



بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine 1

Faculté des Sciences de la et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة

كلية علوم الطبيعة والحياة

Mémoire présenté pour l'obtention du Diplôme de Master

Spécialité : Biochimie Appliquée

Thème

Étude de l'activité antiradicalaire des fractions de l'huile totale de *Nigella sativa* L.

Présenté par :

- ✚ TRAIKI Karima
- ✚ BOUGHRARA Meriem Boutaina

Soutenu le: 17/07/2019

Devant le jury:

- ✚ Président du jury: Mm.MADI Aicha (Maître de conference B- UFM Constantine1)
- ✚ Rapporteur : Melle MOSBAH Asma (Maître de conference A- UFM Constantine1)
- ✚ Examineur : Melle. CHERFIA Radia (Maître assistante A- UFM Constantine 1)

Année universitaire 2018-2019



Remerciement



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 des **Frères Mentouri 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 permet de réaliser ce travail et son aide précieuse lors de la réalisation de la partie pratique.*

*Nous offrons nos plus sincères remerciements à l'examinatrice **CHERFIA Radia** 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 la présidente docteur **MADI Aicha** pour ses conseils. Nous remercions aussi l'enseignante **Radia** et tous les membres de le laboratoire de la biochimie et spécialement **Nabil, Houcine Et Madiha**. À la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université des **Frères Mentouri Constantine 1**.*

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



Dédicace



Je remercie ainsi je dédie tout d'abord mon dieu le tout puissant qui m'a donné la volonté, la force et le courage pour réaliser ce modeste travail.

*Je dédie ce travail à mes parents, surtout ma chère mère **Saliha**, ma source de tendresse, de volonté, de patience, de force et de courage malgré son incapacité parfois. De Et Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver t'accorder santé, longue vie et bonheur, Sans toi ma vie n'aurait pas gout.*

Merci MAMA.

*A mon cher père **Messaoud** : 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 qui tu as consentis pour mon éducation et ma formation,*

merci PAPA.

*A mes très chères sœurs **Hassiba**, **Amria** et **Nadia** qui m'ont donné de leur volonté et force pour continuer mes études, et pour ces efforts les plus intéressants pour aider moi d'arriver ou je suis. *Je t'aime.**

*A mes chers frères : **Fares**, **Achref** et surtout mon frère **youcef** qui m'ont soutenu durant tout mon cursus éducatif, *vous dire merci.**

Merci pour toute ma famille.

*A ma chère amie **Rahima** vous êtes non seulement mon amie mais vous êtes l'une de mes sœurs.*

*A tous mes amies sans acception surtout les amies d'étude au groupe de master **BZ** surtout **Soumia**, **Khaoula**, **Loubna**, **Racha***

*A ma binôme ma chère **Mimi** et son famille, on a passé des moments agréables et des autres aussi incroyables. Merci.*

A tous ceux qui m'aiment et a Tous ceux qui ont connus.

KARIMA





Dédicace

Je dédie ce travail à Dieu tout puissant, pour avoir guidé mes pas pour la réalisation de ce travail.

A ma chère mère « *Nassima* » ma source de vie, d'amour et de la tendresse 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.

A mon chère père « *YAZID* » ma sens de l'honneur et de la responsabilité 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 qui tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

*M*ercie d'avoir toujours avec moi, sans votre amour et votre soutien je ne serais jamais arrivé là où je suis. Je vous aime que Allah vous protège.

A mes chères frères *Amine, Sidou et Abd elmalek*

Je suis fière d'être ta sœur. Allah vous protège

A mon cher fiancé Haider

A ma chère amie Ranou

A toute ma famille sans exception

A tous mes amies sans acception surtout les amies d'étude au groupe de master *BA* de Mon promotion Mercie pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble.

A mon chère Binôme *Kami* qui a partagée avec moi les moments difficiles de ce travail et son famille.

A tous ceux qui m'aiment et à Tous ceux qui ont connus.



MERJEM

Liste des abréviations

$^1\text{O}_2$: Oxygène singulier

AA : Acides aminés

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AG : Acide Gras

AGPI : Acides Gras Polyinsaturés

ATP : Adénosine triphosphate

CAT : Catalase

CCl_4 : Tétrachlorométhane

CCM : Chromatographie sur couche mince

COX-1 : Cyclooxygénase-1

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

CPG-SM : Chromatographie en phase gazeuse - Spectrométrie de Masse.

