem*. 1959;82:70–7.
 17. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1990;186:464–78.
 18. Oswald IP, Wynn TA, Sher A, James SL. Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:8676–80.
 19. Boumendjel A, Tawk L, Malefijt RW, Boulay V, Yssel H, Pène J. IL-27 induces the production of IgG1 by human B cells. *Eur Cytokine Netw*. 2006;17:281–9.
 20. Bochner BS, Udem BJ, Lichtenstein LM. Immunological aspects of allergic asthma. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:295–335.
 21. Mauser PJ, House H, Jones H, Correll G. Pharmacological characterization of the late phase reduction in lung functions and correlations with microvascular leakage and lung edema in allergen-challenged Brown Norway rats. *Pulm Pharmacol Ther*. 2013;26:677–84.
 22. Zemmouri H, Sekiou O, Ammar S, El Feki A, Messarah M, Boumendjel A. *Urtica dioica* attenuates ovalbumin-induced inflammation and lipid peroxidation of lung tissues in rat asthma model. *Pharm Biol*. 2017;55:1561–8.
 23. Vliet VD, Nguyen MN, Shigenaga MK, Eiserich JP, Marelich GP, Cross CE. Myeloperoxidase and protein oxidation in cystic fibrosis. *Am J Physiol: Lung Cell Mol Physiol*. 2000;279: L537–46.
 24. Mahut B, Delacourt C, Zerah-Lancner F, De Blic J, Harf A, Delclaux C. Increase in alveolar nitric oxide in the presence of symptoms in childhood asthma. *Chest*. 2004;125:1012–8.
 25. Shahzad M, Yang X, Raza Asim MB, Sun Q, Han Y, Zhang F, et al. Black seed oil ameliorates allergic airway inflammation by inhibiting T-cell proliferation in rats. *Pulm Pharmacol Ther*. 2009;22:37–43.
 26. Jang AS, Choi IS, Jeong TK, Lee KY. The effect of cigarette smoking on the levels of nitric oxide metabolites in the sputum of patients with acute asthma. *J Asthma*. 2002;39:211–6.
 27. Petro TM, Zhang S. The effect of smokeless tobacco extract on murine T cell cytokine production. *Immunopharmacology*. 1997;36:17–26.
 28. Boskabady MH, Keyhanmanesh R, Khameneh S, Doostdar Y, Khakzad MR. Potential immunomodulation effect of the extract of *Nigella sativa* on ovalbumin sensitized guinea pigs. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2011;12:201–9.
 29. Mahmood MS, Gilani AH, Khwaja A, Rashid A, Ashfaq MK. The in vitro effect of aqueous extract of *Nigella sativa* seeds on nitric oxide production. *Phytother Res*. 2003;17:921–4.
 30. Kujawska M, Ignatowicz E, Murias M, Ewertowska M, Mikolajczyk K, Jodynis-Liebert J. Protective effect of red beetroot against carbon tetrachloride- and N-nitrosodiethylamine-induced oxidative stress in rats. *J Agric Food Chem*. 2009;57:2570–800.
 31. Dalle-Donne I, Rossib R, Giustarinib D, Milzania A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*. 2003;329:23–38.
 32. Ghosh MK, Chattopadhyay DJ, Chatterjee IB, Vitamin C. Prevents oxidative damage. *Free Radic Res*. 1996;25:173–9.
 33. Sitte N. Oxidative damage to proteins. In: von Zglinicki T, editor. Aging at the molecular level. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 2003. p. 27–45.
 34. Bouasla I, Bouasla A, Boumendjel A, Messarah M, Abdenour C, Boulakoud MS, et al. *Nigella sativa* oil reduces aluminium chloride-induced oxidative injury in liver and erythrocytes of rats. *Biol Trace Elem Res*. 2014;162:252–61.
 35. Mariod AA, Ibrahim RM, Ismail M, Ismail N. Antioxidant activity and phenolic content of phenolic rich fractions obtained from black cumin (*Nigella sativa*) seedcake. *Food Chem*. 2009;116:306–12.
 36. Rahman I, MacNee W. Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. *Am J Physiol: Lung Cell Mol Physiol*. 1999;277:1067–88.
 37. Cotgreave IA, Johansson U, Moldeus P, Brattsand R. The effect of acute cigarette smoke inhalation on pulmonary and systemic cysteine and glutathione redox states in the rat. *Toxicology*. 1987;45:203–12.
 38. Krishnan N, Muthukrishnan S. Effects of *Nigella sativa* seed extract on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. *J Acute Med*. 2012;2:107–13.
 39. Alenzi FQ, Altamimi MA, Kujan O, Tarakji B, Tamimi W, Bagader O, et al. Antioxidant properties of *Nigella sativa*. *J Mol Genet Med*. 2013;7:77–82.
 40. Heffner JE, Rapine JE. Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am Rev Respir Dis*. 1989;140:531–54.
 41. Ardite E, Peinado VI, Rabinovich RA, Fernandez-Checa JC, Roca J, Barberà JA. Systemic effects of cigarette smoke exposure in the guinea pig. *Respir Med*. 2006;100:1186–94.
 42. Menezes N, Leitemperger J, Toni C, Santi A, Lopes T, Barbosa MB, et al. Comparative study on effects of dietary with diphenyl diselenide on oxidative stress in carp (*Cyprinus carpio*) and silver catfish (*Rhamdia* sp.) exposed to herbicide clomazone. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2013;36:706–14.
 43. Elia AC, Prearo M, Pacini N, Dorr AJ, Abete MC. Effects of selenium diets on growth, accumulation and antioxidant response in juvenile carp. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2011;74:166–73.
 44. Pes TS, Saccol EM, Ourique GM, Londero OP, Gressler LT, Finamor IA, et al. Effect of diets enriched with rutin on blood parameters, oxidative biomarkers and pituitary hormone expression in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Fish Physiol Biochem*. 2016;42:321–33.

Chapitre

In

**Recent Advances in Environmental Science from the Euro-Mediterranean
and Surrounding Regions**

**Proceedings of Euro-Mediterranean Conference for Environmental
Integration (EMCEI-1), Tunisia 2017.**

Volume I and Volume II

In

Advances in Science, Technology & Innovation IEREK Interdisciplinary Series for
Sustainable Development

ISBN 978-3-319-70547-7 ISBN 978-3-319-70548-4 (eBook)

<https://doi.org/10.1007/978-3-319-70548-4>

**PROTECTIVE EFFECTS OF *Nigella sativa* OIL ON IL-4 AND NITRIC
OXIDE LEVELS IN A MODEL OF EXPERIMENTAL ASTHMA IN
WISTAR RAT**

Taha Khaldi, Zineb ROUIBAH, Meriem ROUAG, Mahfoud MESSARAH, and
Amel BOUMENDJEL.



