



الشعبية الديمقراطية الجزائرية الجمهورية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE



العلمي البحث و العالي التعليم وزارة
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine قسنطينة منتوري الإخوة جامعة
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie الحياة و الطبيعة علوم كلية

الجزئية و الخلية البيولوجيا و الحيوية الكيمياء قسم
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : **Sciences de la Nature et de la Vie**

Filière : **Sciences Biologiques**

Spécialité : **Biochimie moléculaire et santé**

Intitulé :

Evaluation de l'activité antioxydante des huiles des
graines de *Nigella sativa*

Présenté et soutenu par : LEBCIR Amina

Le : 29/06/2016

BOUREZGUE Sarra

Jury d'évaluation :

Président : Pr. NECIB Y.

M.C.B. Université Constantine 1.

Rapporteur : Melle. MOSBAH A.

M.A.B. Université Constantine 1.

Examineur : Melle. HALMI S.

M.A.B. Université Constantine 1.

Année universitaire
2015 - 2016

Remerciements

Avant tout, nous remercions Dieu tout puissant de nous avoir donné la force, le courage, la persistance et nous a permis d'exploiter les moyens disponibles à fin d'accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre promotrice Dr. MOSBAH ASMA Enseignante au Département des Sciences Biologiques à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université CONSTANTINE 1, qui nous a encadrées et dirigées ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'il nous accordé nous ont permis de réaliser ce travail.

Nous offrons nos plus sincères remerciements à l'examinatrice Dr. HALMI Sihem pour ses précisions remarques pour corriger ce travail et pour l'assistance par des conseils objectifs et éclairés.

Nous adressons nos plus sincères remerciements à Pr. NECIB Youcef pour ses conseils. Nous remercions aussi tous les membres de la bibliothèque de Département des Sciences Biologiques à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université CONSTANTINE 1 et SETIF

Un grand merci à tous les enseignants du département des sciences de la nature et la vie de l'université CONSTANTINE.

Nos vifs et sincères remerciements s'adressent tout particulièrement à notre Université de Constantine 1 qui nous a procuré une bonne formation

AMINA-SARA

Dédicace

Je dédie ce travail à Ma famille

LEBCIREt aux personnes les plus chères au monde mes chers

parents :

A mon père Ahmmed :

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A ma très chère mère FATIMA ;

Tu es l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Et Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver t'accorder santé, longue vie et bonheur.

Je dédie spécial Mon Amie Ahlem qui n'a jamais cessé de croire source d'amour et de tendresse sans toi ce succès n'aurait jamais un le jour...

A mes soeurs: afaf, ibtissam, assia, chafika.dalila

A mes frères: nabil, riadh, halim.samir.

A mes nièce: nouha, maram ,nada,nermine,ritaje,smino

A mes nouveaux : oussama, abdraouf ,walid.nazim, yahia

*A ma 2ème famille de la cité: meryem, yamina ,ahlem,khawla,choubeila,souad ,
Nipou,rima,nassima. khadidja*

AMes amies de l'étude :anissa ,imane,selma,nabila.ryme

A mes meilleurs amies les plus chers :hiba , narjasse.

A mon binôme sara qui a partagée avec moi les moments difficiles de ce travail et son famille.

A La promotion de biochimie 0master 2.

Sans oublier mes amies et a Tous ceux qui ont connus.

Amina

Dédicace

J'ai l'honneur de dédie ce modeste travail

*A mes chers parents **LAYACHI** et **KAHARFIA** qui m'avez dirigé et suivi pondent toute mes années d'étude et surtout ma mère pour leurs sacrifices de tous les instants, sa patience sans limite et l'éducation qu'elle m'a donnée, je lui dit merci mille fois.*

*Je dédie spéciale mon marie **RIADH** qui n'a jamais cessé de croire source d'ameur et de tendresse sans toi ce succes n'aurait jamais un le jour...*

*A mes frères **Mouhamed**, **Zitouni**, **Housseem**
et à toute ma famille Bourezgue.*

*A mes très chères amies **Hanane**, **Ahlem**, **Meryem**, **Yamina**, **Hiba**, **Souad**, **Soulef**, **Amina**, **Rima**,
Marwwa*

A tous mes collèges et a tous ceux que J'aime.

SARRA

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
ALAT : Alanine amino-transférase
ARNm : Acide Ribonucléique messenger
ASAT : Aspartate transaminase
CAT: Catalases
CC : Chromatographie sur colonne
DL50 : Dose létale 50
DPPH: 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl
EAG : Equivalent d'acide gallique
EC50: Concentration effective à 50%
EOR : Espèces réactives de l'oxygène.
EQ: Equivalents de quercétine
ERN : Espèces réactives de l'azote
Fe²⁺ : Ferrique
Fe³⁺: Ferreux
FN : Fraction neutre
GPx : Glutathion peroxydase
GSH : Glutathion réduit
GSSG : Glutathion oxydé
HT : Huile totale
IC50: Concentration inhibitrice de 50%
LDL: Lipoprotéines à basse densité (low density lipoproteins)
NLF : Neutral lipid fraction
NO₂ : Dioxyde d'azote
NO₃⁻ : Le peroxydite
NOS : Nitrique oxyde synthase
P₄₅₀ : Cytochrome p₄₅₀
RL : Radical libre
ROS : Reactive oxygen species (dérivés réactifs de l'oxygène).
SOD : Super oxyde dismutases
TQ : Thymoquinone
TO : Total oil

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction.....	1
-------------------	---

Partie bibliographique

Chapitre I : *Nigella sativa*

1. Généralités.....	4
2. Aspect botanique de <i>Nigella sativa</i>	5
3. Composition biochimique.....	5
3.1. Protéines.....	6
3.2. Flavonoïdes.....	6
3.3. Alcaloïdes.....	7
3.4. Lipides.....	8
3.5. Polyphénols.....	8
4. Activités biologiques et propriétés pharmacologiques.....	9
4.1. Activité antioxydante.....	9
5. Huiles de <i>Nigella sativa</i>	11
5.1. Huiles fixes.....	11
5.2. L'huile essentielle.....	12
6. Toxicité de <i>Nigella sativa</i>	13

Chapitre 2 : Stess oxydatif

1. Généralité.....	15
2. Stress oxydant cellulaire.....	15
3. Radicaux libres de la biologie.....	16

4. Sources de production des radicaux libres.....	17
4.1. Sources exogènes des ROS.....	17
4.2. Sources endogènes.....	18
a- Chaîne mitochondriale de transport d'électrons.....	18
b- Macrophages.....	18
a- NADPH oxydase.....	18
b- Xanthine oxydase.....	19
5. Différentes formes des radicaux libres.....	19
5.1. Anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$).....	19
5.2. Peroxyde d'hydrogène(H_2O_2).....	19
5.3. Radical hydroxyle (OH^{\bullet}).....	20
5.4. Monoxyde d'azote (NO^{\bullet}).....	20
5.5. Oxygène singulier(1O_2).....	21
5.6. Anion peroxydrite($OONO^-$).....	21
6. Cibles des radicaux libres.....	22
6.1. Altérations de l'ADN.....	22
6.2. Altérations des lipides.....	22
6.3. Altérations des protéines.....	23
6.4. Altérations des glucides.....	23
7. Rôle physiologique des espèces réactives oxydantes.....	23
8. Systèmes de défenses antioxydants.....	24
8.1. Systèmes antioxydants enzymatiques.....	24
8.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques.....	25
a- Acide ascorbique: vitamine C.....	26
b- α-tocophérol: vitamine E.....	26
c- Caroténoïdes.....	27

9. Modes d'action des antioxydants.....	27
---	----

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

1. Matériel.....	30
1.1. Matériel végétale.....	30
2. Méthodes.....	30
2.1. Extraction de l'huile totale.....	30
2.2. Fractionnement de l'huile totale par chromatographie sur colonne du gel de silice. .	30
2.3. Dosage des composés phénoliques.....	31
2.4. Dosage des flavonoïdes.....	32
2.5. Piégeage du radical DPPH.....	32
2.5. Pouvoir réducteur.....	32
2.6. Pouvoir réducteur.....	32
2.7. Analyse statistique.....	33

Résultats et discussion

1. Rendement de l'extraction.....	35
2. Dosage de polyphénol et flavonoïde.....	35
3. Activité antioxydante <i>in vitro</i>	36
3.1. Test de DPPH.....	36
3.2. Pouvoir réducteur.....	37
Conclusion.....	39

Références Bibliographiques.....40

Liste des figures

Figure 1: Les graines de différentes espèces de nigelles.....	10
Figure 2: Aspect morphologique de la plante <i>Nigella sativa</i>	11
Figure 3: Structure chimique des principaux alcaloïdes de <i>Nigella sativa</i>	13
Figure 4: Structure des polyphénols de <i>Nigella sativa</i>	14
Figure 5: Balance radicaux libres /antioxydant.....	22
Figure 6: Origine des radicaux libres.....	24
Figure 7: Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire	29
Figure 8: Pyramide des systèmes de défenses antioxydants.....	31
Figure 9: l'acide L-ascorbique.....	33
Figure 10: Structure chimique d' α -tocophérol	34
Figure 11: structure générale des caroténoïdes.....	34
Figure 12. Schéma d'extraction de l'huile totale et de l'extrait méthanolique.....	38
Figure 13: Effet piègeur du radical DPPH par les extraits HT et FN.....	44
Figure 14 : Pouvoir réducteur des extraits HT et FN d et du standard α -catechine. 45	

Liste des tableaux

Tableau 1. Composition générale des graines de <i>Nigella sativa</i>	12
Tableau 2: Les principaux flavonoïdes de <i>Nigella sativa</i>	13
Tableau 3 : Taux des lipides de l'huile fixe de <i>Nigella sativa</i> extraite	17
Tableau 4: Les composants des huiles essentielles de <i>Nigella sativa</i>	18
Tableau 5 : Les principales espèces oxygénées réactives.....	22
Tableau 6: Principaux modes d'action de quelques antioxydants	34
Tableau 7 : Rendement d'extraction de HT et FN.....	41
Tableau 8: Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes de HT et la FN.....	41
Tableau 9 : La concentration inhibitrice des extraits HT et FN et α -Tocopherol.....	43
Tableau 10: Concentrations effectrices des extraits HT et FN et l' α -Catechine.....	44

Introduction

Le stress oxydatif constitue un problème mondial de la santé publique, il est l'origine de la plupart des maladies humaines. De nombreux arguments montrent que les radicaux libres sont responsables d'un stress oxydant résultant d'une perturbation du rapport oxydants/antioxydants. Ce déséquilibre entre les systèmes de défense et de production des radicaux libres entraîne des lésions biochimiques au niveau des cellules de l'organisme du fait de leurs conséquences sur le plan moléculaire, telles que les altérations au niveau des protéines, l'apparition de cassures au niveau de l'ADN, ou des atteintes de l'intégrité de la membrane cellulaire par l'induction de la peroxydation lipidique (Lenzi, 2011).

Au cours des dernières années, les plantes médicinales ont été montrées une efficacité considérable dans le traitement de nombreuses maladies humaines, en raison de leurs faibles effets secondaires. Parmi les plantes médicinales les plus utilisées à travers le monde on trouve *Nigella sativa* et particulièrement ses graines. Les extraits de graines de cette plante sont largement utilisés dans la médecine traditionnelle. Ces extraits présentent une activité considérable contre une multitude de maux, notamment comme antidiabétique, antihypertenseur, anti inflammatoire et anti oxydantes (Gilani et al., 2004). De nombreuses recherches sur la phytochimie et la bio-activité de *Nigella sativa* ont confirmé ces propriétés pharmacologiques qui sont dues en majorité aux huiles fixe et essentielle extraites a partir des graines de cette plante.

Dans ce contexte s'inscrit ce présent travail dont l'objectif essentiel est d'évaluer l'activité antioxydante de l'huile totale et de la fraction neutre des graines de *Nigella sativa* contre les radicaux libres en utilisant des systèmes chimiques *in vitro*.

Ce travail a été organisé en chapitres essentiels :

- Le premier chapitre, consacré à l'étude bibliographique de cette plante,
- Dans le deuxième chapitre, nous aborderons le stress oxydant, ainsi qu'une mise au point sur les radicaux libres et les antioxydants dans la nature.
- Dans le troisième chapitre nous exposerons le matériel et les méthodes relatives à nos travaux,
- Enfin, le dernier chapitre, sera réservé aux résultats obtenus, aux discussions et interprétation. Suivis par une conclusion générale.

Chapitre I

Nigella sativa

1. Généralités

Nigella sativa L est une herbe annuelle originaire de la région méditerranéenne, notamment la Syrie, la Turquie et les pays d’Afrique du nord, elle est maintenant cultivée dans plusieurs régions du monde notamment en Moyen Orient, et Asie Occidentale, en Inde, en Iraq (Hawssawi et *al.*, 2001). Elle est cultivée dans les régions tropicales et semi arides (Rajkapoor et *al.*, 2002). Les pays producteurs de la nigelle sont principalement la Syrie, l’Égypte, l’Arabie Saoudite, la Turquie, l’Iran, le Pakistan et l’Inde (Kokdil et *al.*, 2005).

C’est une plante herbacée de la famille des Renonculacées (Guignard, 2001), appartenant au genre *Nigella*. En Algérie connue sous le nom vernaculaire Sinoudj (Ghedira et Le Jeune, 2010) (Figure 1).

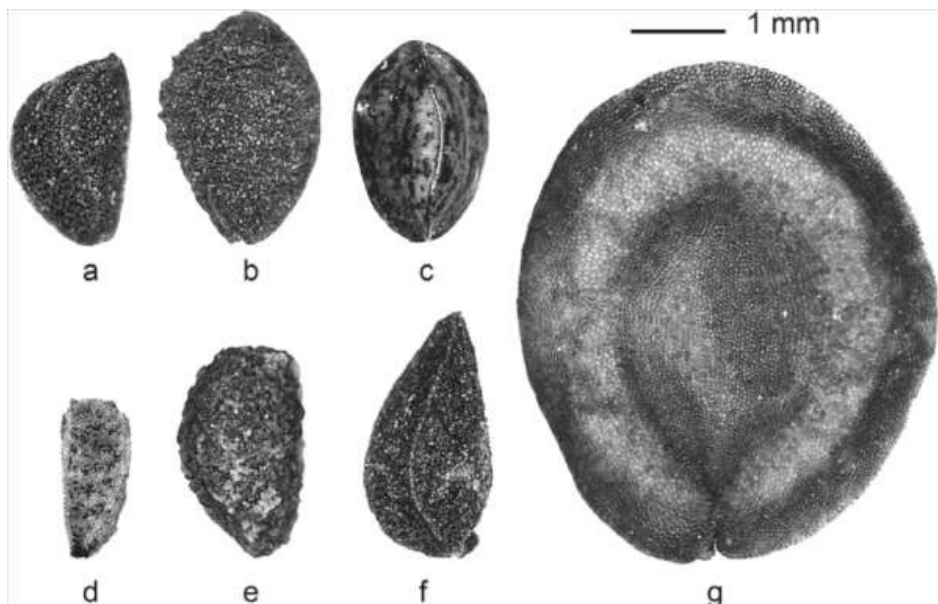


Figure 1: Les graines de différentes espèces de nigelles (D’après Heiss et *al.*, 2011)

Par leur nature aromatique, les graines de *Nigella sativa* sont très utilisées comme épices de cuisson, dans les préparations des sirops, en pâtisserie et boulangerie et récemment en industrie pharmaceutique (Atta, 2003). En fait, cette plante a coupé une place spéciale pour son grand spectre d’application médicinale dans la civilisation islamique.