Cu^{2+} : Ion de cuivre

cyt P450 : Cytochrome P450

DMSO : Diméthyle sulfoxyde

E. Coli : *Escherichia coli*

ERN : Espèces réactives de nitrogène

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

FAC : Fraction acétonique

FAC : Fraction de l'acide acétique

FCH : Fraction chloroformique

Fe : Fer

Fe^{2+} : Fer ferreux

Fe^{3+} : Fer ferrique

FMOH : Fraction méthanolique

G⁻ : Bactérie gram négative

G⁺ : Bactérie Gram Positive

GPx : Glutathion peroxydase

GR : Glutathion réductase

GSH : Glutathion

GSH : Glutathion Réduit.

GSSG : Glutathion-Disulfure

H₂O : Eau

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HE : Huile essentielle

HOCl : Acide hypochlorique

HPLC: High performance liquid chromatography

HT: Huile totale

IC50 : Concentrations inhibitrices médianes

IL-1 β : Interleukine-1beta

IL-3 : Interleukine-3

INF- γ : Interféron gamma

iNOS : Nitrique oxyde synthase inductible

KBrO₃ : Bromate de potassium

LDL : Lipoprotéines a faible densité/ low density lipoprotein en anglais

LT : Lymphocytes

LT₄ : lymphocytes T4

Mg : Magnésium

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Réduit

NBT : 4-Nitro-Bleu Tétrazolium

NO •: Monoxyde d'azote

NO: Oxyde d'azote

NO₂• : Dioxyde d'azote

NOS : Nitrique oxyde synthase

O₂•⁻ : Anion radicalaire superoxyde

O₂ : oxygène

OH• : Radical hydroxyle

ONOO⁻ : Peroxynitrite

PFG : Produits finaux de glycosylation

REL : Réticulum endoplasmique lisse

RL : Radical Libre

RMN : Résonance magnétique nucléaire

Sn : Sélénium

SOD: Superoxyde Dismutase

***t*-BHP** : tert-butylhydroperoxide

TNF- α : Tumor necrosis factor alpha

TQ : Thymoquinone

UV : Ultraviolet

XO : Xanthine oxydase

Zn : Zinc

Liste des figures

Figure 01 : Différentes espèces de Nigelle : <i>Nigella damascena</i> , <i>Nigella sativa</i> L.....	04
Figure 02 : structure des polyphénols de <i>Nigella sativa</i> L.....	09
Figure 03 : Origine des radicaux libres (http : //www. la-famille-des-radicaux-libres.html).....	20
Figure 04 : Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les EOR...	23
Figure 05 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules	24
Figure 06 : Trois étapes de la peroxydation lipidique.....	25
Figure 07 : L'oxydation des protéines après attaque radicalaire.....	25
Figure 08 : Pathologies associées aux espèces réactives	26
Figure 09 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants	27
Figure 10 : Schéma d'extraction de l'huile totale et de l'extrait méthanolique à partir des graines de <i>Nigella sativa</i> L.	31
Figure 11 : Fractionnement de l'huile totale par chromatographie sur colonne de gel de silice.....	32
Figure 12 : Courbes d'évaluation de l'effet scavenger des différentes fractions de l'anion superoxyde (O_2^{\bullet}).....	36-37
Figure 13 : Courbes d'évaluation de l'effet scavenger du radical hydroxyle (OH^{\bullet}).....	37-38
Figure 14 : Courbes d'évaluation de l'effet scavenger du peroxyde d'hydrogène H_2O_2	39

Liste des tableaux

Tableau 01 : Compositions des graines de <i>Nigella sativa</i> L. de différentes régions	06
Tableau 02 : Taux des lipides de l'huile fixe de <i>Nigella sativa</i> L. extraite par différentes Méthodes.....	10
Tableau 03 : Compositions des huiles fixes de <i>Nigella sativa</i> L. tunisienne, iranienne, égyptienne	11
Tableau 04 : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Nigella sativa</i> L.	12
Tableau 05 : Principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques.....	19
Tableau 06 : Les principales affections liées à la production des ERO.....	27
Tableau 07 : Systèmes de défense antioxydant.....	28-29
Tableau 08 : Rendement d'extraction et de fractionnement de l'HT des graines de <i>Nigella sativa</i> L.....	35
Tableau 09 : IC ₅₀ des différentes fractions pour les trois tests.....	36

SOMMAIRE

LA PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 01 : *Nigella sativa* L.