Advances in Science, Technology & Innovation
IEREK Interdisciplinary Series for Sustainable Development

Amjad Kallel · Mohamed Ksibi
Hamed Ben Dhia · Nabil Khélifi *Editors*

Recent Advances in Environmental Science from the Euro-Mediterranean and Surrounding Regions

Proceedings of Euro-Mediterranean Conference
for Environmental Integration (EMCEI-1), Tunisia 2017



Amjad Kallel · Mohamed Ksibi
Hamed Ben Dhia · Nabil Khélifi
Editors

Recent Advances in Environmental Science from the Euro-Mediterranean and Surrounding Regions

Proceedings of Euro-Mediterranean
Conference for Environmental Integration
(EMCEI-1), Tunisia 2017

Volume I and Volume II

Editors

Amjad Kallel
National School of Engineering of Sfax
University of Sfax
Sfax
Tunisia

Hamed Ben Dhia
National School of Engineering of Sfax
University of Sfax
Sfax
Tunisia

Mohamed Ksibi
Higher Institute of Biotechnology of Sfax
University of Sfax
Sfax
Tunisia

Nabil Khélifi
Springer Nature
Heidelberg, Baden-Württemberg
Germany

ISSN 2522-8714 ISSN 2522-8722 (electronic)
Advances in Science, Technology & Innovation
IEREK Interdisciplinary Series for Sustainable Development
ISBN 978-3-319-70547-7 ISBN 978-3-319-70548-4 (eBook)
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-70548-4>

Library of Congress Control Number: 2017958022

© Springer International Publishing AG 2018

This work is subject to copyright. All rights are reserved by the Publisher, whether the whole or part of the material is concerned, specifically the rights of translation, reprinting, reuse of illustrations, recitation, broadcasting, reproduction on microfilms or in any other physical way, and transmission or information storage and retrieval, electronic adaptation, computer software, or by similar or dissimilar methodology now known or hereafter developed.

The use of general descriptive names, registered names, trademarks, service marks, etc. in this publication does not imply, even in the absence of a specific statement, that such names are exempt from the relevant protective laws and regulations and therefore free for general use.

The publisher, the authors and the editors are safe to assume that the advice and information in this book are believed to be true and accurate at the date of publication. Neither the publisher nor the authors or the editors give a warranty, express or implied, with respect to the material contained herein or for any errors or omissions that may have been made. The publisher remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Printed on acid-free paper

This Springer imprint is published by Springer Nature
The registered company is Springer International Publishing AG
The registered company address is: Gewerbestrasse 11, 6330 Cham, Switzerland

Protective Effects of *Nigella Sativa* Oil on IL-4 and Nitric Oxide Levels in a Model of Experimental Asthma in Wistar Rat

Taha Khaldi, Zineb Rouibah, Meriem Rouag, Mahfoud Messarah, and Amel Boumendjel

Keywords

Nigella sativa • Asthma • Allergic inflammation • Chronic pathology • Therapeutic Wistar rat

1 Introduction

Allergic inflammation associated with airway hyperreactivity is the main feature of allergic asthma, that affects about 300 million people of all ages worldwide and is increasing by 50% per decade (Abdel-Aziz et al. 2014). The inflammatory response is characterized by an increase in the numbers of eosinophils and mast cells, mucus hypersecretion and activation of T cells, development of various structural alterations in airway wall and smooth muscles of blood vessels in lung tissues (Raza et al. 2010).

Nigella sativa commonly known as black seed is an annual herbaceous plant belonging to the Ranunculaceae family. It has been widely studied for its pharmacological and therapeutic effects and shown to have extensive range of activities as antibacterial, antifungal, antidiabetic, antioxidant, anti-inflammatory and analgesic, anticancer and immunomodulatory properties (Aftab et al. 2013). Many active compounds have been isolated and identified through

phytochemical investigations such as phenolic acid, epicatechin, quercetin and flavones. Moreover, most of the therapeutic properties of this plant are related to the presence of thymoquinone (TQ) which is the main active chemical component of essential oil (Aftab et al. 2013).

Different animal models have been developed in order to investigate the therapeutic effect of *Nigella sativa* oil (NSO) on allergic asthma. However, we selected our model as it shows all the salient features of allergic airway inflammation in humans including increased serum antigen-specific IgE, increased Th2 cytokine levels and decreased Th1 cytokine levels in BALF, enhanced airway responsiveness, airway eosinophilic inflammation, and goblet cell hypertrophy and hyperplasia (Balaha et al. 2012). In the present study, we aimed to investigate preventive and ameliorating effects of NSO, at a dose of 4 mL/Kg (b. w.) during 31 days, on IL-4 and nitric oxide levels in an allergen-induced airway inflammation in a mouse model of allergic asthma.

2 Materials and Methods

2.1 Animals

Twenty-Four Wistar albino male rats weighing 160 ± 10 g (6–8 weeks old), obtained from Pasteur institute (Algiers, Algeria) were used. The animals were housed in polypropylene cages which were sanitized every 48 h. The rats were fed a standard laboratory diet (standard food, supplied by the “ONAB of Bejaia”, Algeria) and clean tap water ad libitum. They were exposed to a natural photoperiod, at temperature of 25 ± 1 °C and a relative humidity of $40 \pm 5\%$ and allowed to acclimatize in this condition for 2 weeks prior to experimental use.

T. Khaldi (✉) · Z. Rouibah · M. Rouag · M. Messarah
A. Boumendjel
Laboratory of Biochemistry and Environmental Toxicology,
Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar
University, Annaba, Algeria
e-mail: khaldi.taha@univ-annaba.org

Z. Rouibah
e-mail: zineb.rouibah@hotmail.com

M. Rouag
e-mail: rouag_meriem@yahoo.fr

M. Messarah
e-mail: mmessarahdz@yahoo.fr

A. Boumendjel
e-mail: amelibis@yahoo.fr

2.2 Sensitization and Aerosol Exposure

The rats were immunized by an intraperitoneal injection of 10 mg ovalbumin (Ova) adsorbed to 1 mg aluminum hydroxide in a volume of 1 mL phosphate buffered saline (PBS) on Day 0 and boosted on Day 7 (Moerloose et al. 2005). At Days 14, 16, 18, 21, and 24, rats were placed in a plexiglass exposure chamber connected to the outlet of an ultrason aerosol generator (OMRON, NE-C29-E) for 30 min. Ovalbumin (1% OVA-solution) (Grade III; Sigma chemical Co., Poole, UK) challenges were performed with a mean particle size of 3.2 μm and with an output of 3 mL/min. To avoid the tolerance induction, allergen exposures did not take place daily. The last aerosol exposure was performed 72 h before the end of the experiment (Moerloose et al. 2005). The animals in the other groups were sensitized with PBS.

2.3 Plant

NSO was obtained from a local commercial market. The company produces NSO by cold pressing of fresh seeds without using chemicals. The NSO was administered orally by gavage for 31 days, at a dose of 4 mL/kg/day (Balaha et al. 2012). On the days of sensitization and challenge, NSO was given 30 min before the treatment.

2.4 Interleukin-4 (IL-4) Measurement

Serum and broncho alveolar lavage fluid (BALF) IL-4 levels were measured, according to the manufacturer's protocol, using Novex Rat IL-4 ELISA commercial kit purchased from Invitrogen (Camarillo, CA, USA). After measuring the optical density at 450 nm, the concentrations of IL-4 is determined by interpolation from a standard curve, and all data were expressed in pg/mL.

2.5 Nitric oxide (NO) Measurement

Nitric oxide production in serum and BALF was determined by the detection of nitrite (NO₂) concentration from the Griess reaction (Valença et al. 2009). Briefly, 100 μL of each sample was added to equal volume of Griess reagents (1.5% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylene diamine dihydrochloride, 2.5% phosphoric acid) in a microtiter plate and incubated for 20 min at room temperature in the dark. The absorbance was measured at 530 nm from an automatic microplate reader (Mindray MR-96A). Nitrite concentration was compared to a sodium nitrate standard curve.