2. Aspect botanique de *Nigella sativa*

Nigella sativa est une plante herbacée, annuelle, à tige dressée, côtelée, anguleuse et rameuse d’une soixantaine de centimètres de hauteur, portant des feuilles bi- ou

tripennatiséquées, oblongues ovales, composées de segments lancéolés oblongs, au pétiole pubescent. Les fleurs sont solitaires, axillaires et terminales, bisexuées, radiales, très riches en nectar. Chaque fleur possède huit cornets nectarifères, une lèvre inférieure bilobée dont les lobes se terminent en une protubérance émoussée, et une lèvre supérieure poinçonnée.

La plante est hermaphrodite à reproduction autonome. Le fruit correspondant à l'ensemble des follicules soudés forme la capsule contenant plusieurs graines triangulaires blanchâtres qui, lorsque la capsule s'ouvre à maturité, exposées à l'air deviennent noires. Les graines sont ovoïdes et mesurent 2 à 3,5 mm ; elles présentent 3 ou 4 angles avec une face supérieure finement granuleuse et réticulée (Bonnier, 1990 ; Ghedira, 2006).

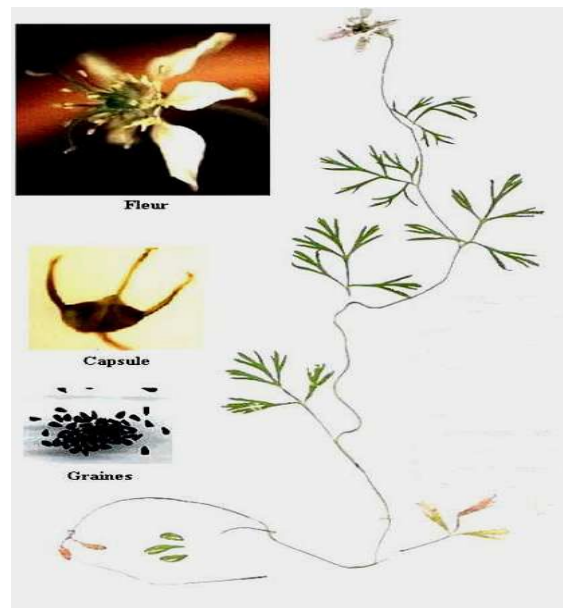


Figure 2: Aspect morphologique de la plante *Nigella sativa* (D'après Guignard, 2001)

3. Composition biochimique

Les études phytochimiques effectuées pour déterminer la composition chimique et les principes actifs des graines de *Nigella sativa*, ont révélées qu'elles sont riches en plusieurs constituants (métabolites secondaires et primaires), dont la teneur varie selon les conditions géographiques et climatiques, ainsi que les méthodes d'extraction et de détection.

Les recherches sur la composition des graines de *Nigella sativa* ont débuté en 1880 avec Greenish, (Greenish, 1880). Par la suite, d'autres études ont montré la présence d'une diversité de substances naturelles regroupant des lipides, des dérivés terpéniques, des flavonoïdes, des alcaloïdes et des saponines, cette plante constitue également une importante source de protéines et de sels minéraux : phosphore, calcium, potassium,

magnésium et sodium. Elles contiennent aussi des monosaccharides tels que le glucose, rahmnose, xylose, arabinose et des polysaccharides non amidonnés sous forme de fibres alimentaires (Zahoor et al., 2004). La composition chimique de *Nigella sativa* est récapitulée dans le tableau ci-dessous (Tableau 1)

Tableau 1. Composition générale des graines de *Nigella sativa* (AL-Beitawi et al., 2009).

Composition	Glucides	Protéines	Huiles volatiles	Lipides	Cendres	Eau
Teneur en%	32,2	22,75	0.45	36,25	4,86	4,4

3.1. Protéines

La graine de *Nigella sativa* est très riche en protéines (20 à 26%). L'analyse des acides aminés de l'hydrolysate de ces protéines révèle la présence de 17 acides aminés, y compris 8 acides aminés essentiels. Quantitativement, les acides aminés constitutifs majoritaires sont non essentiels (69,81%), avec dominance d'acide glutamique (22,4%), d'acide aspartique (10,05%) et d'arginine (9,18%) (Al- Jassir, 1992 ; Salem, 2005 ; El-Obeid et al., 2006).

Le fractionnement des protéines de *Nigella sativa* par électrophorèse en polyacrylamide dans les conditions dénaturantes (PAGE-SDS) montre des protéines avec des poids moléculaires allant de 10 à 94 KDa (Salem, 2005). La protéine la plus étudiée jusqu'à maintenant est la lipase qui catalyse les réactions de trans estérification (Tuter et al., 2003).

3.2. Flavonoïdes

Les Renonculacées sont un groupe riche en flavonols et en flavones. Les plus abondants sont la catéchine et l'apigénine qui représentent respectivement 7,26% et 6,83%. On y trouve aussi la flavone, l'amentoflavone, la quercitrine et l'épicatéchine avec des proportions respectives de 3,4%, 2,91%, 2,56% et 1,28% (Bourgou et al., 2008)(tableau 2).

Tableau 2: Les principaux flavonoïdes de *Nigella sativa* (Bourgou et al., 2008)

Flavonoïdes	La teneur (mg/100g)
Quercétine	2,56 1,28

Epicatéchine	7,26
Catéchine	6,83
Apigénine	2,91
Amentoflavone	3,4
Flavone	

3.3. Alcaloïdes

Les graines de *Nigella sativa* contiennent également des alcaloïdes ; nigellicine (Atta-Ur-Rahman et al., 1985a) et 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), et les alcaloïdes diterpènes Dollablane-types nigellamines A₁, A₂, B₁, B₂ (Morikawa et al., 2004a), A₃, A₄, A₅, et C (Morikawa et al., 2004b) (Figure 3).

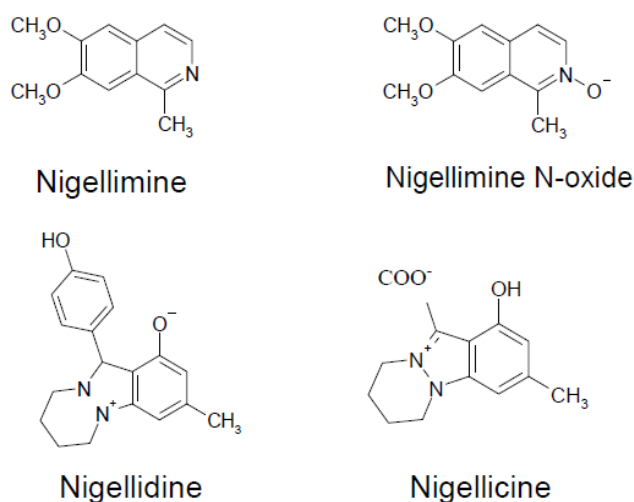


Figure 3: Structure chimique des principaux alcaloïdes de *Nigella sativa* (D'après Atta -UR-Rahman, 1995).

3.4. Lipides

Les graines de *Nigella sativa* contiennent environ 0,4-2,5% d'huile essentielle, plus de 30% d'huiles fixes (Dominiczak et al., 1991; Hashim et al., 1982) et 38% de lipides totaux dont les phospholipides (Martin, 2001). Les acides oléique et linoléique sont les deux acides gras majeurs de l'huile de *Nigella sativa*, ils constituent 75% des acides gras totaux (Abdel – Aal, 1993).

3.5. Polyphénols

Les polyphénols de *Nigella sativa* (Figure 4) sont les plus actifs pharmacologiquement. A partir de l'huile, 04 constituants ont été isolés et identifiés structuralement par HPLC et RMN ; la thymoquinone, le dithymoquinone, le thymohydroquinone et le thymol (Gilani *et al.*, 2004 ; Ghedira, 2006).

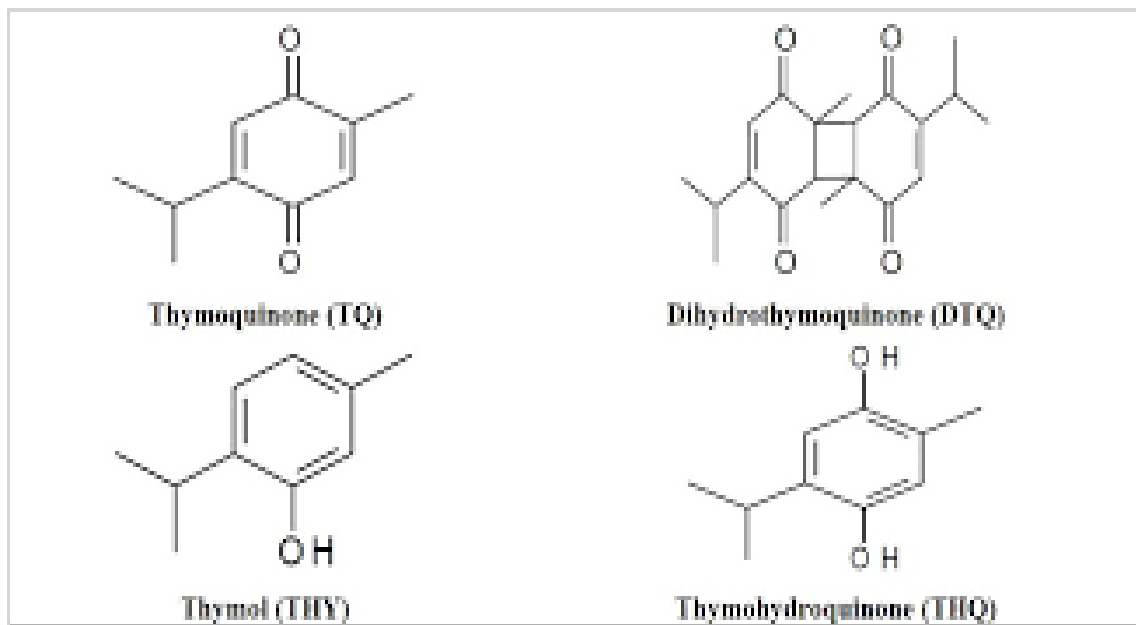


Figure 4: Structure des polyphénols de *Nigella sativa* (D'après Salem, 2005).

4. Activités biologiques et propriétés pharmacologiques

Durant les vingt dernières années, plusieurs travaux ont porté sur l'étude de *Nigella sativa*, notamment sur les effets dus aux extraits de la graine de cette espèce ainsi qu'aux principaux constituants (notamment la thymoquinone) sur divers systèmes biologiques ou non biologiques (*in vivo* et *in vitro*) (Ghedira et Le Jeune., 2010), parmi les propriétés thérapeutiques de la plante en médecine moderne, on cite brièvement les plus importants.

4.1. Activité antioxydante

4.1.1. Activité antioxydante *in vitro*

L'huile fixe de *Nigella sativa* ainsi que la thymoquinone (composé majoritaire dans l'huile essentielle) inhibe la lipoperoxydation lipidique non enzymatique dans les liposomes (Houghton et *al.*, 1995). La thymoquinone, le carvacrol, le trans-anéthole et les 4 terpinéols (composés majoritaires de l'huile essentielle) exercent un important effet piègeur de radicaux libres (Burits et Bucar, 2000). Ces mêmes constituants sont responsables de propriétés antioxydantes variables sans présenter d'effet pro-oxydant (Swamy et Huat, 2003 ; Ilhan et *al.*, 2005) . L'huile fixe et ses fractions, lipides neutres, glycolipides et phospholipide, montrent une activité antioxydante *vis-à-vis* des deux radicaux libres stables (DPPH et le radical glavinoxyl). Cette activité antioxydante est corrélée avec la teneur en acides gras polyinsaturés, en composés insaponifiables et en phospholipides, de même que la valeur peroxyde initiale de l'huile (Ramadan et Morsel, 2003).

4.1.2. Activité anti-inflammatoire

La propriété anti-inflammatoire des graines de *Nigella sativa* est bien reconnue depuis des siècles, elle est recommandée pour le traitement des maladies inflammatoires.

Plusieurs travaux rapportent que la thymoquinone (TQ) est le principe actif essentiel responsable de l'effet anti-inflammatoire des extraits de *Nigella sativa*; la TQ s'est avérée être un puissant inhibiteur de la thromboxane B2 et des leucotriènes B4 par l'inhibition respective des cyclooxygénase et lipooxygénase (E1-Dakhakhny et *al.*, 2002 ; Hajhashemi et *al.*, 2004). C'est un inhibiteur efficace de la production des leucotriènes par l'inhibition de la Leucotriène-C4-synthase (LT4 synthase) (Mansour et Tornhamre, 2004). Plusieurs auteurs ont étudié l'éventuelle activité anti inflammatoire d'extraits ou de composés purs issus de *Nigella sativa*, En 2002, El-Mahmoudy et ses collaborateurs démontrent que la TQ inhibe la production de NO par la réduction de l'expression de l'ARNm du NOS. Cependant, l'activité de l'huile fixe sur les cyclooxygénases et lipooxygénases est plus importante que la TQ elle-même; l'activité anti-inflammatoire n'est pas donc entièrement due à la présence de la TQ. Des acides gras insaturés de type C20: 2 semblent être impliqués.

Donc les composants des huiles de *Nigella sativa* agissent avec trois types de mécanismes anti-inflammatoires ; l'inhibition de la production d'eicosanoïdes, l'inhibition

de la synthèse de prostaglandines et la diminution de la production de monoxyde d'azote (Houghton et al., 1995 ; Gilani et al., 2004).