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....01-02

1. Généralités

1.1. Historique et utilisations traditionnelles.....03

2. Description botanique de la plante.....04-05

2.1. Classification systématique.....05

3. Composition phytochimique des graines.....06

3.1. Protéines.....06

3.2. Vitamines.....07

3.3. Sels minéraux..... 07

3.4. Métabolites secondaires..... 07

3.4.1. Alcaloïdes.....08

3.4.2. Composés phénoliques.....08

A. Flavonoïdes.....08-09

B. Isobenzofuranone.....09

C. Hydroxyacétophénone..... 09

3.4.3. Triterpènes saponines (saponoside).....09-10

4. Huiles de la plante

4.1. Huiles fixes..... 10-11

4.2. Huiles essentielles.....11-12

5. Activités pharmacologiques.....12-13

5.1. Activité anti-inflammatoire..... 13

5.2. Activité antidiabétique.....	13
5.3. Activité antioxydante.....	13
5.3.1. Étude in vivo.....	14
5.3.2. Étude in vitro.....	14
5.4. Effet sur le système immunitaire (propriétés immunomodulatrices).....	14-15
5.5. Propriétés antibactériennes	
A. De l'huile essentielle.....	15
B. De l'huile végétale.....	15-16
5.6. Effet anticancéreux et anti-tumoral.....	16
5.7. Effet de <i>Nigella sativa</i> L. sur le système gastro-intestinal.....	16
5.8. Effets sur le système respiratoire.....	17

Chapitre 02 : Stress oxydatif

*Introduction.....	18
1. Stress oxydatif	
1.1. Définition.....	18
1.1.1. Origine d'un stress oxydatif.....	18
2. Radicaux libres, espèces réactives en biologie et ses origines	
2.1 Définition.....	19
2.2. Origines des radicaux libres.....	19
2.2.1. Origines endogènes.....	19
- Mitochondrie.....	19
- Microsomes.....	19-20
- Cytosol.....	20
2.2.2. Origine exogène	
- Rayonnements UV.....	20
- Monoxyde d'azote (NO) et dioxyde d'azote (NO ₂).....	20
- L'alimentation.....	20
- Certains médicaments.....	20
3. Espèces réactives de l'oxygène (ERO).....	21
3.1. Différentes formes des ERO	

a. Radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$).....	21
b. Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).....	21
c. Radical hydroxyle (OH^{\bullet}).....	22
d. Monoxyde d'azote.....	22
e. l'oxygène singulier.....	22-23
f. Peroxynitrite ($OONO^{\bullet}$).....	23
4. Conséquences du stress oxydant et ses cibles biologiques.....	23
4.1. Dommages oxydatifs à l'ADN.....	24
4.2. Dommages oxydatifs aux lipides.....	24
4.3. Dommages oxydatifs aux protéines.....	25
4.4. Dommages oxydatifs aux glucides.....	26
5. Stress oxydatif et implication pathologiques des ERO.....	26
6. Système de défense antioxydant.....	27
6.1. Système antioxydant enzymatique et non enzymatique.....	28-29

LA PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 03 : Méthode de travail

1. Matériel

1.1. Matériel végétal.....	30
1.2. Réactifs chimique et matériel.....	30

2. Méthodes

2.1. Préparation de l'extrait méthanolique.....	30-31
2.2. Extraction de l'huile totale à froide.....	31
2.3. Fractionnement de l'huile totale par chromatographie sur colonne de gel de silice.....	31-32
2.4. Evaluation de l'effet scavenger.....	32-33
2.4.1. Evaluation de l'effet scavenger du radical hydroxyle (OH^{\bullet}).....	33
2.4.2. Evaluation de l'effet scavenger de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$).....	33-34
2.4.3. Evaluation de l'effet scavenger du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).....	34