3 Results and Discussion

Our results show a significant increase ($p \leq 0.001$) of IL-4 levels in serum and BALF in Ova-sensibilised rats compared to the control group (Fig. 1). Moreover, we noticed a significant increase of NO levels in serum ($P \leq 0.05$) and BALF ($P \leq 0.001$) (Table 1). However, the administration of NSO to sensitized animals resulted in a significant improvement ($P \leq 0.01$) of IL-4 levels in serum and BALF of Ova-sensitized group (Fig. 1). Furthermore, NO levels showed a significant improvement in serum ($P \leq 0.05$) and BALF ($P \leq 0.001$) (Table 1).

IL-4 is necessary for differentiation of T cells to the Th2 type and is a key factor for isotype switching to IgE in B cells, regulation of chemokines required for eosinophil migration and may increase mucus secretion in the allergic airways (Boumendjel et al. 2006). Therefore, restoration of local Th1/Th2 cytokine balances is a rational strategy for developing new treatment approaches for allergic asthma (Balaha et al. 2012). Our results are in agreement with many previous studies which demonstrated that *Nigella sativa* suppresses IL-4 production and recovers the decreased Th1 cytokine production (IFN- γ) after antigen challenge in sensitized mice (Balaha et al. 2012).

Fig. 1 IL-4 levels in serum (a) and BALF (b) of treated and control rats. Significant difference: treated groups compared to the control one (** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$), compared to the Ova sensitized one (## $p \leq 0.01$)

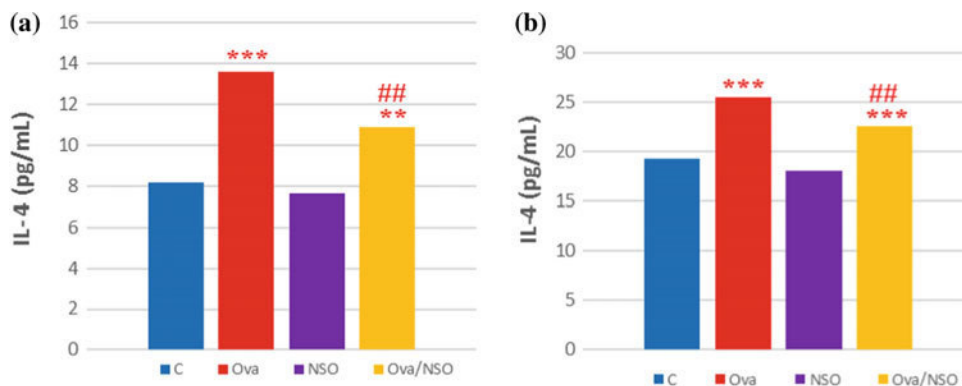


Table 1 Nitric oxide (NO) levels in serum and BALF of treated and control rats

Parameters and treatments	Serum (mM)	BALF (mM)
C	02.14 ± 0.06	0.31 ± 0.04
Ova	02.32 ± 0.07*	0.55 ± 0.02***
NSO	01.98 ± 0.05*	0.26 ± 0.01
Ova/NSO	02.10 ± 0.08 [#]	0.41 ± 0.03 ^{####}

Values are given as mean ± S.E.M for groups of six animals each. Significant difference: treated groups compared to the control one (* $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$), compared to the Ova sensitized one ([#] $p \leq 0.05$, ^{####} $p \leq 0.001$)

Nitric oxide is a signaling molecule responsible for several diverse physiological and pathophysiological processes, and so far the prevailing hypothesis about NO has been that it contributes to toxicant-induced lung inflammation and injury (Suralkar et al. 2013). Moreover, NO is an important marker of lung inflammation and increased exhaled NO levels have been found in patients with asthma as well as in Ova-induced asthma in experimental animals (Mahut et al. 2004). Furthermore, this NO is a free radical playing a pivotal role as a vasodilator, neurotransmitter and immune regulator in a variety of tissues at physiological concentrations (Suralkar et al. 2013). Furthermore, as reported in the literature, the production of NO is also influenced by the presence of different alkaloids (nigellidine, nigellimine and nigellidine) in *Nigella sativa* oil (Shahzad et al. 2009).

4 Conclusion

The present study suggested that *Nigella sativa* oil has an effective role to attenuate the intensity of allergic inflammation generated in a model of experimental

asthma and can represent a potential treatment for this pathology.

References

- Abdel-Aziz M, Abass A, Zalata K, Abd Al-Galel T, Allam U, Karrouf G. Effect of dexamethasone and *Nigella sativa* on inducible nitric oxide synthase in the lungs of a murine model of allergic Asthma. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2014;13(5):324–34.
- Aftab A, Asif H, Mohd M, Shah AK, Abul KN, Nasir AS, Zoheir AD, Firoz A. A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013;3(5):337–52.
- Balaha MF, Tanaka H, Yamashita H, Abdel Rahman MN, Inagaki N. Oral *Nigella sativa* oil ameliorates ovalbumin-induced bronchial asthma in mice. *Int Immunopharmacol*. 2012;14:224–31.
- Boumendjel A, Tawk L, Malefijt RW, Boulay V, Yssel H, Pène J. IL-27 induces the production of IgG1 by human B cells. *Eur Cytokine Netw*. 2006;17(4):281–9.
- Mahut B, Delacourt C, Zerah-Lancner F, De Blic J, Harf A, Delclaux C. Increase in alveolar nitric oxide in the presence of symptoms in childhood asthma. *Chest*. 2004;125:1012–8.
- Moerloose KB, Pauwels RA, Joos GF. Short-Term Cigarette Smoke Exposure Enhances Allergic Airway Inflammation in Mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172(2):168–72.
- Raza Asim MB, Shahzad M, Yang X, Sun Q, Zhang F, Han Y, Lu S. Suppressive effects of black seed oil on ovalbumin induced acute lung remodelling in E3 rats. *Swiss Med Wkly*. 2010;140:w13128.
- Shahzad M, Yang X, Raza Asim MB, Sun Q, Han Y, Zhang F, Cao Y, Lu S. Black seed oil ameliorates allergic airway inflammation by inhibiting T-cell proliferation in rats. *Pulm Pharmacol Ther*. 2009;22(1):37–43.
- Suralkar AA, Kasture SB. Inhibitory effect of *Abrus precatorious* extract on bronchial hyperreactivity induced by ovalbumin in experimental animals. *Int J Pharm Sci*. 2013;5(1):403–9.
- Valença SS, Pimenta WA, Rueff-Barroso CR, Ferreira TS, Resende AC, Moura RS, Porto LC. Involvement of nitric oxide in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. *Nitric Oxide*. 2009;20:175–81.

Article publié

In

**Archives of the International Society of Antioxidants in Nutrition and
Health (ISANH)**

Vol. 5, Issue 1, 2017

DOI: 10.18143/AISANH_v5i1_7

Extended abstract of Paris Redox 2017

***Nigella sativa* Oil Effects On The Non-Enzymatic Defense Statute And The
Histopathological Changes Induced By Smokeless Tobacco In A Model Of
Allergic Asthma In Wistar Rats**

Taha KHALDI, Mahfoud MESSARAH, and Amel BOUMENDJEL.



***Nigella sativa* oil effects on the non-enzymatic defense statute and the histopathological changes induced by smokeless tobacco in a model of allergic asthma in wistar rats**

KHALDI Taha, MESSARAH Mahfoud, & BOUMENDJEL Amel

Laboratory of Biochemistry and Environmental Toxicology, Faculty of Sciences. University of Badji Mokhtar, Annaba, Algeria.