4.1.3. Activité antibactériennes

Les différents extraits des graines de *Nigella sativa* présentent un large spectre d'inhibition *vis-à-vis* de nombreuses souches bactériennes. telles que; *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* (Hanafy et Hatem, 1999 ; Morsi, 2000 ; Khan et al., 2003).

L'huile de la Nigelle possède un pouvoir inhibiteur supérieur à celui de la gentamicine sur une vingtaine de souches de *Listeria monocytogenes* (Nair et al., 2005). Différents extraits de la graine ont été testés *vis-à-vis* de germes antibiorésistant (16 Gram négatifs et 6 Gram positifs), les alcaloïdes totaux et le décocté sont révélés être les extraits les plus actifs, notamment à l'égard des bactéries à gramme positif (Morsi, 2000). De même, L'extrait méthanolique et hexanique possèdent aussi un effet inhibiteur très considérable sur *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* (Mashhadian et Rakhshandeh, 2005). L'huile fixe présente également une excellente activité antifongique, notamment sur *Aspergillus niger* (Aggarwal et al., 1979). Par ailleurs, l'extrait à l'éther et la thymoquinone exercent une activité inhibitrice sur huit espèces de dermatophytes (Aljabre et al., 2005). En plus des activités antibactériennes et antifongiques, l'huile de *Nigella sativa* possède aussi un effet antiviral *vis-à-vis* le virus de l'herpès : *cytomégalo virus murin* (MCMV) (Salem, 2005).

5. Huiles de *Nigella sativa*

5.1. Huiles fixes

Les huiles fixes de *Nigella sativa* extraits par pression à froid sont majoritairement composées de triglycérides (57,50%) et contiennent une faible fraction de lipides polaires (3,70%), des monoacyl-glycérol et diacyl-glycérol avec des proportions respectives de 4,80% et 5,10%, on y trouve aussi des stérols libres et estérifiés (Tableau 3). L'analyse des stérols libres montre que le β -sitostérol représente le composant majeur suivi par le D5-avenastérol et le D7-avenastérol, alors que le stigmastérol, le campestérol et le lanostérol ont été trouvés à des taux très faibles (Ramdan et al., 2002a).

Tableau 3 : Taux des lipides de l'huile fixe de *Nigella sativa* extraite par différentes Méthodes
(D'après Atta, 2003).

Composants	Extraction par pression à froid (%)	Extraction à chaud par solvant apolaire (%)
Lipides polaires	03,70	04,80
Monoacyl-glycerol	04,80	05,70
Diacyl-glycerol	05,10	04,10
Stérois libres	03	05
Inconnu	05,40	04,50
Acides gras libres	14,20	08,30
Triacyl-glycerol	57,50	63,20
Stérois esters	02,50	04,40

L'analyse quantitative et qualitative des huiles fixes de *Nigella sativa* cultivée dans différentes régions, montre que leur composition en acides gras est fortement influencée par les facteurs de l'environnement (sols, température, climat ...etc.). Cependant, les acides gras insaturés restent majoritairement présents quel que soit l'origine de la plante. Dans ces huiles, les principaux acides gras saturés sont essentiellement l'acide palmitique, l'acide stéarique et l'acide myristique, tandis que les acides gras insaturés majoritaires sont l'acide linoléique et l'acide oléique (Üstun et *al.*, 1990 ; Atta, 2003).

5.2. L'huile essentielle

Représente entre 1,4 à 1,9 % du poids de l'huile fixe et 0,18 à 0,50 % du poids des graines (Benkaci-Ali et *al.*, 2006). L'analyse de cette huile par GC-MS réalisée par l'équipe de Bucar (2000) a permis d'identifier 32 composants, dont la majorité d'entre eux sont; la thymoquinone , p-cymène , carvacrol , longifolène , 4-terpinol , et le tanethol (Burits et Bucar, 2000) (Tableau 4).

Alors que l'étude d'huile essentielle des graines de *Nigella sativa* effectuée par l'équipe de Nickavar démontre que les composés majoritaires sont le trans-anethole, p-cymene, limonene et le carvone (Nickavar et *al.*, 2003) .

Tableau 4: Les composants des huiles essentielles de *Nigella sativa* L (Burits et Bucar, 2000).

Composition	Teneur (%)
la thymoquinone	27,8%-57 %
p-cymène	7,07-15,83 %
carvacrol	5,8-11,6 %
longifolène	1,2-8 %
4-terpinol	1,98-6,59 %
Tanethol	0,25- 4,28 %
trans-anethole	38.3 %
p-cymene	14.8 %
limonene	4.3 %
le carvone	4.0 %

Récemment, L'huile essentielle de *Nigella sativa* cultivée au Sahara algérien (Timimoune et Adrar), extraite par deux méthodes différentes; l'hydrodistillation et distillation par micro-onde a été analysée par Chromatographie en phase gazeuse et Gas Chromatography – Mass Spectroscopy, 112 composés ont été identifiés et caractérisés, le p-cymène représente toujours le composé le plus abondant suivi de la thymoquinone (Benkaci-Ali et *al.*, 2007).

Les huiles essentielles peuvent être également renfermées d'autres constituants qui ne sont pas des terpènes ou des dérivés de phénylpropane, comme les composés issus de la dégradation d'acides gras et les composés azotés et soufrés qui résultent du clivage d'acides aminés ou de ces précurseurs (Pourmortazavi et *al.*, 2007 ; Maffei, 2010 ; Csekea et *al.*, 2007).

6. Toxicité de *Nigella sativa*

La plupart des études montrent clairement que la nigelle possède un index thérapeutique élevé et une excellente innocuité à des doses inférieures à 4 g/kg/jour. Les travaux de Mahfouz et ses collaborateurs en 1965, et ensuite ceux de Tenekoon et ses collaborateurs en 1991, ont étudié la toxicité des extraits aqueux et alcooliques de *Nigella sativa*.

Zaoui et ses collaborateurs ont rapporté, plus tard, que les huiles fixes de *Nigella sativa* présentent un DL50 de 28,8 mL/kg et 2,06 mL/kg. Dans le même sens, la toxicité chronique de 2 mL/kg des huiles durant 12 semaines présente des valeurs normales pour les ALAT, ASAT et les GGT (Zaoui et *al.*, 2002b).

Dans une autre étude *in-vitro*, de screening cytotoxique des extraits de graines *Nigella sativa* a indiqué une cytotoxicité de la fraction d'acétate d'éthyle contre différentes catégories de lignées de cellules cancéreuses, P388, MOLT4, les WEHI 164, LL / 2, Hep

G2, SW620 et J82, par la mesure du 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT). Les résultats indiquent que la fraction possède un effet cytotoxique puissant ainsi qu'un effet de potentialisation de la réponse immunitaire cellulaire (Swamy et Tan, 2000).

L'étude de Khader et ses collaborateurs (2009) montrent un effet cyto- et géno-toxique concentration-dépendant de la thymoquinone. En effet, la thymoquinone induit in effet anti-prolifératif à une concentration de 20 μ M et à concentration plus élevée, elle provoque une cyto-toxicité aigüe. La thymoquinone augmente significativement le taux des cellules nécrosées lorsqu'on l'utilise à une concentration de 2.5 et 20 μ M. De plus, elle induit une géno-toxicité significative à une concentration \geq 20 μ M. la thymoquinone peut être métabolisée en espèces réactives et augmente le stress oxydatif qui contribue à la déplétions des enzymes antioxydants et provoque l'oxydation de l'ADN dans les hépatocytes traités avec des concentrations élevées de la thymoquinone (Khader et *al.*, 2009).

Chapitre 2

Stress oxydatif

1. Généralité

L'oxygène est un composé essentiel pour les organismes multicellulaires parce qu'il permet de produire de l'énergie en oxydant de la matière organique. En effet, nos cellules convertissent une partie de cet oxygène en métabolites toxique : les radicaux libres organiques. Au cours de l'évolution, la défense contre ces espèces activées de l'oxygène, capable d'agresser les molécules les plus essentielles à la vie. Il existe ainsi un équilibre dynamique entre les composés pro-oxydants et antioxydant au sein d'un organisme (Bartosz, 2003).

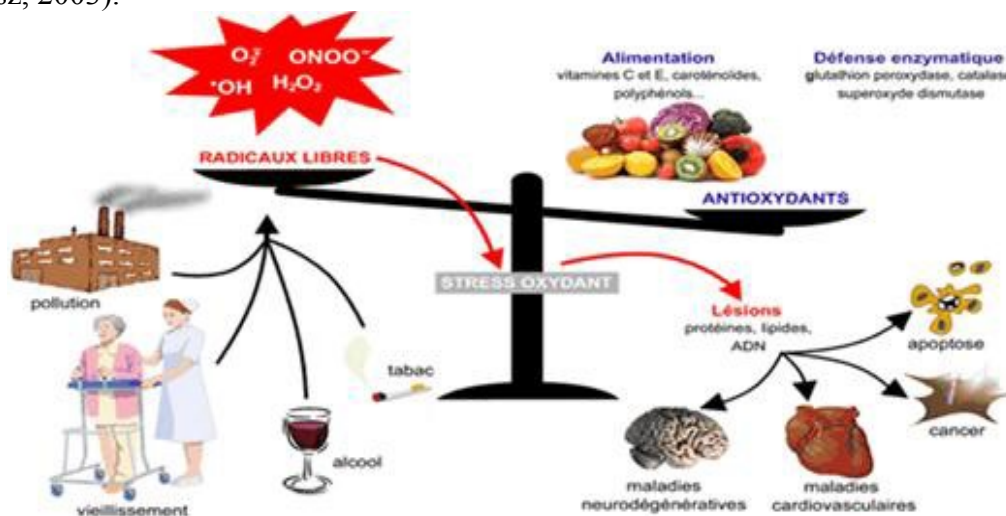


Figure 5: Balance radicaux libres /antioxydant
(<http://www.nature-algues.com>)

2. Stress oxydant cellulaire

Le stress oxydant peut se définir comme un déséquilibre dans la balance entre pro-oxydants (producteurs de radicaux libres) et antioxydant (protection contre les radicaux libres). Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, telles que la surproduction endogène d'agents pro oxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, herbicides, ozone, amiante, métaux toxiques) (Bartosz, 2003).

3. Radicaux libres de la biologie

Un radical libre est une espèce chimique, possède un ou plusieurs électrons non appariés sur sa couche externe (Lehucher-Michel et *al.*, 2001). La présence d'un électron célibataire lui confère une grande instabilité, ce qui signifie qu'il a la possibilité de réagir avec de nombreux composés dans des processus le plus souvent non spécifiques, et que sa durée de vie en solution est très courte, c'est -à -dire qu'il a tendance à revenir immédiatement à l'état stable en donnant un électron ou en prenant un a une autre molécule, il peut donc être réducteur ou oxydant.

Les radicaux libres qui proviennent de l'oxygène sont appelés les espèces de l'oxygène (EOR) alors que les radicaux libres qui sont générés par réaction de l'oxygène avec l'azote sont considérés comme une sous-classe des radicaux libres appelés les espèces réactives de l'azote (ERN).

Ces espèces réactives oxygénées et azotées regroupent non seulement des radicaux libres mais également des dérivés non radicalaires mais ils sont très réactifs et peuvent être des précurseurs de radicaux libres (Bartosz, 2003; Halliwell et Whiteman, 2004) (Tableau 5).

Tableau 5 : Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques (D'après Bartosz, 2003).

Espèces radicalaires		Espèces non radicalaires	
Anion superoxyde	$O_2^{\bullet-}$	Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Radical hydroxyle	OH^{\bullet}	Acide hypochlorique	$HOCl$
Monoxyde d'azote	NO^{\bullet}	Oxygène singulier	1O_2
		Peroxynitrite	$ONOO^-$

4. Sources de production des radicaux libres

Des radicaux libres sont produits par un grand nombre de mécanismes tant endogènes qu'exogènes (Figure 6).

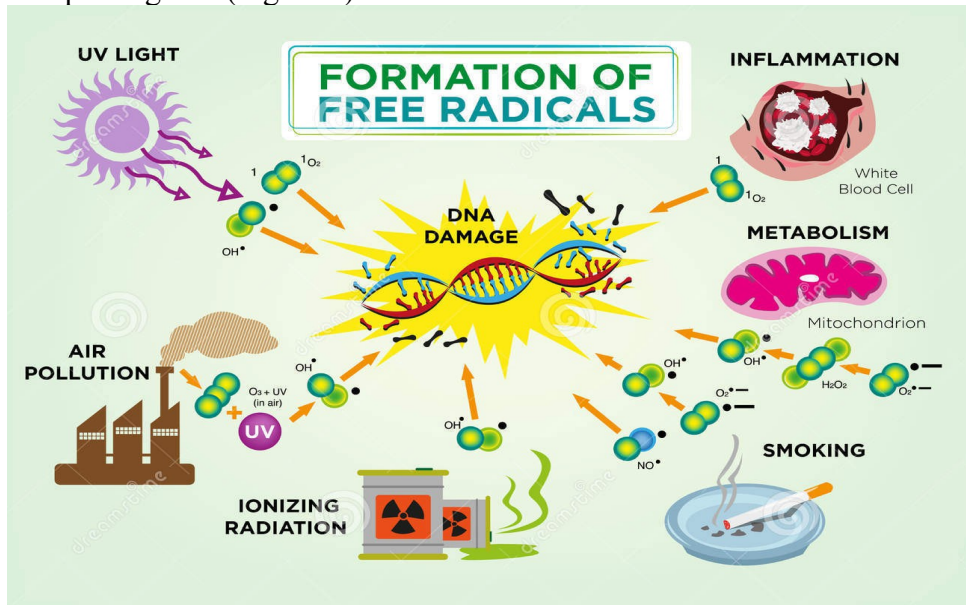


Figure 6: Origine des radicaux libres

(<https://www.la-famille-des-radicaux-libres.html>.)

4.1. Sources exogènes des ROS

Les radicaux libres exogènes proviennent d'un apport extérieur, c'est-à-dire lors d'une exposition à un environnement toxique. Ces toxines peuvent pénétrer au corps humain et induire la formation de radicaux libres.

4.1.1. Rayonnements UV

Les rayonnements UV induisent la synthèse de radicaux libres du type O₂[•], OH[•], ¹O₂ et de molécules génératrices de radicaux libres tel que H₂O₂, par l'intermédiaire d'agents photo sensibilisants (Seidle et *al.*, 2010).