Chapitre 04 : Résultats et discussion

1. Résultats

1.1. Rendement de l'extraction.....	35
1.2. Evaluation de l'effet scavenger de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$).....	36-37
1.3. Evaluation de l'effet scavenger du radical hydroxyle (OH^{\cdot}).....	37-38
1.4. Evaluation de l'effet scavenger du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).....	39-40
1.5. Différence entre l'effet scavenger de l'huile totale et ses fraction sur l' $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} et H_2O_2	40
2. Discussion générale.....	40-41
Conclusion et perspectives.....	42

Références bibliographiques

Résumé

Abstract

المخلص

INTRODUCTION

Le stress oxydant est un syndrome résultant d'un déséquilibre entre les systèmes de défense antioxydants et la production de radicaux libres (Sorg, 2004 ; Atamer et *al.*, 2008). Il peut avoir diverses origines ; déficit nutritionnel en antioxydants (Rolfe et Brown., 1997 ; Koppenol, 2001 ; Atamer et *al.*, 2008), surproduction endogène d'origine inflammatoire, exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (Favier, 2003). Il présente un état de dépassement des concentrations usuelles des radicaux libres. Ce déséquilibre est une source majeure des différentes pathologies à l'échelle internationale.

Il est donc important pour le biologiste d'être capable de suivre ce phénomène, notamment afin d'évaluer l'efficacité des traitements antioxydants d'origine végétale par rapport aux d'autres traitements de nature chimique qui provoquent dans la majorité des cas des effets secondaires.

Ce travail cible l'évaluation de l'effet antioxydant des molécules naturelles à partir des plantes médicinales. Parmi ces plantes, *Nigella sativa* L. c'est l'une des plantes les plus utilisées à travers le monde. Les études récentes montrent des propriétés curatives prometteuses des différents extraits de cette plante (antitumorales (Awad, 2005), immunostimulantes (EL-Kadi et Kandil., 1987) et anti-oxydantes (Salem, 2005)).

De nombreuses recherches sur la phytochimie et la bio-activité de *Nigella sativa* L. ont confirmé ces propriétés qui sont dues en majorité aux huiles fixes et essentielles extraites. Dans ce contexte s'inscrit ce présent travail dont l'objectif essentiel est d'évaluer l'activité antioxydant de l'huile totale et de ces fractions des graines de *Nigella sativa* L. 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 la famille de cette plante renferme une brève présentation suivie d'une description botanique de cette famille, et du genre *Nigella*.

Dans le deuxième chapitre, nous aborderons le stress oxydant, sa définition ainsi qu'une mise au point sur les radicaux libres et les antioxydants dans la nature.

Dans le troisième chapitre nous exposerons les matériels et les méthodes relatives à nos travaux.

Enfin, le dernier chapitre, sera réservé aux résultats obtenus, aux discussions et interprétations concernant la teneur en composés ciblés et l'activité étudiée, suivis par une conclusion générale.

1. Généralités

1.1. Historique et utilisations traditionnelles

Nigella sativa L. est une plante de grand intérêt, surtout dans le monde Arabe, où elle est souvent mentionnée comme un médicament. Le chercheur musulman Al-Bîrunî (973-1048) a été rédigé un traité sur les premières origines des drogues indiennes et chinoises ; il a été parlé de *Nigella sativa* L. tant que type de céréale.

Dans le système de médecine Greco Arabe ; les contemporains d'Hippocrate : Galien et Avicenne considèrent *Nigella sativa* L. comme un médicament précieux contre les troubles digestifs et hépatiques, et comme un bon stimulant. De point de vue d'Avicenne (980-1037), les graines *Nigella sativa* L. de montrée comme un bon stimulateur pour l'énergie du corps donc aident à récupérer de la fatigue et du découragement.

Depuis quelques années plusieurs publications scientifiques sont appartient régulièrement que ce soit pour l'étude des compositions des graines de *Nigella sativa* L. et de ses extraits, ou pour l'exploitation de champ de ses possibilités thérapeutiques et pharmacologiques. Les graines et l'huile qui en est extraite sont les deux parties de la plante les plus utilisées en médecine traditionnelle et les seules commercialisées en Europe (les graines l'étant pour un usage culinaire), mais les chercheurs beaucoup intéressés à l'activité de l'huile essentielle et de son composition majoritaire, la thymoquinone. Tous ces travaux nous permettrons de confirmer ou infirmer les utilisations traditionnelles de *Nigella sativa* L. dans les différentes pathologies (Ghedira, 2006).