Corresponding author:

Taha Khaldi

Laboratory of Biochemistry and Environmental Toxicology, Faculty of Sciences

Badji Mokhtar University, Algeria

khaldi.taha@univ-annaba.org

Abstract

In our present study, we aimed to investigate the non-enzymatic defense system, as well as the histopathological changes, induced by ST at the dose of 40 mg/kg. Furthermore, the preventive and ameliorating effects of oral administration of *Nigella sativa* oil (NSO) at a dose of 4 ml/kg/day are evaluated. The rats were immunized by an intraperitoneal injection of 10 µg ovalbumin (Ova) adsorbed to 1 mg aluminum hydroxide. The administration of ST to Ova-sensitized rats caused significant increase of MDA levels in the lung and the protein carbonyl groups in erythrocytes and lung. In addition, we noticed a significant decrease of GSH in the lung and liver and NPSH in the lung. Moreover, Ova/ST co-exposed rats' lung and liver revealed an inflammatory cells infiltration, cellular hyperplasia with mucus hypersecretion compared with Ova-sensitized rats. In contrast, NSO administration showed significant improvement of levels of MDA, carbonyl groups, GSH and NPSH. Furthermore, we observed reduction of inflammatory cell infiltration, a lesser degree of cells hyperplasia, and many cells having normal morphology. The present study indicates that smokeless tobacco enhances airway inflammation and oxidative stress. Also, these results suggest that the treatment with oral NSO could be a promising treatment for allergic asthma.

Introduction

Allergic inflammation associated with airway hyperreactivity is the main feature of allergic asthma, that affects about 300 million people of all ages worldwide and is increasing by 50% per decade (Abdel-Aziz *et al.*, 2014). The inflammatory response is characterized by an increase in the numbers of eosinophils and mast cells, mucus hypersecretion and activation of T cells, development of various structural alterations in airway wall and smooth muscles of blood vessels in lung tissues (Raza *et al.*, 2010). As

inflammation is frequently associated with an increased generation of reactive oxygen species (ROS), and the biochemical environment in the asthmatic airways is favorable for free radical mediated reactions, it has been shown that inflammation caused by increased oxidative stress occurs in the airways of patients with asthma (Dworski, 2000). During those two last decades, the toxicological research has focused on the induction of oxidative stress (OS) after consumption of smokeless tobacco (ST) as a possible mechanism of toxicity in lung, liver and kidney. However, exactly how ST mediates lung damage is not well defined, but

presumably direct contact of the respiratory epithelium with ST toxic compounds, even when not burned or volatilized, can cause inflammatory changes (Schivo *et al.*, 2014).

Nigella sativa commonly known as black seed is an annual herbaceous plant belonging to the *Ranunculaceae* family. It has been widely studied for its pharmacological and therapeutic effects and shown to have extensive range of activities as antibacterial, antifungal, antidiabetic, antioxidant, anti-inflammatory and analgesic, anticancer and immunomodulatory properties (Aftab *et al.*, 2013). Many active compounds have been isolated and identified through phytochemical investigations such as phenolic acid, epicatechin, quercetin and flavones. Moreover, most of the therapeutic properties of this plant are related to the presence of thymoquinone (TQ) which is the main active chemical component of essential oil (Aftab *et al.*, 2013). Therefore, the present study aimed at investigating, on the one hand, the effects of ST in the aggravation of inflammation, and on the other hand, preventive and ameliorating effects of NSO on allergen-induced airway inflammation in a rat model of allergic asthma.

Materials and methods

Animals

Twenty-Four Wistar albino male rats (6–8 weeks old), obtained from Pasteur institute (Algiers, Algeria) were used. The animals were housed in polypropylene cages that were sanitized every 48 hours. The rats were fed a standard laboratory diet and clean tap water *ad libitum*. They were exposed to a natural photoperiod, at temperature of 25 ± 1 °C and a relative humidity of $40 \pm 5\%$ and allowed to acclimatize in this condition for 2 weeks prior to experimental use. All protocols in this study were used in accordance with the guidelines of the Committee on Use of Laboratory Animals and approved under the CNEPRU project by the Ethical Committee of DGRSDT at Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research.

Sensitization and Aerosol exposure

The rats were immunized by an intraperitoneal injection of 10 mg Ova adsorbed to 1 mg aluminum hydroxide in a volume of 1mL PBS on Day 0 and boosted on Day 7. At Days 14, 16, 18, 21, and 24, rats were placed in a plexiglass exposure chamber connected to the outlet of an ultrason aerosol generator (OMRON, NE-C29-E) for 30 min. Ova challenges were performed with a mean particle size of $3.2 \mu\text{m}$ and with an output of 3 mL/min. The last aerosol exposure was done 72h before the end of the

experiment (Moerloose *et al.*, 2005). The animals in the other groups were challenged with PBS.

ST and NSO administration

The lethal dose (LD50) concentration of the ST was calculated using LD50 for nicotine in rats (50 mg/kg b.w.) as standard. The used ST concentrations were calculated as 80% of the LD50, which is 40 mg/kg (b.w.). An amount of 1 mL from the stock solution was administered by oral gavage (force-feeding) once per day for 15 days (Adias *et al.*, 2014).

The NSO was administered orally by gavage for 31 days, at a dose of 4 mL/kg/day (Balaha *et al.*, 2012).

Oxidative stress parameters were measured using spectrophotometric methods.

Results and discussion

Ova- sensitization, ST exposure and Ova/ST co-exposure considerably increased the levels of MDA and protein carbonyl groups and decreased levels of GSH and NPSH in the lung, liver and erythrocytes of the sensitized group compared with the control group (Table 1). Moreover, the administration of ST to Ova-sensitized rats caused significant increase of MDA levels in the lung and the protein carbonyl groups in erythrocytes and lung. In addition, we noticed a significant decrease of GSH in the lung and liver and NPSH in the lung. However, NSO administration resulted in a significant improvement of all these parameters in the studied organs (Table 1).

Table 1. Antioxidant defense status in lung, liver and erythrocytes of treated and control rats

Parameters and Treatments	C	Ova	Ova/ST	Ova/ST/NSO
MDA (lung) (nmol/mg prot.)	25.09 ± 0.90	40.82 ± 1.22 ***	43.98 ± 1.22 ****#	34.54 ± 2.06 *** §§
Protein carbonyl groups (lung) (μmol/mg prot.)	47.58 ± 1.88	53.21 ± 1.79 *	62.56 ± 1.98 ****##	54.58 ± 1.96 ** §§
Protein carbonyl groups (Erythrocytes) (μmol/mg prot.)	20.78 ± 1.24	26.12 ± 1.14 **	30.64 ± 0.82 ****##	26.98 ± 1.12 *** §§
GSH (lung) (μmol/mg prot.)	0.72 ± 0.08	0.55 ± 0.03 *	0.32 ± 0.03 ****##	0.47 ± 0.07 * §
GSH (liver) (μmol/mg prot.)	1.53 ± 0.08	1.31 ± 0.03 *	1.04 ± 0.09 ****#	1.25 ± 0.07 *** §
NPSH (lung) (μmol/mg prot.)	132.24 ± 6.45	98.73 ± 4.32 ***	87.20 ± 4.15 ****#	115.74 ± 4.04 * §§§

Values are given as mean ± S.E.M for groups of six animals each. Significant difference: all treated groups compared to the control

one (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$), compared to the Ova sensitized one (# $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$, ### $p \leq 0.001$), compared to the Ova/ST treated one (§ $p \leq 0.05$, §§ $p \leq 0.01$, §§§ $p \leq 0.001$).