4.1.2. Alcool

L'ingestion d'alcool est suivie de la formation de radicaux libres selon divers mécanismes. La xanthine oxydase et l'aldéhyde oxydase peuvent oxyder le principal métabolite de l'éthanol, l'acétaldéhyde, avec production d'O₂[•]. D'autre part l'éthanol stimule également la production d'anion superoxyde par induction de la synthèse des NADPH oxydase, NADPH cytochrome réductase et du cytochrome P450 (Robineau et *al.*, 2012).

4.1.3. Certains médicaments

Les médicaments qui sont utilisés comme un traitement contre le cancer peuvent provoquer aussi la production des radicaux libres (Moller, 1996).

4.2. Sources endogènes

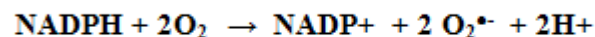
4.2.1. Non enzymatiques

a- Chaîne mitochondriale de transport d'électrons.

Cette chaîne respiratoire fournit plus de 80% de l'adénosine triphosphate (ATP) nécessaire aux besoins de la cellule et est la source la plus importante de la production d'ERO, elle produirait en effet 90% des ERO cellulaire (Balaban *et al.*, 2005). Environ 2% de l'oxygène utilisé par mitochondrie aérobie intactes est partiellement réduit par des électrons en l' $O_2^{\bullet-}$ (Bovoriz et Chance, 1993 ; Boutbir, 2010).

b- Macrophages

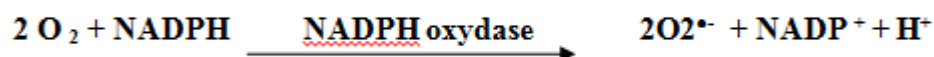
La flambée respiratoire des macrophages activée permet la réduction de NADP en NADPH, qui en présence de l'oxygène va s'oxyder pour produire des espèces radicalaires de l'oxygène. L'oxydase de la flambée respiratoire (NADPH oxydase) est une flavoprotéine qui réduit l'oxygène en anion superoxyde (Murray *et al.*, 2013) :



4.2.2. Enzymatiques

a- NADPH oxydase

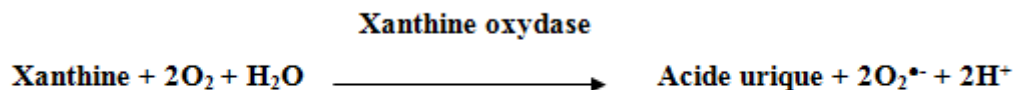
Elle se situe dans toutes les cellules, au niveau de la membrane cytoplasmique. Elle libère l'anion $O_2^{\bullet-}$ à l'extérieur de la cellule dans le cas des cellules phagocytaires, et à l'intérieur dans le cas des cellules non phagocytaires (Powers et Jackson, 2008).



La NADPH oxydase joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire et plus précisément dans la lutte contre les micro-organismes (Berlette, 1997).

b- Xanthine oxydase

En condition de forte demande d'ATP et de déficit en oxygène, la xanthine oxydase catalyse la dégradation de l'hypoxanthine en acide urique. En cas d'hypoxie, le système enzymatique xanthine oxydase intervient dans la production du superoxyde au cours de l'oxydation de la xanthine en acide urique selon la réaction suivante (Martin et *al.*, 2004) :



5. Différentes formes des radicaux libres

5.1. Anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$)

Par sa configuration électronique, l'oxygène moléculaire est un radical, il possède en effet deux électrons non appariés. Cependant, dans l'organisme, une partie de cet oxygène moléculaire peut capter d'une manière univalente un électron conduisant à la formation du radical superoxyde (Koechilin et Ramonatxo, 2006).



Environ 0 à 5% de l'oxygène moléculaire utilisé par les mitochondries est partiellement réduit par des électrons qui s'échappent des transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire (Bartosz, 2003). L'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) joue un rôle important dans la formation des espèces réactives de l'oxygène comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle (OH^{\bullet}), ou l'oxygène singulier ($^1\text{O}_2$) (Stief, 2003).

5.2. Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Il est appelé dioxyde de dihydrogène, ou l'eau oxygénée, il se forme par la dismutation spontanée ou enzymatique du radical superoxyde (Pal Yu, 1994). La dismutation enzymatique est catalysée principalement par le superoxyde dismutase (SOD).



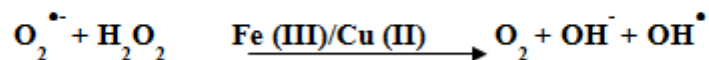
À côté de la SOD, il existe d'autres enzymes produisant H_2O_2 , comme les oxydases présentes particulièrement dans les peroxysomes (kohen-nyska et *al.*, 2002). Le foie est l'organe central de cette production. Les microsomes sont responsables dans 80% de la concentration d' H_2O_2 généré *in vivo* dans les sites hyperoxiques (Valko et *al.*, 2006).

5.3. Radical hydroxyle (OH^\bullet)

Ce radical est formé principalement par la dégradation du H_2O_2 en présence de métaux de transition sous leur forme réduite, la présence du fer ferreux conduit à la réaction de Fenton.



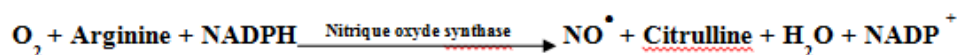
H_2O_2 peut également réagir avec le radical superoxyde, aboutissant là encore à la production du OH^\bullet , ce mécanisme réactionnel est appelé réaction d'Haber et Weiss (Sorg, 2004).



Avec une demi vie de l'ordre de la nanoseconde, le radical hydroxyle est le plus réactif de toutes les espèces dérivées de l'oxygène, il apparaît comme l'espèce réactive ayant une responsabilité majeure dans la cytotoxicité des radicaux libres (Guetteridge, 1993).

5.4. Monoxyde d'azote (NO^\bullet)

Le monoxyde d'azote (NO^\bullet) est produit chez les organismes supérieurs par l'oxydation de l'un des atomes N-terminaux de la L-arginine, cette réaction est catalysée par le nitrique oxyde synthase (NOS) (Sorg, 2004) selon la réaction suivante :



Cette production est physiologique et joue un rôle majeur dans la neurotransmission, régulation de la pression sanguine, mécanisme de défense, relaxation des muscles lisses, régulation immunitaire (Valko et *al.*, 2007). Mais à forte concentration, le NO devient délétère pour les cellules notamment en réagissant avec le $\text{O}_2^{\bullet-}$ pour former un puissant oxydant le peroxynitrite (ONOO^\bullet) qui peut secondairement se décomposer en d'autres oxydants comme le NO_2 et le OH^\bullet (Densiov et Afanas'ev, 2005).

5.5. Oxygène singulier($^1\text{O}_2$)

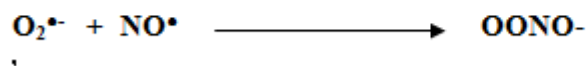
Pour l'oxygène moléculaire l'état triplet (biradical) est plus stable que l'état singulier, ainsi l'oxygène singulier fait partie des EOR. Il peut être produit par plusieurs réactions biochimiques d'oxydation incluant la peroxydase et la lipooxygénase, par la réaction entre divers EOR ou en présence de la lumière, d'oxygène et de photosensibilisateur comme la porphyrine, tel est le cas de la porphyrie erythropoétique-congénitale (Sorg, 2004).



L'oxygène singulier est plutôt faible et non toxique pour les tissus des mammifères. Cependant, il a été montré qu'il est impliqué dans l'oxydation du cholestérol. Chez les êtres humains, l'oxygène singulier est aussi bien un signal, avec un potentiel thérapeutique pour lutter contre des pathogènes variés comme les bactéries, les virus et même les cellules cancéreuses (stief, 2003).

5.6. Anion peroxytrite(OONO^-)

Le monoxyde d'azote peut réagir avec l'anion superoxyde pour générer du peroxytrite.



L'anion peroxytrite est une espèce cytotoxique qui cause les lésions tissulaires et oxyde les lipoprotéines a faible densité (LDL) (Halliwell, 1997). L'anion peroxytrite apparait être un radical libre important qui cause des dommages tissulaires générés sur les sites d'inflammation (Papavas, 1999a). Le peroxytrite (OONO^-) peut causer la modification et l'oxydation des protéines bases d'ADN (McVean et *al.*, 1999). Son rôle comme oxydant biologique provient de sa grande capacité de diffusion à travers les membranes cellulaires (Knight, 1999).

6. Cibles des radicaux libres

Aux niveaux des cellules, les cibles principales sont l'ADN et les lipides membranaires, et de manière moins importante les protéines et les glucides (Lenzi, 2011).

6.1. Altérations de l'ADN

Les ERO constituent la plus importante source endogène de dommages à l'ADN. Elles peuvent lui induire de nombreuses modifications covalentes telles que des lésions aux bases nucléotidiques (purines et pyrimidines), des cassures simples brin ou doubles brin de la chaîne oligonucléotidique, ou des pontages avec des résidus protéiques. Ces modifications peuvent avoir de graves conséquences sur la réplication du génome (Figure 7) (Daum et Badouard, 2006 ; Haleng *et al.*, 2007).

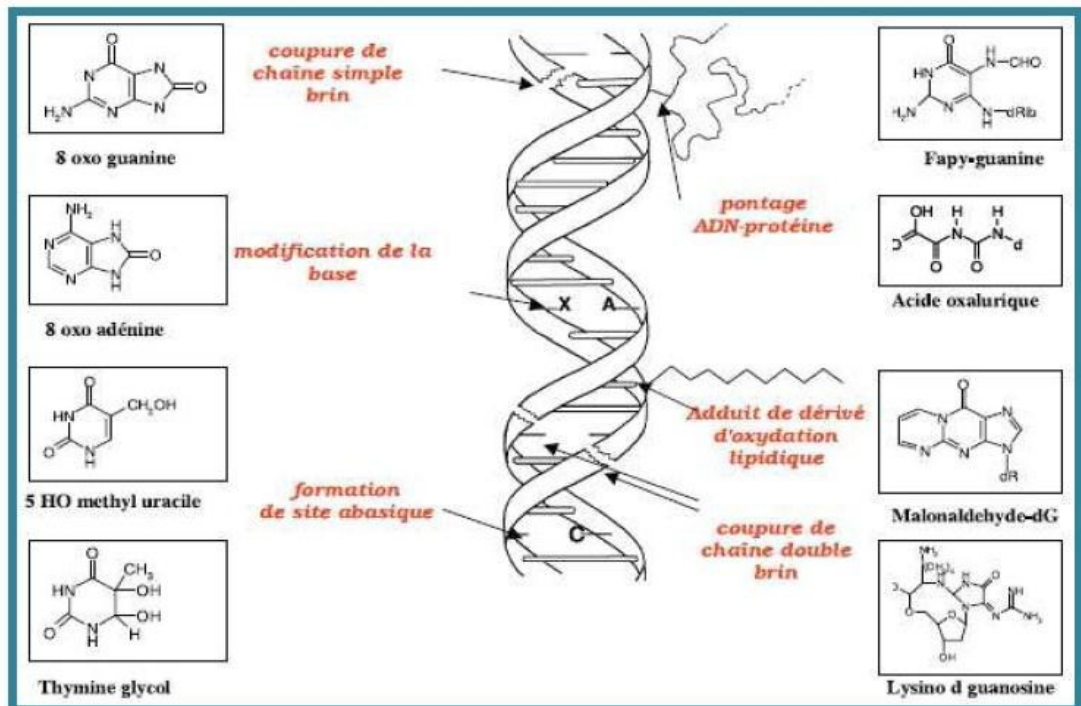


Figure 7: Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (Favier, 2003).

6.2. Altérations des lipides

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical pyroxy. Cette réaction appelée peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne car le radical pyroxy formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué (Cadet, 2002 ; Favier, 2003).

6.3. Altérations des protéines

Les ERO provoquent une dénaturation des protéines : altération des groupements thiols, formation de ponts disulfures, accentuation du caractère hydrophobe d'où

agrégation des protéines qui les rend plus résistantes à la protéolyse physiologique (Auberval, 2010).

6.4. Altérations des glucides

Les cibles glucidiques sont essentiellement le glucose et les protéoglycanes du cartilage. L'oxydation au sens large du glucose est aussi appelée « glycosoxydation » et regroupe en fait 2 mécanismes possibles : Soit oxydation au sens strict du glucose, donnant des dérivés carbonyles susceptibles de réagir avec une protéine, pour aboutir à la formation de « produits finaux de glycosylation » ou PFG, Soit formation d'une liaison covalente entre un ose et les groupements aminés libres d'une protéine : on parle de « glycosylation non-enzymatique des protéines ». Cela forme une protéine glyquée, qui peut être attaquée par des ERO telles que NO^\bullet Ou ONOO^- pour former des PFG (Halliwell et Gutteridge, 2007).

7. Rôle physiologique des espèces réactives oxydantes

De façon physiologique, les ERO existent dans les cellules et dans les tissus à des concentrations faibles mais mesurables. Elles protègent, régulent la cellule et permettent de maintenir une certaine homéostasie de l'état redox de l'organisme. Lorsqu'elles sont produites dans un compartiment cellulaire spécifique, elles peuvent participer au fonctionnement de certaines enzymes, intervenir dans la défense immunitaire (Oxydative Bruts ou Flambée Respiratoire), agir en tant que second messager cellulaire, intervenir dans les voies de transduction du signal et réguler les fonctions cellulaires (Dikalov et *al.*, 2007).

8. Systèmes de défenses antioxydants

Le maintien d'un niveau non cytotoxique des EOR est assuré par des systèmes d'antioxydants. Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (Berger, 2006). Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en systèmes enzymatiques et systèmes non enzymatiques (Figure 8) (Goudable et Favier, 1997).