En Algérie, *Nigella sativa* L. cultivée mélangée avec *Nigella damascena* ont été utilisée en cas de fièvre, d'algies dentaires, de maux de tête, et comme diurétique et emménagogue (Ghedira, 2006). Aussi, elle est utilisée dans les nausées, les gastralgies, vomissements et les coliques. Les graines sont écrasées puis sont utilisées comme une crème ou pommade contre les maladies rhumatismales, ou écrasées et prises dans l'eau, car elles seraient efficaces contre la constipation et les céphalées (Ghedira, 2006) (Figure 01).

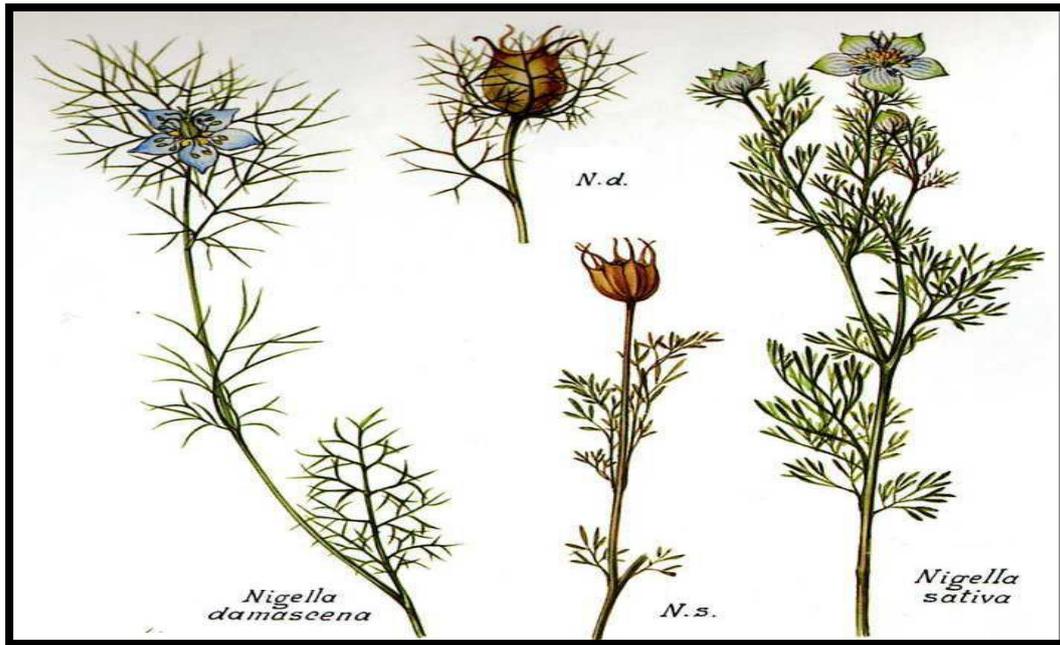


Figure 01 : Différentes espèces de Nigelle : *Nigella damascena*, *Nigella sativa* L.
(Bonnier et Douin., 1993)

2. Description botanique de la plante

La systématique est un domaine vaste et un sujet d'étude pour de nombreux botanistes, aussi qu'il existe plusieurs systèmes de classification qui sont utilisés longtemps, parmi ces systèmes celui d'Engler (1846-1930). Plus tard, celui de Bentham et Hooker (1862-1883), cette classification, qui n'est pas phylogénique, reste à l'heure actuelle très utilisée pour la classification des espèces végétales qui définissent des taxons, alors que le système récemment découvert celui de Hutchinson (1973) repose sur la subdivision des dicotylédones en deux grands phylums: les plantes herbacées et les plantes ligneuses puis chacun en ordre; dans ce système le genre *Nigella* appartient au phylum des herbacées qui comporte 28 ordres dont celui des Ranales (Ozenda, 2000 ; Judd et *al.*, 2002 ; Spichiger et *al.*, 2002). Parmi les plus grandes familles des Angiospermes on trouve la famille des Renonculacées qui comporte 40 à 50 genres et 1500 à 2000 espèces dont la plus part sont toxiques, elle est cosmopolite mais en particulier présente dans les régions froides et tempérées l'hémisphère nord (Bonnier, 1993).