The histopathological examination of Ova-sensitized and Ova/ST-co-exposed rats' lung revealed an inflammatory cell infiltration (yellow arrow), goblet cells hyperplasia (red arrow) with mucus hypersecretion (circle) (Figure 1). However, NSO administration revealed a reduction of inflammatory cell infiltration (white arrow), a smaller degree of goblet cells hyperplasia (star) and normal cells morphology compared to Ova-sensitized and Ova/ST-co-exposed groups (Figure 1).

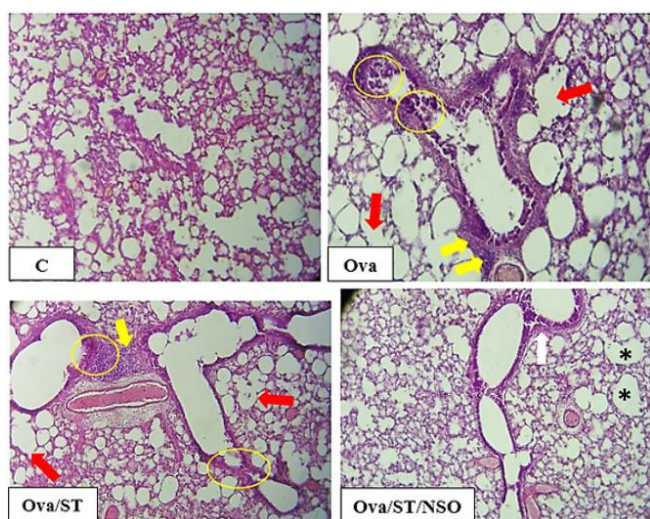


Figure 1. Photomicrographs of H&E stained sections of lung (×400).

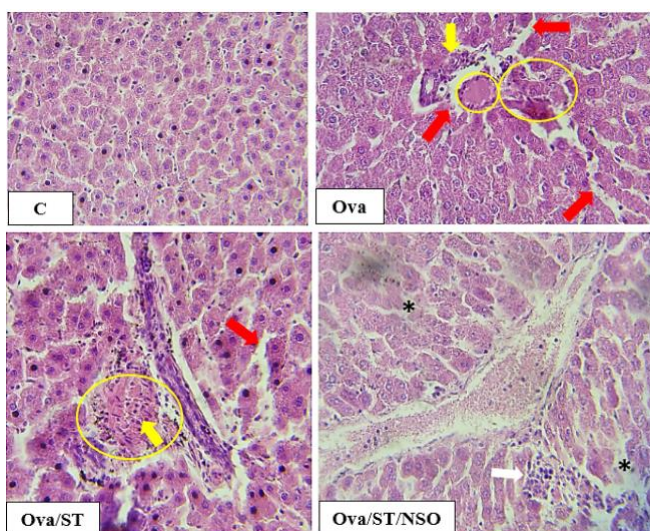


Figure 2. Photomicrographs of H&E stained sections of liver (×400).

Histopathological examination of Ova-sensitized and Ova/ST co-exposed rats' liver revealed an

inflammatory cell infiltration (yellow arrow) with degenerative changes in hepatocytes (circle), loss of typical hepatic cord organization and sinusoidal dilatation (red arrow) (Figure 2). In contrast, NSO administration revealed reduction inflammatory cell infiltration (white arrow), a lesser degree of sinusoidal dilatation (star) and normal cells morphology compared to Ova-sensitized and Ova/ST co-exposed groups (Figure 2).

Several studies have shown that subsequent administration of the allergen by inhalation induced inflammatory airway response by overproduction of free radicals, which in turn can initiate lipid peroxidation (Dworski, 2000). Furthermore, it has been shown that ST administration in rats induce oxidative stress resulting in the enhanced levels of MDA, as well as in human consumers of ST (Schivo *et al.*, 2014). The elevated level of MDA in treated rats could be linked to the increasing number of activated inflammatory cells in the pulmonary alveoli, which release large quantities of superoxide anion and hydrogen peroxide by various mechanisms, superoxide anion can interact with NO• to generate peroxynitrite (ONOOH) with high toxicity (Raza *et al.*, 2010). Although, NSO supplementation causes a significant decrease of MDA levels in Ova/ST co-exposed rats. These findings are consistent with several studies which have demonstrated that NSO prevents the formation of reactive oxygen species, causes reduction of lipid peroxidation and stimulates antioxidant defense system (Aftab *et al.*, 2013).

Protein carbonyl content is actually the most general indicator and by far the most commonly used marker of protein oxidation, and accumulation of protein carbonyls has been observed in several human diseases including inflammatory and oxidative lung injury. Protein carbonyls have a major advantage over lipid peroxidation products as oxidized proteins are generally more stable, form early and circulate in the blood for longer periods. The intracellular level of oxidized proteins reflects the balance between the rate of protein oxidation and the rate of oxidized protein degradation. This balance is a complex function of various circumstances that lead to the generation of ROS, on the one hand, and of multiple factors determining the concentrations and/or activities of proteases involved in degradation of oxidatively modified proteins (Sitte N., 2003). Although, NSO pretreatment in Ova/ST co-exposed rats showed a significant decrease in protein carbonyl content. This improvement could be explained by the fact that NSO possesses components such as polyphenols and

flavonoids which prevents the formation of ROS. Also, it has been demonstrated that NSO enhance the tissue capacity for detoxifying ROS (Ebru U. *et al.*, 2008).

Reduced glutathione is only one among many potential antioxidant defenses involved in the protection of various organs against oxidant-induced injury in inflammation (Dworski, 2000). during the metabolism of smoked tobacco many electrophiles are generated which are detoxified by the use of GSH. The decreased GSH levels increase the free radical burden due to ineffective removal of ROS from the tissues, which results in increased lipid peroxidation and protein oxidation. In addition, enhanced lipid peroxidation and protein oxidation with concomitant decrease in reduced GSH is indicative of oxidative stress that provides evidence of the relationship between lipid peroxidation, protein oxidation, tissue damage, and inflammation (Ebru U. *et al.*, 2008).

NPSH is an intracellular antioxidant and in some body compartments, such as the epithelial lining fluid of the lung, is present in high concentrations. NPSH in the lung lining plays a critical role in protecting the lung from oxidative stress by detoxifying exogenous and endogenous toxicants, and quenching ROS. In agreement with these data, various experimental research studies have demonstrated that oxidative stress, provoked by tobacco, causes redox instability and activation of body protective mechanisms, which result in a decrease in the concentration of some antioxidants (Schivo *et al.*, 2014).

All the previous results are in agreement with the histopathological study of lung and liver. In fact, contraction, thickening and abnormality of smooth muscle of airways are mainly responsible for the AHR in asthma. Intranasal challenge with Ova are known to cause goblet cell hyperplasia, mucus hypersecretion and inflammatory cells infiltration in lung tissues. Moreover, NSO administration revealed reduction inflammatory cell infiltration, a lesser degree of goblet cells hyperplasia and normal cells morphology in the present study. This may be linked to the anti-inflammatory and the antioxidant potential of NSO through restoration of local Th1/Th2 cytokine balance, reducing NO levels in lung and restoration of the balance between ROS and the antioxidant defense system (Aftab *et al.*, 2013).