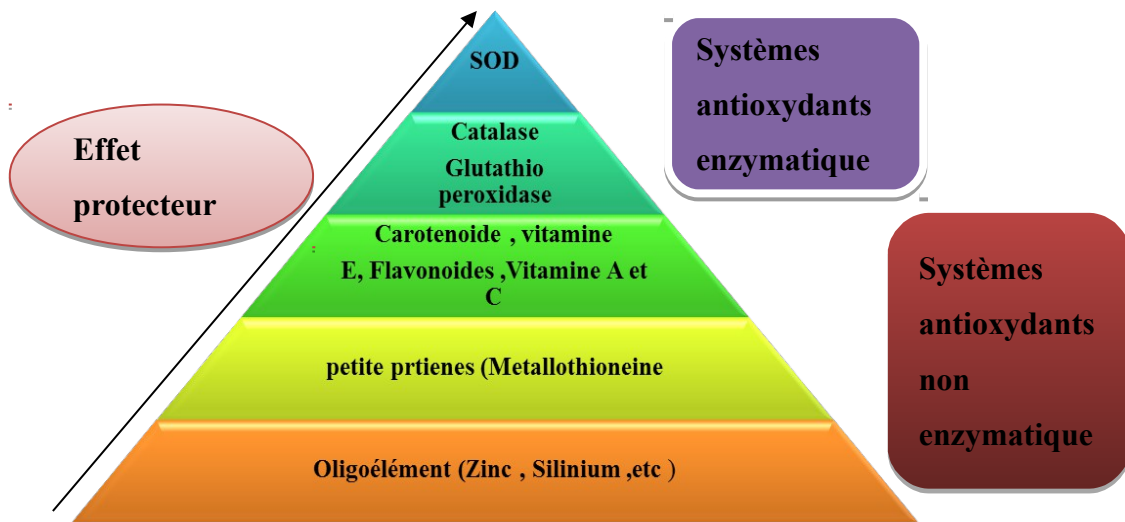


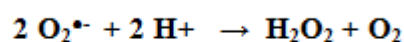
Figure 8: Pyramide des systèmes de défenses antioxydants

8.1. Systèmes antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques, le superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx) et catalase (CAT) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les différents espèces oxydants (Lehucher -Michel et *al.*, 2001).

8.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)

Les SOD sont les premières enzymes à intervenir dans la cascade des ROS. Ce sont des métalloprotéines, Comme l'indique son nom, le superoxyde dismutase (SOD) accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène :

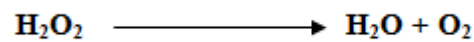


Il existe plusieurs isoenzymes de SOD : cytosolique Cu, Zn-SOD, Mitochondriale Mn- SOD et extracellulaire EC-SOD le rôle de chaqu'une est la dismutation du radicale superoxyde en H_2O_2 et en O_2 . La Mn-SOD à une activité antitumorale très efficace, par ailleurs la EC-SOD à un rôle fondamental dans la protection antioxydante des surfaces cellulaires et des protéines de la matrice extra cellulaire (El- Demerdash et *al.*, 2013).

8.1.2. Catalase (CAT)

La Catalase est une enzyme dépendante du Fe, qui entre en compétition avec la glutathion peroxydase pour convertir deux molécules de H_2O_2 en H_2O et O_2 , son utilisation est nécessaire quand les quantités d' H_2O_2 sont élevées (Finaud et *al.* 2006; Sayre et *al.*,

2008). Une molécule de Catalase peut convertir Six million molécules d'hydrogène peroxyde en l'eau et oxygène chaque minute (Alain, 2011).



8.1.3. Glutathion peroxydase (GPx)

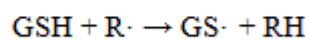
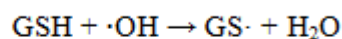
La GPx est une enzyme qui se trouve dans les liquides extracellulaires (sang), dans les cellules au niveau du cytoplasme et dans les membranes. Elle agit en synergie avec laSOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation de H₂O₂ en H₂O et O₂ (Arora et *al.*, 2002).

8.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques

Ce sont des nutriments naturellement amenés par des composés endogènes ou par l'alimentation, ils ont la capacité de trappé les espèces oxydantes en captant leur électron libre et en formant ainsi des espèces plus stables qui pourront être éliminées par d'autre systèmes antioxydants.

8.2.1. Glutathion

C'est un tripeptide dont la concentration intracellulaire est importante. La fonction thiol confère au glutathion un rôle d'antioxydant, c'est-à-dire de réducteur (donneur d'électron ou d'atome H) (Gardès et *al.*, 2003).



La forme réduite du glutathion (GSH) est le régulateur majeur du redox intracellulaire et se trouve en abondance dans les cellules. Le glutathion agit comme un capteur direct des radicaux libres, un Co-substrat pour l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase, cofacteur de plusieurs autres enzymes (Lavoie, 2012).

8.2.2. Polyphénols et flavonoïdes

Ces composés sont des antioxydants puissants susceptibles d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules. En effet, les flavonoïdes sont des composés avec une activité anti-oxydante prononcée (Hodek et *al.*, 2002). Ils ont la capacité de piéger directement les radicaux libres comme le super oxyde,

le radical peroxy, le radical alkoxy et le $\text{OH}\cdot$ par transfert d'hydrogène (McCord, 1995).

8.2.3. Vitamines antioxydant

a- Acide ascorbique: vitamine C

La vitamine C est un antioxydant puissant. Elle participe dans les réactions avec la vitamine E et l'enzyme glutathion peroxydase pour neutraliser des radicaux libres (Cheick Traoure, 2006). La vitamine C agit principalement en piégeant directement les ROS (majoritairement $\text{l'O}_2\cdot$ et l'ONOO^-) (Belkhiri, 2010). Il est présent dans les légumes, le chou, le poivron, les agrumes (Colette, 2003). Elle joue un rôle important dans la régénération de la vitamine E (figure 9).

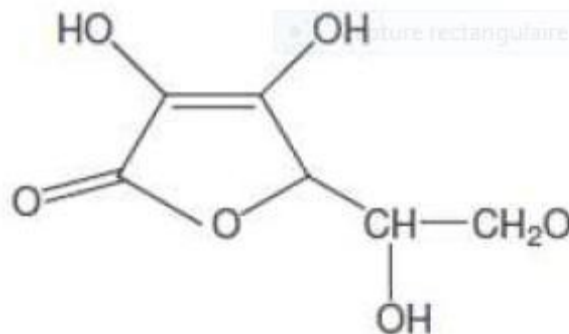


Figure 9: l'acide L-ascorbique (Elise, 2008)

b- α -tocophérol: vitamine E

La vitamine E (Figure 10) est un antioxydant majeur liposoluble. C'est un composé amphiphile, capable de s'insérer dans les membranes cellulaires. La forme alfa tocophérol est la plus active parmi les autres formes de cette vitamine (Mates, 1999). Elle se fixe les radicaux libres organiques qui peuvent provenir de l'oxydation des lipides et participe à la diminution de la propagation des réactions de peroxydation lipidique (Skulachev, 1998 ; Kamal-Eldin, 1996).

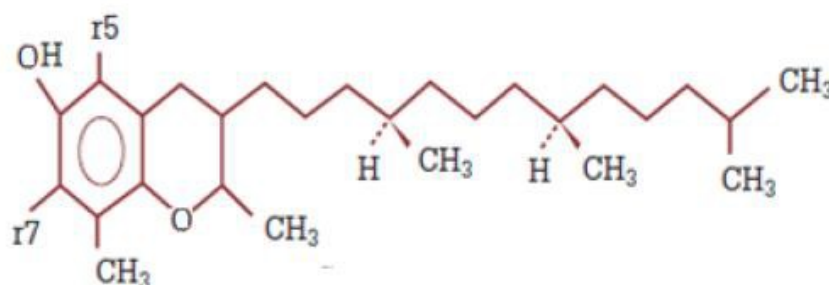


Figure 10: Structure chimique d' α -tocophérol (Mohammedi, 2013).

c- Caroténoïdes

L'activité antioxydant de ces molécules repose principalement sur la présence de nombreuses doubles liaisons conjuguées au sein de leur structure (Figure 11) (Reichl, 2010). Généralement, elles interagissent avec les radicaux libres par 3 mécanismes, soit par l'abstraction d'hydrogène, transfert d'électron et addition du radical (Fain, 2004).

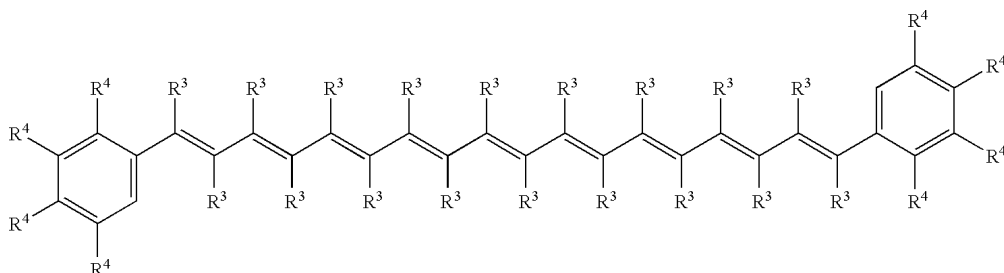


Figure 11: structure générale des caroténoïdes

9. Modes d'action des antioxydants

Dans l'organisme, il existe plusieurs types de molécules à activité antioxydante dont les mécanismes d'action sont différents (Benhamou, 2012) (Tableau 6).

Tableau 6: Principaux modes d'action de quelques antioxydants (Pastre, 2005).

	Nature	Mode d'action
Défenses non enzymatiques	Vitamine E	piéger des radicaux libres
	Vitamine C	piéger des radicaux libres
	Bêta carotène	Fixation des métaux de Transition piéger des radicaux libres piéger des radicaux libres
	acide urique	piéger certains radicaux libres
	Superoxyde dismutase	Catalyse la dismutation de l'anion superoxyde
	Catalase Métabolise	Métabolise H ₂ O ₂

Défenses enzymatiques	Glutathion peroxydase	Action réductrice sur H_2O_2 et les hydro peroxydes
-----------------------	-----------------------	---

Chapitre 3

Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1. Matériel végétale

Les graines de *Nigella sativa* utilisées dans cette étude sont locales, cultivées et récoltées dans la wilaya de Bechar au cours des années de 2012 et 2013. Après nettoyage des débris végétaux, les graines sont stockées à l'obscurité et à 4°C jusqu'à leur utilisation.

2. Méthodes

2.1. Extraction de l'huile totale

L'extraction et le fractionnement de l'huile totale sont réalisés selon le protocole de Ramadan et Mörsel (2002a) avec quelques modifications. Les graines de *Nigella sativa* préalablement nettoyées sont broyées et la poudre obtenue est soumise à une extraction par soxhlet, en utilisant le méthanol comme solvant, pendant 2 heures. Le méthanol est éliminé par évaporation sous pression réduite à 40°C en utilisant un rotavapeur (BÜCHI). Cette opération a permis ainsi d'obtenir un extrait caractérisé par une couleur vert-foncée.

L'extrait méthanolique est mélangé dans une ampoule à décanter avec l'hexane (200 ml). Après agitation, deux phases ont été obtenues; *(i)* une phase méthanolique plus dense qui apparaît au-dessous *(ii)* une phase hexanique, contenant les lipides. Cette dernière phase a été récupérée et l'hexane a été par la suite évaporé à 40°C. L'extrait résultant est HT des graines de *Nigella sativa* caractérisée par une couleur verdâtre (Figure 12).

2.2. Fractionnement de l'huile totale par chromatographie sur colonne du gel de silice

Le fractionnement de l'huile totale (HT) des graines de *Nigella sativa* a été réalisé par chromatographie sur colonne (CC). La colonne utilisée est de 30 cm de hauteur et de 20 mm de diamètre. La phase stationnaire est constituée du gel de silice 60G (70-230 Mesh; 0,063-0,2 mm). L'élution de la fraction neutre (FN) est réalisée selon avec le chloroforme pure (Ramadan et Mörsel, 2002a). Les solvants sont éliminés par évaporation sous pression réduite à 40°C en utilisant un rotavapeur, de marque BÜCHI.

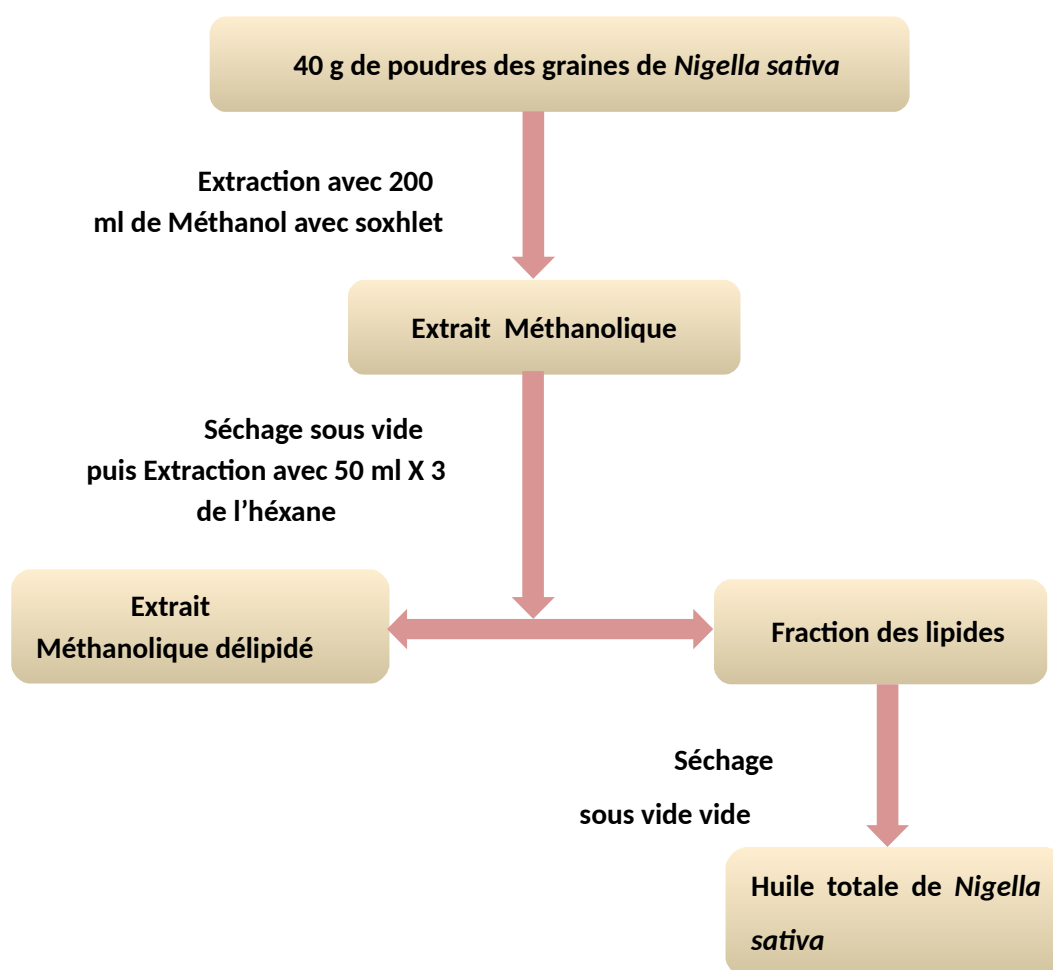


Figure 12. Schéma d'extraction de l'huile totale et de l'extrait méthanolique à partir des graines de *Nigella sativa*

2.3. Dosage des composés phénoliques

Le dosage des composés phénoliques de HT et la FN des graines de *Nigella sativa* est réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu rapportée par Li et ses collaborateurs (2007). Cette méthode est basée sur la réduction, en milieu alcalin, du mélange phosphotungstique (WO_4^{2-})-phosphomolybdique (MoO_4^{2-}), conduisant à la formation d'un produit de couleur bleu. Brièvement, 1 ml du réactif de Folin (10 fois dilué) est ajouté à 200 μ l d'échantillon ou standard avec des dilutions convenables. Après 4 min. d'incubation, 800 μ l d'une solution de carbonate de sodium (75 mg/ml) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 h. d'incubation, à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 765nm. La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme

d'étalonnage établie avec l'acide gallique (20-140 µg/ml) et exprimée en µg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (µg EAG/g d'extrait).