Conclusion

Taken together, the findings of the present study indicate that short-term administration of ST in a rat model of allergic asthma, clearly enhances airway inflammation and oxidative stress. Also, these results suggest that the treatment with oral NSO could be a promising treatment for allergic asthma.

Acknowledgements

The authors would like to thank the DGSRTD (General Directorate for Scientific Research and Technological Development) for the support of this research work, via PNR projects.

References

- Abdel-Aziz M, Abass A, Zalata K, Abd Al-Galel T, Allam U, Karrouf G. 2014. Effect of dexamethasone and *Nigella sativa* on inducible nitric oxide synthase in the lungs of a murine model of allergic Asthma. Iran J Allergy Asthma Immunol. 13(5): 324-34.
- Adias TC, Ajugwo AO, Erhabor TA, Adejumo BI, Azikiwe CC. 2014. Effect of Sub-Lethal Doses of Smokeless Tobacco (Snuff) on Some Haemato Rheological Parameters Using Albino Wistar Rats. American Journal of Medical Sciences and Medicine 2(3): 54-57.
- Aftab A, Asif H, Mohd M, Shah AK, Abul KN, Nasir AS, Zoheir AD, Firoz A. 2013. A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. Asian Pac J Trop Biomed 3(5): 337-352.
- Balaha MF, Tanaka H, Yamashita H, Abdel Rahman MN, Inagaki N. 2012. Oral *Nigella sativa* oil ameliorates ovalbumin-induced bronchial asthma in mice. International Immunopharmacology 14(2): 224-231.
- Dworski R. 2000. Oxidant stress in asthma. Thorax. 55(2): 51-53.
- Ebru U, Burak U, Yusuf S, Reyhan B, Arif K, Faruk TH, Emin M, Aydin K, Atilla II, Semsettin S, Kemal E. 2008. Cardioprotective effects of *Nigella sativa* oil on cyclosporine A-induced cardiotoxicity in rats. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 103(6): 574-580.
- Moerloose KB, Pauwels RA, Joos GF. 2005. Short-Term Cigarette Smoke Exposure Enhances Allergic Airway Inflammation in Mice. Am J Respir Crit Care Med 172(2): 168-172.
- Raza Asim MB, Shahzad M, Yang X, Sun Q, Zhang F, Han Y, Lu S. 2010. Suppressive effects of black seed oil on ovalbumin induced acute lung remodelling in E3 rats. Swiss Med Wkly, 140: w13128.
- Schivo M, Avdalovic MV, Murin S. 2014. Non-Cigarette Tobacco and the Lung, Clinic Rev Allerg Immunol 46: 34.
- Sitte N. 2003. Oxidative Damage to Proteins, in: T. von Zglinicki (ed.), Aging at the Molecular Level. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 27-45.

Communication internationale orale

13ème Journées Scientifiques de la Société Tunisienne d'Immunologie (STI)

Hammamet, Tunisie. Du 10 au 13 Mars 2016.

EFFETS ANTIOXYDANT ET PROTECTEUR DE L'HUILE DE *Nigella sativa* SUR LE STRESS OXYDANT ET LA CYTOTOXICITE INDUITS PAR LE TABAC SANS FUMEE CHEZ LES RATS WISTAR

Taha Khaldi, M. Abdellaoui, L. Ailane, M. Messarah et A. Boumendjel.

Société Tunisienne d'Immunologie

STI

13^{èmes}

JOURNÉES SCIENTIFIQUES

10-12 Mars 2016
Hôtel Le Sultan, Hammamet

ATTESTATION

Taha Khaldi

En Collaboration avec :

M. Abdellaoui, L. Ailane, M. Messarah, A. Boumendjel.

A présenté une communication orale intitulée :

EFFETS ANTIOXYDANT ET PROTECTEUR DE L'HUILE DE *Nigella saliva* SUR LE STRESS
OXYDANT ET LA CYTOTOXICITE INDUITS PAR LE TABAC SANS FUMEE
CHEZ LES RATS WESTAR.

Pour le comité d'organisation
et le bureau de la STI

La présidente
Pr Youss LAKHOVA GORGI



www.immunologie.org.tn

Communication internationale orale

1^{er} Séminaire International de Pharmacie de Sétif (SIPS 2016)

Sétif, Algérie. 11-12 mai 2016.

**EFFETS ANTIOXYDANTS DE L'HUILE DE *Nigella sativa* DANS UN
MODELE D'ASTHME EXPERIMENTAL CHEZ LE RAT WISTAR**

Taha Khaldi, L. Ailane, M. Abdellaoui, M. Messarah et A. Boumendjel.



MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE FARHAT ABBAS-SETIF 1
FACULTE DE MEDCINE –DEPARTEMENT DE PHARMACIE

TEL : 036 62 05 42

Email : dep_pharm@yahoo.com



1^{er} Séminaire International de Pharmacie de Sétif (SIPS2016)/Sétif 11-12 mai 2016

ATTESTATION DE PARTICIPATION

Le président du comité d'organisation du 1^{er} Séminaire International de Pharmacie de Sétif (SIPS2016)
atteste que :

M^{me} M^r Khaldi Taha

a participé à cette manifestation avec une communication orale intitulée
**EFFETS ANTIOXYDANTS DE L'HUILE DE *Nigella sativa* DANS UN MODELE D'ASTHME EXPERIMENTAL
CHEZ LE RAT WISTAR**

Co-auteurs : L. AILANE, M. ABDELLAOUI, M. MESSARAH ET A. BOUMENDJEL

Président du Comité Scientifique
Pr. F.DJABI



الأستاذة: جابي فريدة
رئيس المجلس العلمي

Président du Comité d'Organisation
Dr. A.FLILISSA



Communication internationale orale

The International Conference on Toxicology and Health (ICTH 2016)

Guelma, Algérie. 28-29 novembre 2016.

**AGGRAVATION DU SYNDROME INFLAMMATOIRE ET DU STRESS
OXYDANT, PAR LE TABAC SANS FUMEE, DANS UN MODELE
D'ASTHME EXPERIMENTAL CHEZ LE RAT WISTAR**

Khalidi Taha, Messarah Mahfoud et Boumendjel Amel.



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et
des Sciences de la Terre et de l'Univers



Le Premier Colloque International en "Toxicologie et Santé"



Attestation de participation

La présidente du Premier colloque International en "Toxicologie et Santé"
organisée le 28 - 29 novembre 2016, atteste que Mlle/Mme/Mr:

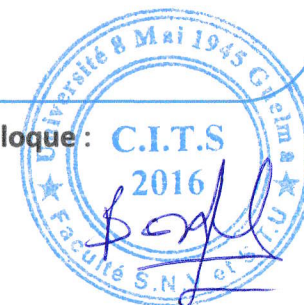
KHALDI TAHA

A présenté une communication orale intitulée:

**« Aggravation du syndrome inflammatoire et du stress oxydant, par le tabac sans fumée,
dans un modèle d'asthme expérimental chez le rat Wistar »**

Co-auteurs: MESSARAH MAHFOUD. BOUMENDJEL AMEL

Présidente du colloque : C.I.T.S



Communication internationale orale

28^{ème} Forum International des Sciences Biologiques et de Biotechnologie
(ATSB 2017)

Hammamet, Tunisie. Du 21 au 24 mars 2017.

**EFFETS NEFASTES DU TABAC SANS FUMEE SUR LE STATUT
ANTIOXYDANT ET LES PARAMETRES BIOCHIMIQUES CHEZ LES
RATS WISTAR**

Khaldi Taha, Messarah Mahfoud et Boumendjel Amel.

ASSOCIATION TUNISIENNE
DES SCIENCES BIOLOGIQUES

Membre de IUBMB / FASBMB / IUSB / FEBS



TUNISIAN ASSOCIATION
OF BIOLOGICAL SCIENCES

Member of : IUBMB / FASBMB / IUSB / FEBS

ATTESTATION DE PARTICIPATION

Le comité d'organisation du 28^{ème} forum international des sciences biologiques et de biotechnologie de l'ATSB, tenu à l'hôtel Laico, Tunisie, du 21 au 24 mars 2017, atteste que :

KHALDI TAHA

a participé activement aux journées et a présenté la communication C. Orale n°:180. intitulée :

EFFETS NEFASTES DU TABAC SANS FUMEE SUR LE STATUT ANTIOXYDANT ET LES
PARAMETRES BIOCHIMIQUES CHEZ LES RATS WISTAR

KHALDI TAHA, MESSARAH MAHFOUD ET BOUMENDJEL AMEL.

Pour le comité d'organisation



Le vice trésorier : Nabil SOUSSI

Communication internationale affichée

V^{ème} congrès international de Biotechnologie et Valorisation des BioRessources
(AT-BVBR)

Tabarka, Tunisie. Du 22 au 25 mars 2017.

**EFFETS DU TABAC SANS FUMEE SUR LES NIVEAUX DE L'OXYDE
NITRIQUE, L'IL-4 ET LE SYSTEM ANTIOXYDANT NON-
ENZYMATIQUE PULMONAIRE DANS UN MODELE D'ASTHME
EXPERIMENTAL CHEZ LES RATS WISTAR**

Khaldi Taha, Messarah Mahfoud et Boumendjel Amel.



V^{ème} Congrès International de
Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources

ATTESTATION DE PARTICIPATION

Le comité d'organisation du V^{ème} congrès international de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources (AT-BVBR), tenu à Tabarka - Tunisie, du 22 au 25 mars 2017, atteste que :

KHALDI TAHA

a participé activement aux journées et a présenté la communication par affiche intitulée :

Effets du tabac sans fumée sur les niveaux de l'oxyde nitrique, l'IL-4 et le système antioxydant non-enzymatique pulmonaire dans un modèle d'asthme expérimental chez les rats wistar

KHALDI TAHA, MESSARAH MAHFOUD ET BOUMENDJEL AMEL

Le Comité d'organisation

Association Tunisienne
de Biotechnologie et Valorisation
des Bio-Ressources

Communication internationale affichée

The 19th International Congress “Paris Redox 2017”

Université Pierre & Marie Curie, Paris, France. 26 et 27 juin 2017.

**Nigella sativa OIL EFFECTS ON THE NON-ENZYMATIC DEFENSE
STATUTE AND THE HISTOPATHOLOGICAL CHANGES INDUCED
BY SMOKELESS TOBACCO IN A MODEL OF ALLERGIC ASTHMA
IN WISTAR RATS**

Taha KHALDI, Mahfoud MESSARAH and Amel BOUMENDJEL.

International Society of Antioxidants

Certifies that
Taha Khaldi

Participated to the 19th International Congress “Paris Redox 2017”

held at University Pierre & Marie Curie, Paris, France

on June 26th and 27th 2017

- CME Credits 17 -

In Paris, June 28 2017



INTERNATIONAL SOCIETY
— OF —
ANTIOXIDANTS

Prof. Marvin EDEAS
Chairman of ISANH

Communication internationale orale

1st Springer Euro-Mediterranean Conference for Environmental Integration
(EMCEI-2017)

Sousse, Tunisie. Du 22 au 25 novembre 2017.

**PROTECTIVE EFFECTS OF *Nigella sativa* OIL ON IL-4 AND NITRIC
OXIDE LEVELS IN A MODEL OF EXPERIMENTAL ASTHMA IN
WISTAR RAT**

Taha Khaldi, Zineb Rouibah, Meriem Rouag, Mahfoud Messarah, Amel
Boumendjel.



Certificate of Contribution

Springer, part of Springer Nature, wishes to express its appreciation to

Taha Khaldi

for their **oral communication** at the 1st Euro-Mediterranean Conference for Environmental Integration (EMCEI), held in Sousse, Tunisia on 22–25 November 2017, and for the **paper they contributed** to the conference proceedings published by Springer.

(ID 473) -Protective effects of Nigella sativa oil on IL-4 and nitric oxide levels in a model of experimental asthma in wistar rat

Author(s): Taha Khaldi, Zineb Rouibah, Meriem Rouag, Mahfoud Messarah, Amel Boumendjel

Nabil Khelifi

EMCEI Publications Chair
Dr. Nabil Khélifi, Springer Senior Editor

Mohamed Ksibi

EMCEI General Chair
Prof. Dr. Mohamed Ksibi



**1ST EURO-MEDITERRANEAN CONFERENCE
FOR ENVIRONMENTAL INTEGRATION**
22-25 NOVEMBER 2017, SOUSSE, TUNISIA
www.emcel.net

Communication nationale affichée

Le Premier Séminaire National sur l'Eau ; l'Environnement et Santé (SNEES)

El-Tarf, Algérie. 06 et 07 mars 2018.

**EFFETS PROTECTEURS DE L'HUILE DE *Nigella sativa* SUR LE
STATUT ANTIOXYDANT NON ENZYMATIQUE ET LES
ALTERATIONS HISTOPATHOLOGIQUES HEPATIQUES INDUITS
PAR LE TABAC SANS FUMEE CHEZ LES RATS WISTAR**

Khalidi Taha, Messarah Mahfoud et Boumendjel Amel.



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Chadli Bendjedid EL Tarf

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences Agronomiques



Le Premier Séminaire National sur l'Eau ; l'Environnement et Santé
(S.N.E.E.S. El-Tarf 2018)

ATTESTATION DE PARTICIPATION

La présidente du comité d'organisation du 1^{er} Séminaire National sur l'Eau ; l'Environnement et Santé (SNEES, 2018)

organisé le 06 et 07 Mars 2018 Atteste que Mlle/Mme/Mr :

KHALDI Taha de l'Université Badji Mokhtar Annaba,

a participé au Séminaire avec une communication affichée intitulée :

« Effets du Tabac Sans Fumée sur les Paramètres Biochimiques et Histopathologiques Hépatiques chez les Rat Wistar »

Auteurs: Khaldi Taha, Messarah Mahfoud et Boumendjel Amel.



STAGES ET FORMATIONS

Cours Immunophysiologie des infections

Cours régional (Maghreb, Afrique)

Du 07 au 18 Mars 2015

À l'Institut Pasteur d'Algérie (Annexe de Sidi Fredj à l'Ouest d'Alger).

Organisateurs :

Sofiane Samir SALAH (IP Alger), Jean-Marc CAVAILLON (IP Paris).

Comité d'organisation (IP Alger) :

N. ATTAL, M.C. ABBADI, H. AMROUN, N. KECHOUT.



Institut Pasteur d'Algérie

Enseignement International du RIIP

COURS IMMUNOPHYSIOLOGIE DES INFECTIONS

Cours régional (Maghreb, Afrique)

Organisateurs :

Sofiane Samir SALAH (IP Alger), Jean-Marc CAVAILLON (IP Paris).