2.4. Dosage des flavonoïdes

Pour quantifier les flavonoïdes dans les fractions de *Nigella sativa*, la méthode du trichlorure d'aluminium (Baharun et al., 1996) est utilisée. À 1 ml d'échantillon ou standard est ajouté 1 ml de la solution d'AlCl₃ (2% dans le méthanol). Après 10 minutes de réaction, l'absorbance est mesurée à 430 nm. La concentration des flavonoïdes est calculée à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (1-40 µg/ml) comme standard et exprimée en µg d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (µg EQ/g d'extrait).

2.5. Piégeage du radical DPPH

Dans ce test les antioxydants réduisent le diphényl picryl-hydrayl ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphényl picryl-hydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Sanchez-Moreno, 2002). Brièvement, La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2,4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol. 25 µL des solutions d'extraits ou standards (quercétine) sont ajoutés à 975 µL DPPH, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517 nm L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

$$\% \text{ d'activité antiradicalaire} = [(Abs_{517} \text{ contrôle} - Abs \text{ échantillon}_{517}) / Abs_{517} \text{ contrôle}] \times 100$$

2.6. Pouvoir réducteur

Cette méthode consiste à évaluer l'aptitude de l'échantillon à donner un électron pour convertir le Fe³⁺ en Fe²⁺, cette forme est quantifiée par la mesure de la couleur bleu du complexe (bleu de Pruss Fe₄ [Fe(CN)₆]₃) qui absorbe à 700 nm. Une absorbance élevée indique que l'échantillon possède un grand pouvoir réducteur (Barros et al., 2007).

Ce test est effectué selon la méthode de Prasad et ses collaborateurs (2009). Brièvement, 1,25 ml du tampon phosphate (0,2M, pH=6,6) et 1,25 ml de 1% de potassium ferricyanide [K₃Fe(CN)₆] sont ajoutés à 50 µl des différentes concentrations des

échantillons. Après 20 min d'incubation à 50 °C, 1,25 ml d'une solution aqueuse de TCA à 10% sont ajoutés au milieu réactionnel. Après 10 min de centrifugation à 3000 rpm, 1,25 ml d'eau distillée et 250µl de 0,1% FeCl₃ sont ajoutés à 1,25 ml du surnageant, puis l'absorbance est déterminée à 700 nm contre un blanc contenant tous les réactifs en absence de l'échantillon. Les résultats sont exprimés en concentration effective à 50 % (CE₅₀) qui traduit la concentration d'antioxydant nécessaire pour l'obtention de 0,5 d'absorbance.

2.7. Analyse statistique

Les résultats des tests effectués *in vitro* sont exprimés en moyenne \pm SD. Les valeurs d'IC₅₀ sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe d'étalonnage en utilisant le logiciel (Graph Pad. Prism. V 5.00). La différence entre le contrôle et les différents tests, est déterminée par le test ANOVA univariée suivie du test de Dunnett/Tukey pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification. Les valeurs de $p \leq 0.05$ sont considérées significatives.

Résultats et discussion

1. Rendement de l'extraction

L'extraction de HT et FN à partir des graines de *Nigella sativa* a été effectuée selon la méthode de Ramadan et Mörsel (2002) avec quelques modifications. Dans cette étude, le rendement de HT est de 25.45 ± 3.5 % du poids de la graine. La chromatographie sur colonne a permis d'extraire la FN avec un rendement de 95.30 ± 0.6 % de l'HT (Tableau 7). Nos résultats sont comparables à ceux rapportés par Ramadan et Mörsel (2002a). La ressemblance des résultats est due à l'utilisation du même procédé d'extraction. Des travaux effectués sur les graines de *Nigella sativa*, rapportent que la teneur en huile fixe et totale des graines de *Nigella sativa* est très variable. Cette variabilité peut être attribuée d'une part à la différence dans la procédure d'extraction et d'autre part à l'influence des autres facteurs comme l'origine géographique, les facteurs écologiques, les pratiques agronomiques, les conditions du stockage (Atta, 2003; Bourgou, 2008; Hamrouni-Sellami, 2008).

Tableau 7 : Rendement d'extraction de HT et FN à partir des graines de *Nigella sativa*

Fractions	Rendement d'extraction %
HT	25.45 ± 3.5 des graines
FN	95.30 ± 0.6 de l'huile totale

2. Dosage de polyphénol et flavonoïde

Afin de caractériser les extraits préparés à partir des graines de *Nigella sativa*, un dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes a été effectué. Les résultats sont présentés dans le tableau 8.

Tableau 8: Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes de HT et la FN.

Fractions	Polyphénols (EAG μg /g extrait)	Flavonoïdes (EQ μg /g extrait)
HT	26.44 ± 0.21	1.34 ± 0.21
FN	16.66 ± 0.48	0.59 ± 0.06

Pour la détermination quantitative des polyphénols de HT et FN de *Nigella sativa*, nous avons utilisé la gamme d'étalonnage d'acide gallique ($y = 0,006 x + 0,033$, $R^2 = 0,990$). Les résultats sont exprimés en équivalent d'acide gallique μg (EAG) / g d'extrait.

Pour les flavonoïdes, on a utilisé la gamme d'étalonnage de la quercétine ($y = 0,026 x + 0,022$, $R^2 = 0,990$) et les résultats sont exprimés en équivalent de quercétine μg (EQ) / g d'extrait.

Nos résultats montrent que l'HT de *Nigella sativa* contient la plus grande quantité de polyphénols avec une teneur de $26,44 \pm 0,21 \mu\text{g EAG/g}$ d'extrait suivi par la FN avec une teneur de $16,66 \pm 0,48 \mu\text{g EAG/g}$ d'extrait. La teneur en flavonoïdes totaux est plus élevée dans HT $1,34 \pm 0,21 \mu\text{g EQ/g}$ d'extrait que dans la FN avec $0,59 \pm 0,06 \mu\text{g EQ/g}$ d'extrait. Ces résultats sont similaires à ceux publiés par Ramadan et ses collaborateurs (2003) ou ils ont montré que HT contient $24 \pm 0,11 \mu\text{g EAG/g}$ d'extrait.

La faible teneur en polyphénols et en flavonoïdes dans la FN est expliquée par l'absence des composés polaires dans cette fraction (fraction apolaire) alors que les composés phénoliques sont, généralement, des composés polaires à cause de leur richesse en fonctions hydroxyles (Sultan et *al.*, 2009). Sachant que HT est constituée, majoritairement, de composés apolaires (environ 97%) et une petite quantité de composés polaires dont les composés phénoliques (Ramadan et Morsel, 2003). Ceci peut expliquer la richesse relative de l'huile totale en ces composés en comparaison à FN.

3. Activité antioxydante *in vitro*

3.1. Test de DPPH

Les résultats de ce test montrent que les deux fractions ont une similaire aptitude à réduire le radical DPPH. La concentration inhibitrice de 50% est de $83,03 \pm 4,58 \mu\text{g/ml}$ et $140,95 \pm 3,63 \mu\text{g/ml}$ pour HT et FN respectivement. Les résultats sont présentés dans (figure 13, Tableau 9)

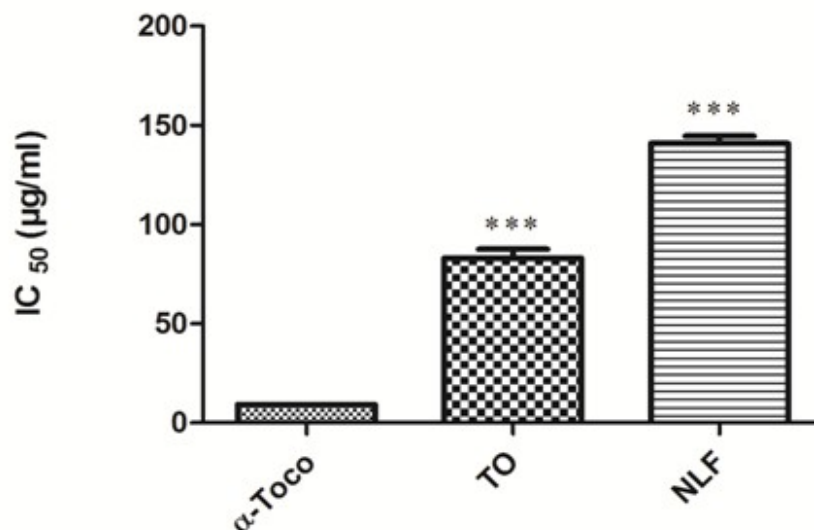


Figure 13: Effet piègeur du radical DPPH par les extraits HT et FN des graines de *Nigella sativa* et du α -tocophérol. (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD, ** : $p \leq 0.01$).

Tableau 9 : La concentration inhibitrice des extraits HT et FN des graines de *Nigella sativa* et α -Tocopherol.

Fractions	IC ₅₀ mg/ml
HT	83.03 \pm 4.58
FN	140.95 \pm 3.63
α -Tocopherol	9.18 \pm 0.11

3.2. Pouvoir réducteur

Dans ce test, le pouvoir antioxydant des fractions HT et FN des graines de *Nigella sativa* se manifeste avec le changement de la couleur du milieu réactionnel du jaune au bleu (Figure 14). Le pouvoir réducteur est exprimé par la concentration effective à 50 % (CE₅₀). CE₅₀ et la concentration qui permet d'obtenir une absorbance de 0,5 à 700 nm. Les résultats montrent que la fraction HT présente la meilleure capacité avec une EC₅₀ de 85.93 mg/ml suivi par la fraction FN avec 141.15 mg/ml (Tableau 10).

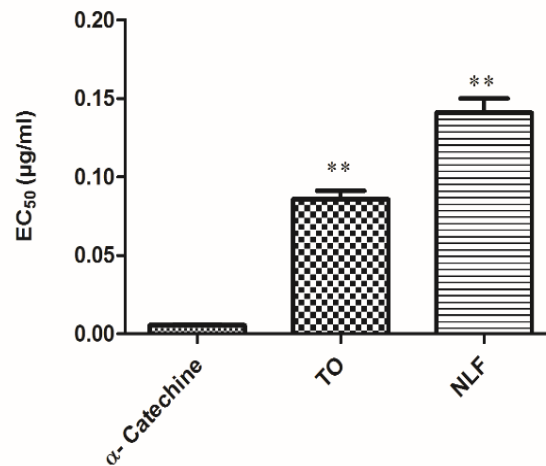


Figure 14 : Pouvoir réducteur des extraits HT et FN des graines de *Nigella sativa* et du standard α -catechine.

Tableau 10: Concentrations effectrices des extraits HT et FN des graines de *Nigella sativa* et l' α -Catechine.

Fractions	CE ₅₀ (mg/ml)
HT	85.93 ± 0.007
FN	141.15 ± 0.013
α -Catéchine	5.60 ± 0.034

Globalement, les résultats indiquent que l'HT possède une bonne activité anti-radicalaire. Cette activité pourrait être expliquée par la richesse naturelle de l'huile végétale en lipides bioactifs tels que les phétolestérols, les vitamines liposolubles notamment, les α -tocophérols et les β -carotènes, les acides gras insaturés notamment les ω -3 et ω -6 (Ramadan et Morsel 2002a, 2003). De plus, l'huile totale peut aussi contenir des composés phénoliques à caractères amphiphiles (Sultan et *al.*, 2009).

HT présente aussi un meilleur pouvoir réducteur par rapport à la fraction neutre (FN) (CE₅₀ 85.93 ± 0.007 mg/ml et 141.15 ± 0.013 mg/ml respectivement). Le pouvoir réducteur de l'HT pourrait être expliqué par la présence de lipides polaires notamment les phospholipides caractérisés par la présence de groupements amines. Tous ces groupes peuvent faciliter le transfert d'électrons (Hudson et Lewis, 1983 ; Hildebrand et *al.*, 1984).

Conclusion

Au terme du travail réalisé concernant l'activité antioxydante des huiles de *Nigella Sativa*, nous avons préparé l'huile totale et la fraction neutre de cette huile selon la méthode de Ramadan et Mörsel (2002a) avec quelques modifications.

Dans une première étape, nous avons procédé à l'extraction de l'huile totale à partir des graines de *Nigella sativa*, puis à son fractionnement sur une colonne de chromatographie pour obtenir la fraction neutre. Ensuite, nous avons estimé la teneur en polyphénols et en flavonoïdes dans les deux fractions (HT et FN) et finalement nous avons passé à l'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* de ces deux fractions en ciblant deux mécanismes; (*i*) la capacité de piéger les radicaux libres et (*ii*) la capacité à réduire Fe^{+3} en Fe^{+2} . Les résultats montrent un effet antioxydant intéressant et l'huile totale possède la meilleure capacité antioxydante *in vitro*.

Au vu des effets obtenus *in vitro*, les perspectives médicinales de l'huile de Nigelle sont donc très prometteuses mais les essais cliniques manquent. Cette étude pourrait être complétée par d'autres essais sur l'animale et l'être humain afin de développer des approches appropriées dans le but d'une éventuelle application chez l'humain.

Références Bibliographiques

A

- Abdel-aal E., Atti R.** Characterization of Black cumin (*Nigella sativa*) seeds. Alexandria Sci Exch J.1993; 14, 497-482.
- Aggarwal R., Kharya M., Shrivastava R.** Antimicrobial and anthelmintic activities of the essential oil of *Nigella sativa*. Indian J Exp Biol .1979 ; 17(11), p : 1264-1265.
- Alain massart.** Supplémentation en oméga 3 et antioxydant et stress oxydant au cours d'un entrainement de judo.these présenté pour obtenir le grade de : Docteur de l'université d'Orléans.2011.
- Al-Beitawi NA., El-Ghousein SS., Nofel AH.** Replacing bacitracin methylene disalicylate by crushed *Nigella sativa* seeds in broiler rations and its effects on growth blood constituents and immunity. Livestock Sci .2009; 125: 304-307
- Aljabre S H M., Randhaw M A., Akhtar N., Alakloby O M., Alqurashi A M., Aldossar A.** Antidermatophyte activity of ether extract of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. J of Ethnopharmacol. 2005; 101: 116-119.
- Al-Jassir S.** Chemical composition and microflora of black cumin (*Nigella sativa*) seeds growing in Saudi Arabia. Food Chem.1992; 45: 239-242.
- Arora A., Sairam., Srivastava G .**Oxidative stress and antioxidative system in plants. Cur Sci. 2002 ; 82: 1227-1230.
- Atta-UR-Rahman M., Ahmed S., Choudhary M., Habib-Urrahman.** Nigellimine-N-oxide-a new isoquinoline alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. Heterocycles.1985a; (23), p: 953-955.
- Atta-UR-Rahman M., Cun-Heng H., Clardy J.** Isolation and structure determination of nigellicine, a novel alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. Tetrahedron letters.1985b; (23), p: 2759-2762.
- Atta-UR-Rahman M., Zaman K.** Nigellimine: a new isoquinoline alkaloid from *Nigella sativa*. J Nat Prod.1992; (55), pp: 676-678.
- Atta-UR-Rahman M., Hassan S., Coudhary M., NI C., Clardy J.** Nigellidine : a new indazole alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. Tetrahedron letters.1995; (36), p: 1993-1996.
- Atta Mohamed Bassim.** Some characteristics of nigella (*Nigella sativa* L.) seed cultivated in Egypt and its lipid profile. Food Chem. 2003; 83: 63-68.

- **Auberval N.** Chapitre 2 : stress oxydant et le diabète. Prévention du stress oxydant dans le diabète ses complications par des antioxydants d'origine naturelle. Ed, Université de Strasbourg. 2010 ; p: 50-58.

B

- Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunete C., Dine T., Vasseur J.** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*. 1996; 46: 1086-1089.
- Balaban RS., Nemoto S., Finkel T.** Mitochondria, oxidant and aging. *Cell* .2005 ;12.p: 483-495.
- Barros L., Ferreira MJ., Queiros B., Ferreira ICFR., Baptista P.** Total phenols, ascorbic acid, b-carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chem*. 2007; 103: 413-419.
- Bartosz G.** Generation of reactive oxygene species in biological systems .*Comm toxicol* .2003; 9: 5-21.
- Belkheiri N.** Derives phenoliques à activite antiatherogenes. Thèse de doctorat en Chimie-Biologie-Santé .Université Toulouse III.2010 ; p :34.
- Benhamou N.** Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-ouest Algérien. Thèse UniversitéAboubakr Belkaïd , Tlemcen , Algérie.2012.
- Benkaci-Ali F., Baaliouamer A., Meklati BY.** Kinetic study of microwave extraction of essential oil of *Nigella sativa* . seeds. *Chromatographia*.2006; 64: 227-231.
- Benkaci-Ali F., Baaliouamer A., Meklati BY., Chemat F.** Chemical composition of seed essential oils from Algerian *Nigella sativa* extracted by microwave and hydrodistillation. *Flav &Fragr J*. 2007; 22: 148-153.
- Berlette BS., Stadtman ER.** Protein oxidation in aging disease, and oxidative stress. *The J bio chem*.1997;272:20313-20316.
- Berger MM.** Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nut Clin et Métabol* .2006 ; 20: 48-53.
- Bonnier G.** La grande flore en couleur. Paris: Belin.1990.

- Bourgou S., Ksouri R., Bellila A., Skandrani I., Falleh H., Marzouk B.** Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* . shoots and roots. Comptes Rendus Biologies. 2008; 331: 48-55.
- Bouitbir J.** Chapitre 3 : Stress oxydant. Les études des effets des statines sur la fonction mitochondriale des muscles cardiaques et squelettiques. Ed, Université de Strasbourg. 2010 ; P 45-61.
- Bovoriz A., Chance B.** The mitochondria generation of hydrogen peroxide. General properties of hyperbaric oxygen. J Biochem. 1993 ;134: 707-716.
- Burits M., Bucar F.** Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. Phytother research. 2000;14: 323-328.

C

- Cadet J., Bellon S., Berger M., Bourdat AG., Douki T., DuarteV., Frelon S., Gasparutto D., Muller E., Ravanat JL., Sauvaigo S.** Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases, Biol Chem. 2002.
- Cheick Traore M.** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de quelques plantes utilisées dans le traitement traditionnel de la dysménorrhée au Mali. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako .2006 ; 72p.
- Colette E.** Etude phytochimique et pharmacologique de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Thèse de doctorat en Pharmacie. Université de Bamako .2003; 147 P.
- Cseke LJ., Kaufman PB., Kirakosyan A.** The Biology of Essential Oils in the Pollination of Flowers. Natural product communications. 2007 ; 2 :1317-1336.

D

- Daum-Badouard. C.** Chapitre 1 : Le stress oxydant. Les lésions des acides nucléiques : détection par CLHP-SM/SM dans les milieux biologiques humains et intérêt comme biomarqueurs du stress oxydant et de l'inflammation. Ed, Université Joseph Fourier-Grenoble.2006; p 13.
- **Densiov ET., Afanas'ev IB.** IN: Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology. Eds: Taylor & Francis Group (U.S.A), .2005;pp: 703-861.
- **Dikalov S., Griendling KK., Harrison DG.** Measurement of reactive oxygen

species in cardiovascular studies. *Hypertension*. 2007; 49 : 717-727.

- **Dominiczak A., Lazar D., Das A., Bohr D.** Lipid Bilayer in genetic Hypertension. *Hypertension*.1991; 18, p. 748-757.

E

- **E1-Dakhakhny M., Madi N J., Lember N., Ammon H P T.** (2002). *Nigella sativa* oil, nigellone and derived thymoquinone inhibit synthesis of 5-lipoxygenase products in polymorphonuclear leukocytes from rats. *J Ethnopharmacol*. 2002; **81**: 161-164.
- El-Demerdash FM., Dewer Y., Elmazoudy RH., Attia AA.** Kidney antioxidant status, biochemical parameters and histopathological changes induced by methomyl in CD-1 mice. *Experiment and Toxicol Path.*2013; 65: 897-901.
- Elise Portes.** Synthèse et Etudes de Tétrahydrocurcuminoïdes : Propriétés Photochimiques et Antioxydante, Applications à la Préservation de Matériaux d'origine Naturelle. These présentée pour obtenir le grade de docteur. l'université de Bordeaux. 2008.
- **El-Mahmoudy A., Matsuyama H., Borgan M A., Shimizu Y., El-Sayed M G., Minamoto N., Takewaki T.** Thymoquinone suppresses expression of inducible nitric oxide synthase in rat macrophages. *Inter Immunopharmacol*. 2002; 2: 1603–1611.
- **El-Obeid A., Al-Harbi S., Al-Jomah N., Hassib A.** Herbal melanin modulates tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 6 (IL-6) and vascular endothelial growth factor (VEGF) production. *Phytomedicine*.2006 ;13: 324–333

F

- **Fain O.** Carences en vitamine C. *La revue de médecine interne*.2004 ; 25 : 872–880.
- **Favier A.** Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel. *Thérapeutique. L'actualité Chimique* .2003 ;108-15.
- **Finaud J., Lac G & Filaire E.** Oxidative Stress. Relationship with Exercise and Training. *J Sports med*. 2006 ;36 (4): 327-58.

G

- Gardès A., Monique Bonnefont-Rousselot D., Zohreh A., Jore D.** Espèces réactives de l'oxygène. *J Mécanismes biochim*.2003 ; p 91-95.

- GHEDIRA K.** La Nigelle cultivée : *Nigella sativa*. (Ranunculaceae). Phytotherapie . 2006 ; 4, 1-7.
- **Ghedira K., Le Jeune R.** Huile de nigelle cultivée *Nigella sativa* . (Ranunculaceae). Phytothérapie. 2010; 8: 124–128.
- **Gilani A H., Jabeen Q., Khan M A U.** A review of medicinal uses and pharmacological activities of *Nigella sativa*. Pakistan J of Biol Science 2004 ; 7: 441-451
- Goudable J., Favier A.** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. Nutrition Clinique et Métabolisme. 1997 ;11: 115-20.
- **GREENISH H.** Contribution to the Chemistry of *Nigella sativa* (Vol. 10). Pharmacol J Trans.1880.
- **Gutteridge JM.** Free radicals in disease processes: a complication of cause and consequence. Free radical research communications.1993; 19: 141-158.
- Guignard J L.** In Botanique systématique moléculaire.12ème Edition Masson (Paris).2001; 304.

H

- Hajhashemi V., Ghannadi A., Jafarabadi H.** Black cumin seed essential oil, as a potent analgesic and antiinflammatory drug. Phytother Research. 2004; 18: 195-199.
- **Haleng J ., Pincemail ., Defraigne JO., Harlier CC ., Chapelle JP.** Le stress oxydant. J Med Liege. 2007; 62: 628-638.
- Halliwell B.** Antioxidants and human disease: a general introduction. Nutr Rev.1997; 55: S44-9.
- Halliwell B., Whiteman M.** Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. British J of pharmacol.2004; 142: 31-32
- **Halliwell B., Gutteridge J M.** Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University press.2007.
- **Hamrouni-Sellami I., Kchouk ME., Marzouk B.** Lipid and aroma composition of black cumin (*Nigella sativa*) seeds from Tunisia. J Food and Biochem. 2008; 32: 335-352.
- **Hanafy M S., Hatem M E.** Studies on the antimicrobial activity of *Nigella sativa* seed (black cumin). J of Ethnopharmacol.1999; 34: 275–8.

- **Hashim F., El-Kiey M.** *Nigella sativa* seeds of Egypt. J Pharm Sci UAR.1982; (3), 121-133.
- Hawssawi Z., Ali BA., Basoma AO.** Effect of *Nigella Sativa* (Black seed) and thymoquinone on blood glucose in albino rats. Annals of Saudi medicine. Med.2001; 21:242-244.
- **Heiss A., Matthias Kropf., Susanne Sontag., Anton Weber.** Seed morphology of *Nigella sativa*.L. (ranunculaceae): Identification, diagnostic traits, and their potential phylogenetic relevance. Inter J Plant Sciences. 2011; 172(2):267–28
- **Hildebrand DH., Terao J., Kito M.** Phospholipids plus tocopherols increase soybean oil stability. J American Oil Chem Soc. 1984; 61: 552-525.
- **Hodek P., Trefil P., Stiborova M.** Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. Chemico-Biological Interactions. 2002;139: 1-21.
- **Houghton P J., Zarka R., De Las Heras B., Hoult JR.** Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. Planta Medica.1995; 61: 33-36.
- **Hudson B.JF. Lewis JI.** Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible oils: Phospholipids as synergists. Food Chem. 1983; 10: 111-120.

I

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

K

- Kamal-Eldin A., Appelqvist LA.** The chemistry and antioxydant properties of tocopherols and tocotrienols. Lipids, 1996, 31: 671-701.
- **Khader M., Bergsen N., Eckel PM.** In vitro toxicological proprieties of thymoquinone. Food Chemi and toxicol. 2009; 47: 129-133.
- **Khan M A., Ashfaq M K., Zuberi H S., Mahmood M S., Gilani A H.** The in vivo antifungal activity of the aqueous extract from *Nigella sativa* seeds. Phytotherapy Research.2003; 17:183– 186.

- Knight JA.** Free radical, antioxidants, aging, & disease. Washington D.C.: AACC press. 1999; 20: 21-43.
- **Koechlin-Ramonatxo C.** Oxygen , oxidative stress and antioxidant supplementation , or an other way for nutrition in respiratory diseases. Nutrition clinique et métabolique. 2006; 20:165-177
- Kohen R., Nyska A.** Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. Toxicol Path. 2002; 30: 620-650.
- **Kökçil G., Yilmaz H.** Analysis of the fixed oils of the genus *Nigella*. (*Ranunculaceae*) in Turkey. Biochem System and Ecol. 2005 ; 33: 1203-1209.

L

- **Lavoie ME.** Inflammation, stress oxydant, profil métabolique : influence des apports alimentaires et de la dépense énergétique. Ed, Université de Montréal. 2012 ; P 27-36.
- Lehucher-Michel MP., Lesgards JF., Delubac O., Stocker P., Durand P., Prost M.** Stress oxydant et pathologies humaines. La presse medicale. 2001; 30 :1076-1081.
- **Lenzi F.** Chapitre 1: Le Stress Oxydant Cellulaire. Contribution à l'étude du stress oxydant cellulaire chez le chien de traîneau en course de sprint. Ed, Université Vetagro Supcampus Veterinaire de Lyon. 2011 ;P 25-56.
- Li HB., Cheng KW., Wong CC., Fan KW., Chen F., Jiang Y.** Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. Food chem. 2007; 102: 771-776.

M

- **Maffei ME.** Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. South African J of Botany. 2010; 76:612-631.
- **Mahfouz M., Abdel-Maguid R., El-Dakhakhny M.** The effect of "Nigellone-Therapy" on the histaminopexic power of the blood sera of asthmatic patients. Arzneimittel-Forsch. Drug Research. 1965; 15: 1230-31.
- **Mansour M., Tornhamre S.** Inhibition of 5-lipoxygenase and leukotriene C4 synthase in human blood cells by thymoquinone. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. 2004; 19: 431-436.