Comité d'organisation (IP Alger) :

N. ATTAL, M.C. ABBADI, H. AMROUN, N. KECHOUT.

Le Cours « Immunophysiologie des infections » aura lieu du **07 au 18 Mars 2015**
à l'Institut Pasteur d'Algérie (Annexe de Sidi Fredj à l'Ouest d'Alger).

Ce cours est organisé sous l'égide de :

- l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA),
- le Réseau International des Instituts Pasteurs (RIIP).

Ce cours réunira des enseignants-chercheurs, durant la **première semaine**, qui couvrira, en langue française, différents thèmes :

les cellules de l'immunité innée et leurs récepteurs, le système du complément, les cytokines et chémokines ainsi que les différentes réponses immunitaires anti-infectieuses.

L'enseignement théorique sera dispensé à **40 étudiants (doctorants et étudiants en fin de post-graduation)**. Une journée sera consacrée à des analyses d'articles par les étudiants.

Durant la **deuxième semaine**, des travaux pratiques (TP) seront organisés
(12 étudiants divisés en 2 groupes de 6) :

TP (Première partie) : Analyse des populations cellulaires (Responsable : **Dr N. Kechout**)
(IPA Dely Brahim)

Avec le soutien de l'Ambassade de France à Alger

Enseignement International du RIIP

« COURS D'IMMUNOPHYSIOLOGIE DES INFECTIONS »

INSTITUT PASTEUR D'ALGERIE

(Annexe de Sidi Fredj, Alger)

07 - 18 Mars 2015

PROGRAMME

Samedi 7 mars

8h45 – 9h15 Accueil des participants. Mots de bienvenue.

Pr K. Kezzal (Directeur Général de l'Institut Pasteur d'Algérie)

*J-M. Cavaillon, S.S. Salah, N. Attal, MC. Abbadi, H. Amroun, N. Kechout
(Organisateurs du Cours)*

9h15 – 10h45 Le renouveau de l'immunité innée depuis Elie Metchnikoff *J-M. Cavaillon*

11h00 – 12h30 Le système du complément : de la physiologie à la thérapeutique.
K. Djenouhat

14h00 – 15h30 "Toll-like receptors". *S. Chaib*

15h45 – 17h15 Les Lymphocytes $T\gamma\delta$. *A. Ben Yahia*

17h30 – 19h00 Auto-Présentation des étudiants (6 diapos maximum / étudiant)

Dimanche 8 mars

9h15 - 10h45 "Pathogen associated molecular patterns". *J-M. Cavaillon*

11h00 – 12h30 Natural killer cells and NKT cells. *D. Scott-Algara*

14h00 – 15h30 Cellules phagocytaires. *J-M. Cavaillon*

15h45 – 17h15 Innate lymphoid cells. *D. Scott-Algara*

17h30 – 19h00 Auto-Présentation des étudiants (suite)

Lundi 9 mars

9h15 – 10h45 Cytokines. *J-M. Cavaillon*

11h00 – 12h30 Mastocytes et immunité innée. *S. Mecheri*

14h00 – 15h30 Immunité et virus respiratoires. *D. Scott-Algara*

15h45 – 17h15 Liens entre immunité innée et adaptative. *S. Mecheri*

Secrétariat : Salima ZOUAOUI, Samy BISKER

Mardi 10 mars

- 9h15 – 10h45** Implication des molécules MICA et HLA-E dans l'immunité innée. Modèle des spondylarthropathies. *H. Amroun*
- 11h00 – 12h30** De l'infection à l'auto-immunisation : exemple du syndrome de Guillain-Barré. *N. Attal*
- 14h00 – 15h30** Susceptibilité mendélienne aux infections mycobactériennes. *R. Djidjik*
- 15h45 – 17h15** Les paramètres influençant la réponse immunitaire innée *J-M. Cavaillon*

Mercredi 11 mars

- 9h15 - 10h45** L'exacerbation de la réponse innée : l'exemple du sepsis. *J-M. Cavaillon*
- 11h00 – 12h30** Immunité innée et infections HIV et Hépatites. *D. Scott-Algara*
- 14h00 – 15h30** Immunité anti-parasitaire. *S. Mécheri*
- 15h45 – 17h15** Protéines innées intracellulaires et infections virales: Rôle d'APOBEC et TRIM-alpha dans la résistance naturelle. *D. Scott-Algara*
- 17h30 - 18h30** Stratégies développées par les pathogènes contre le système immunitaire *J-M. Cavaillon*

Jeudi 12 mars

- 10h00 - 18h00** **Analyse d'articles :**
Immunité innée et infections virales, parasitaires, bactériennes et fongiques

Travaux pratiques : 14 – 18 mars

1 TP sera réalisé. Les étudiants, au nombre de 12 seront divisés en deux groupes de 06. Le TP comprend :

TP:

Première partie : Analyse des populations cellulaires (N. Kechout, F. Doudou, S. Otsmane) (IPA Dely Brahim)

Protocole expérimental : Isolement des PBMC (sujets atteints de maladie inflammatoire chronique vs. sujets contrôles), stimulation *in vitro* par du LPS. Analyse phénotypique des cellules par cytométrie en flux : Sous populations T, B, NK, Monocytes.....

Deuxième partie : Initiation aux techniques de biologie moléculaire et dosage de cytokines (H. Amroun, F. Meçabih) (IPA Dely Brahim).

Induction *in vitro* et récupération du surnageant pour le dosage de cytokines (technique ELISA et par LuminexTM).

Parallèlement, étude de polymorphismes fonctionnels du gène TNF α par la technique de PCR en temps réel (TaqManTM) chez les sujets d'étude.

Corrélation entre les génotypes TNF α obtenus et le profil de sécrétion du TNF α .



COURS D'IMMUNOPHYSIOLOGIE DES INFECTIONS

(Institut Pasteur d'Algérie, Alger, 07-18 Mars 2015)

Le comité d'organisation atteste que **Mr KHALDI Taha** a suivi la Formation THEORIQUE
du Cours « **d'Immunophysiologie des Infections** » organisé au niveau de l'Institut Pasteur d'Algérie
(Annexe de Sidi Fredj) du 07 au 18 Mars 2015.

Alger, le 12 Mars 2015.

Pr J-M CAVAILLON
Coorganisateur

Pr S.S. SALAH
Coorganisateur

Institut Pasteur d'Algérie
Département d'Immunologie
Pr. SALAH S.S.
Maître de Conférences "AA"
Chef de laboratoire d'Auto-immunité
Chef de laboratoire d'Immunologie

Pr N. ATTAL
Coorganisateur

Institut Pasteur d'Algérie
Chef de Département
d'Immunologie
Pr. N. ATTAL - TALEB

Pr K. KEZZAL
Directeur Général

Institut Pasteur d'Algérie
Directeur Général
Pr. KEZZAL Kamal

FORMATION THEORIQUE ET PRATIQUE SUR LA CYTOMETRIE EN FLUX

Du 25 au 28 juin 2017

A l'Hôpital Universitaire Pitié-Salpêtrière

Paris, France.

Formation théorique : Fonctionnement des appareils et maîtrise des logiciels associés.

Formation pratique : Analyse des échantillons des malades par la cytométrie en flux et interprétations des résultats.