- **Martin G., Duez H., Blanquart C., Poulain P., Fruchart J.** Statin-induced inhibition of the Rho-signaling pathway activates PPARalpha and induces HDL apoA-I. *J Clin Invest* .2001; 107: 1423-1432.
- Martin HM., Hancock JT., Vyv Salisbury Harrison R.** Role of Xanthin Oxido reductase as an Antimicrobial Agent. *Infection and Immun.* 2004; 72: 4933-4939.
- **Mashhadian N V., Rakhshandeh H.** Antibacterial and antifungal effects of *nigella sativa* extracts against s. Aureus,P. Aeroginosa and c. Albicans. *Pakistan Journal of Medical Sciences.*2005; 21: 147-152.
- **Mates J M., Perez-Gomez C., Nunez de Castro I.** Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.*1999; 32: 595-603.
- **McCord JM.** Superoxide radical: Controversies, contradictions and paradoxes. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.*1995; 202: 112-117.
- McVean M., Kramer-Stichland k., Liebler DC.** Oxidants and antioxidants in ultravioletinduced nonmelanoma skin cancer.In: Papas AM,editor. *Antioxidant status,diet,nutrition,andhealth.*Boca Raton,Fla.:CRC Press.1999; P401-30.
- **Mohammedi Z.** Etude Phytochimique et Activités Biologiquesde quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie .Thèse de Doctorat en Biologie, Université Abou beker , Tlemcen Algerie .2013.
- **Moller P., Wallin H., Knudsen L E.** Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chem Biollnteraet.* 1996; 102: 17-36.
- Morikawa, T., Xu F., Kashima Y., Matsuda H., Ninomiya K., Yoshikawa M.** Novel dollabellane-type diterpene alkaloids with lipid metabolism promoting activities from the seeds of *Nigella sativa*. *Organic Letters.*2004a; 6: 869-872.
- Morikawa T., Xu F., Ninomiya K., Matsuda H., Yoshikawa M.** Nigellamines A3,A4, A5 and C, new dolabellane-type diterpene alkaloids, with lipid metabolism promoting activities from the Egyptian medicinal food black cumin. *Chem & pharma bulletin.*2004b; 52: 494-497.
- **Morsi NM.** Antimicrobial effect of crude extracts of *Nigella sativa* on multiple antibiotics-resistant bacteria. *Acta Microbio Polon ica.*2000; 49: 63–74.
- **Murray ., Bender., Bothan ., Kennely ., Rodwell., Weil.** Sujets spéciaux. *Biochimie de Harper*, 5eme édition. Ed, De boeck. Paris.2013; P 561-566.

N

- **Nair M K M., Vasudevan P., Venkitanarayanan.** KAntibacterial effect of black seed oil on *Listeria monocytogenes*. *Food Control*.2005; 16: 395-398.
- **Nickavar B., Mojaba F., Javidniab K., Amolia MAR.** Chemical composition of the fixed and volatile oils of *Nigella sativa* . from Iran. *J of bioscien*.2003; 58: 9-10.

P

- Pal Yu B.** Cellular defences against damage from reactive oxygen species. *Physiopathological Reviews*.1994; 74: 139-155.
- Papas AM.** Determinants of antioxidant status in humans.In :Papas AM,editor.Antioxidant status,diet,nutrition,and health.Boca Raton,Fla.:CRC Press 1999a;30:21-36.
- Pastre J.** intérêt de la supplementation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. thèse pour le doctorat vétérinaire , l'université paul-sabatier de toulouse.2005.
- Pourmortazavi SM., Hajimirsadeghi SS.** Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of Chromatograph A*.2007; 1163:2–24.
- Powers S., Jackson M.** Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *A Physiol Rev*. 2008; 88: 1243-1276.
- **Prasad KN., Yang B., Dong X., Jiang G., Zhang H., Xie H.** Flavonoid contents and antioxidant activities from *Cinnamomum* species. *Innov Food Scie and Emerging Technol*. 2009; 10: 627-632.

R

- **Raj Kapoor B., Anandan A., Jayakar B.** Anti-ulcer effect of *Nigella sativa*. against gastric ulcers in rats. *Current Science*.2002; 82: 177-179.
- Ramadan MF., Mörsel JT.** Characterization of phospholipid composition of black cumin (*Nigella sativa*) seed oil. *Nahrung/Food*. 2002a; 46:240-244.
- **Ramadan MF., Morsel TJ.** Analysis of glycolipids from black cumin (*Nigella sativa*), coriander (*Coriandrum sativum* L.) and niger (*Guizotia abyssinica* cass.) oil seeds. *Food Chem* . 2003; 80: 197-204.

- Reichl FX.** cuide pratique de toxicologie 2 edition : partietoxicologie spécifique.2010 ; 148-149.
- Robineau P., Mercier T.** Quelle évaluation pour les produits phytopharmaceutique which assessment for plant protection products. Archiv des Maldies Professionnelles et de l'Environnement.2012 ;6 :927-933.

S

- **Salem M L.** Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. Seed. Inter Immunopharmacol.2005; 5: 1749-1770.
- Sanchez-Moreno, C.** Methods used to evaluate the free radical scavengingactivity in foods and biological systems. International J of Food Science andTechnol.2002; 8: 121-137.
- **Sayre L M., Moreira P I ., Smith M A ., Perry G.** Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease. J Ann Ist Super Sanità.2008; 41: 143-164.
- Seidle.T., Robinson S., Holmes T.et al.** Cross-sector review of drivers and available 3Rs approaches for acute systemic toxicity testing.Tox.Sci.2010.
- Skulachev V P.** Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascade.FEBS Lett . 1998; 423 : 275- 280.
- **Sorg O.** Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. Compt Rendus Biologies.2004; 327: 649-662.
- Stief TW.** The physiology and pharmacology of singlet oxygen.Med Hyopth. 2003; 60:567-72.
- **Sultan MT., Butt MS., Anjumi FM., Jamil A., Akhtar S., NasirM.** Nutritional profile of indigenous cultivar of black cumin seeds and antioxidant potential of its fixed and essential oil. Pakistan J of Botany.2009; 41: 1321-1330.
- **Swamy S M., Huat B T.** Intracellular glutathione depletion and reactive oxygen species generation are important in alpha-hederininduced apoptosis of P388 cells. Mol Cel Biochem.2003; 245: 127-139.
- **Swamy SM., Tan BK.** Cytotoxic and immunopotentiating effects of ethanolic extract of *Nigella sativa* . seeds. J Ethnopharmacol. 2000; 70 : 1-7.

T

-**Tenekoon KH., Jeevathayaparan S., Kurukulasooriya AP., Karunanayake EH.** Possible hepatotoxicity of *Nigella sativa* seeds and *Dregea volubilis* leaves. J Ethnopharmacol. 1991; 31: 283–9, 1991

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

U

- **Üstun G., Kent L., Cekin N., Civelekoglu H.** Investigation of the technological properties of *Nigella sativa* (Black Cumin) Seed Oil. J American Oil Chemists' Society.1990; 67: 958-960.

V

- **Valko, M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M T D., Mazur M., Telser J.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Biocell.2007; 39: 44-84.

- **Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M.** Free radical s, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-biological interactions.2006; 160: 1-40.

W

- <http://www.nature-algues.com>

-<https://www.la-famille-des-radicaux-libres.html>

Z

- **Zahoor A., Ghafoor A., Aslam M.** *Nigella sativa*: A potential commodity in crop diversification traditionally used in healthcare.In introduction of medicinal herbs and spices as crops. Ministry of Food , Agricul and Livestock, Pakistan. 2004; 5-31.

-**Zaoui A., Cherrah Y., Mahassini N., Alaoui K., Amarouch H., Hassar M.** Acute and chronic toxicity of *Nigella sativa* fixed oil.Phytomedicine .2002b ; 9, 69-74.

Résumé

Ce travail de recherche a pour but d'estimer l'activité antioxydante de l'huile totale et de la fraction neutre des graines de *Nigella sativa*. Nous avons commencé le travail par l'extraction et le fractionnement de l'huile totale de graines de *Nigella sativa*. Le rendement obtenu de l'huile totale (HT) est de 25.45 ± 3.5 % des graines et le rendement obtenu de la fraction neutre (FN) est de 95.30 ± 0.6 % de l'huile totale.

Ensuite nous avons déterminé la teneur en polyphénols et en flavonoïdes pour les deux extraits. Le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes de HT et la FN est effectué par les méthodes de folin-ciocalteu et de trichlorure d'aluminium respectivement, où les teneurs en polyphénols sont 26.44 ± 0.21 et 16.66 ± 0.48 (EAG $\mu\text{g/g}$ extrait) pour HT et FN respectivement. Pour les flavonoïdes les teneurs sont 1.34 ± 0.21 et 0.59 ± 0.06 (EQ $\mu\text{g/g}$ extrait) pour HT et FN respectivement.

L'évaluation du pouvoir piégeur de ces extraits *vis-à-vis* le radical DPPH montre que l'HT est plus actif par rapport à la FN, avec des IC_{50} de l'ordre de 83.03 ± 4.58 mg/ml et 140.95 ± 3.63 mg/ml respectivement.

De même, le test du pouvoir réducteur a montrés que l'HT présente la meilleure capacité avec une EC_{50} de 85.93 mg/ml suivi par la fraction FN avec 141.15 mg/ml.

D'après les résultats obtenus dans ce travail, on peut dire que les graines de *Nigella Sativa* possèdent une activité antioxydante considérable qui est localisée dans les huiles de cette plante et que l'huile totale possède la meilleure capacité antioxydante.

Mots clés : huile totale, fraction neutre, *Nigella Sativa*, activité antioxydant, Composés phénoliques.

Summary

This research work aims to estimate the total antioxidant activity of the total oil and the neutral fraction of *Nigella sativa* seeds. We started working with the extraction and fractionation of the total oil of *Nigella sativa* seeds. The yield obtained of the total oil (TO) is $25.45 \pm 3.5\%$ of the seeds and the yield of the neutral fraction (NF) is $95.30 \pm 0.6\%$ of the total oil.

Then we determined the content of polyphenols and flavonoids in both extracts. To determine the total phenols and flavonoids in TO and NF, we followed methods of Folin-Ciocalteu and aluminium trichloride respectively, where the polyphenol contents are 26.44 ± 0.21 and 16.66 ± 0.48 (EAG mg / g extract) for TO and NF respectively. For flavonoid contents the results were 1.34 ± 0.21 and 0.59 ± 0.06 (EQ mg / g extract) for TO and NF respectively.

The evaluation of trapping power of these extracts, we used the DPPH test, the results showed that TO is more active compared to the NF, with IC₅₀ of 83.03 ± 4.58 mg / ml and 140.95 ± 3.63 mg / ml respectively. Similarly, the test of the reducing power showed that the TO has the best ability with an EC₅₀ of 85.93 mg / ml followed by the NF with EC₅₀ of 141.15 mg / ml.

In the view of a sum up of these results addition, we can say that the seeds of *Nigella Sativa* have considerable antioxidant activity which is located in its oils and the total oil has the highest antioxidant capacity.

Key words : total oil, neutral fraction, *Nigella Sativa*, antioxidant activity, phenolic compound.

الملخص

هذا العمل البحثي يهدف إلى تقدير النشاطية المضادة للأكسدة للزيت الكلي والجزء المحايد المستخرج من بذور حبة البركة. بدأنا العمل باستخراج وتجزئة الزيت الكلي من بذور حبة البركة. المردود الذي تم الحصول عليه للزيت الكلي هو $25.45 \pm 3.5\%$ من البذور و مردود الجزء المحايد هو $95.30 \pm 0.6\%$ من مجموع الزيت الكلي.

ثم قمنا بتحديد محتوى البوليفينول والفلافونويد لهذه المستخلصات. الطرق التي اعتمدنا عليها في تحديد محتوى الفينول ومركبات الفلافونويد في الزيت الكلي والجزء المحايد هي أساليب فولين سيوكنتو و ثلاثي كلوريد الألمنيوم على التوالي، حيث محتويات البوليفينول هي 26.44 ± 0.21 و 16.66 ± 0.48 (ملغ EAG / غ المستخرج) للزيت الكلي والجزء المحايد على التوالي أما محتوى هذه المستخلصات من الفلافونويد فكانت 1.34 ± 0.21 و 0.59 ± 0.06 (ملغ EQ / غ المستخرج) على التوالي.

تقييم النشاطية المضادة لجذر DPPH للزيت الكلي والجزء المحايد أظهر أن الزيت الكلي هو أكثر نشاطا مقارنة مع الجزء المحايد ، حيث أن قيم IC50 هي 83.03 ± 4.58 ملغ / مل و 140.95 ± 3.63 ملغ / مل على التوالي. وبالمثل، أظهر اختبار القدرة الرجعية أن الزيت الكلي لديه قدرة أفضل مقارنة مع الجزء المحايد حيث أن قيم EC50 هي 85.93 ملغ / مل و 141.15 ملغ / مل على التوالي.

بالنظر إلى النتائج التي تم الحصول عليها في هذا العمل، يمكننا أن نقول أن بذور حبة البركة السوداء لها نشاط مضاد للأكسدة معتبر وهذا النشاط يتركز في الزيوت المستخلصة من بذور هذه النبتة.

الكلمات المفتاح: الزيت الكلي، الجزء المحايد، حبة البركة، النشاطية المضادة للأكسدة، المركبات الفينولية .



Étude de la relation : Evaluation de l'activité antioxydante des huiles des graines de
Nigella sativa

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en : **Biochimie**

Résumé

Ce travail de recherche a pour but d'estimer l'activité antioxydante de l'huile totale et de la fraction neutre des graines de *Nigella sativa*. Nous avons commencé le travail par l'extraction et le fractionnement de l'huile totale de graines de *Nigella sativa*. Le rendement obtenu de l'huile totale (HT) est de 25.45 ± 3.5 % des graines et le rendement obtenu de la fraction neutre (FN) est de 95.30 ± 0.6 % de l'huile totale.

Ensuite nous avons déterminé la teneur en polyphénols et en flavonoïdes pour les deux extraits. Le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes de HT et la FN est effectué par les méthodes de folin-ciocalteu et de trichlorure d'aluminium respectivement, où les teneurs en polyphénols sont 26.44 ± 0.21 et 16.66 ± 0.48 (EAG $\mu\text{g/g}$ extrait) pour HT et FN respectivement. Pour les flavonoïdes les teneurs sont 1.34 ± 0.21 et 0.59 ± 0.06 (EQ $\mu\text{g/g}$ extrait) pour HT et FN respectivement.

L'évaluation du pouvoir piégeur de ces extraits *vis-à-vis* le radical DPPH montre que l' HT est plus actif par rapport à la FN, avec des IC_{50} de l'ordre de 83.03 ± 4.58 mg/ml et 140.95 ± 3.63 mg/ml respectivement. De même, le test du pouvoir réducteur a montrés que l' HT présente la meilleure capacité avec une EC_{50} de 85.93 mg/ml suivi par la fraction FN avec 141.15 mg/ml.

D'après les résultats obtenus dans ce travail, on peut dire que les graines de *Nigella Sativa* possèdent une activité antioxydante considérable qui est localisée dans les huiles de cette plante et que l'huile totale possède la meilleure capacité antioxydante.

MOTS Clés : huile totale, fraction neutre, pouvoir piégeur, *Nigella Sativa*, activité antioxydant, Composés phénoliques.

Laboratoire de recherche : Laboratoire Centrale de Biochimie

Jury d'évaluation :

Président du jury : Pr. NECIB Youcef

M.C.B. Université Constantine 1.

Rapporteur : Dr. MOSBAH Asma

M.A.B. Université Constantine 1.

Examineur : Dr. HALMI

Sihem M.A.B. Université Constantine 1.

Date de soutenance : 29/06/2016