Par enchainement les Renonculacées sont le type de la même famille, il fait partie des espèces avec des aspects variables, aussi que les espèces primitives sont plus différents à celle de type évolué avec des nombreux intermédiaires qui les relient entre elles (Guignard, 2001).

Le genre *Nigella* comporte plusieurs espèces différentes parmi les : *Nigella sativa* L. c'est l'espèce que nous intéresse, cette dernière se trouve rarement en France où il y a quatre espèces qui sont plus représentées parmi les : *Nigella damascena* L. qui est la plus courante ; elle est très souvent confondue avec *Nigella sativa* L. (Bonnier, 1993). *Nigella sativa* L. est une plante annuelle herbacée avec une hauteur qui atteint jusqu'à soixantaine de centimètres, leur tige est de caractère un peu dressée, rameuse, côtelée et anguleuse. Le système racinaire est une racine principale allongée et persistante, alors que leurs feuilles pennatiséquées sont divisées en lobes ou bien des segments étroites et un peu linéaires de façon qu'on peut dire lancéolées, elles présentent des onglets nectarifères. Elles s'apparentent à des pattes d'araignée ou bien au fenouil, c'est pour cela on les appelle des « fleurs de fenouil », cette plantes porte des petites feuilles inférieures de caractère pétaloïdes alors que les autres sont supérieures et longues. Elles sont disposées en face à face (Moussaoui, 2013).

La floraison se fait pendant une durée plus précise à partir du mois d'avril jusqu'à aout, leurs fleurs sont délicates et sensibles, actinomorphes comporte le calice : il est régulier de couleur blanche, veinées de vert à bleu pâle, contient de cinq septales pétaloïdes avec une mesure de 20 à 35mm de diamètre, ses fleurs sont solitaires, axillaires et terminales (Moussaoui, 2013). Le fruit présente une capsule globuleuse, formée de 3 à 6 carpelles qui sont jusqu'à la base reliées entre eux. Chaque capsule contient plusieurs graines de forme de triangle de couleur blanche noircissent à maturité, après exposés à l'air (Bonnier et Douin., 1993; Moussaoui, 2013).

2.1. Classification systématique (Guignard, 2001).

Sous règne : Cormophytes.

Supera embranchement : Rhizophytes.

Embranchement : Spermaphytes.

Sous-embranchement : Angiospermes.

Classe : Dicotylédones.

Sous-classe : Dialypétales.

Série : Thalamiflores.

Ordre : Rénales.

Famille : Renonculacées.

Tribu : Helléborées.

Genre : *Nigella*.

Espèce : *Nigella sativa* L.

3. Composition phytochimique des graines

Les plantes de la famille des Renonculacées et notamment l'espèce *Nigella sativa* L. ont bénéficié de nombreuses études phytochimiques effectuées pour la détermination des différents composés chimique et les principes actifs des graines de *Nigella sativa* L. Ces études 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 (Aksoy et al., 2001 ; Atta, 2003 ; Cheikh-Rouhou et al., 2007) (Tableau 01).

Tableau 01 : Compositions des graines de *Nigella sativa* L. de différentes régions

Constituants	<i>Nigella sativa</i> L. Tunisienne (Cheikh-Rouhou et al., 2007).	<i>Nigella sativa</i> L. Iranienne (Cheikh-Rouhou et al., 2007).	<i>Nigella sativa</i> L. Egyptienne (Atta, 2003).	<i>Nigella sativa</i> L. Turquie (Aksoy et al., 2001).
Protéines	26,70%	22,60%	20,80%	14.10 à 26.40%
Matière grasse	28,48%	40,35%	34,80%	28,60 à 42,50%
Humidité	08,65%	04,08%	07%	06,40 à 09,40%
Cendres	04,86%	04,41%	03,70%	02,40 à 07,80%
Carbohydrates	31,31%	28,65%	33,70%	12,40 à 30,80%
Fibres	Inconnu	Inconnu	inconnu	04,60 à 11,90%

3.1. Protéines

Les graines de *Nigella sativa* L. sont très riche en protéines, ils contiennent en moyenne (20 à 26%). Après leur analyse, les chercheurs ont trouvé que les protéines des graines de *Nigella sativa* L. sont composées de 17 acides aminés (AA), dont 8 sont des AA essentiels. Quantitativement, l'AA majeur est l'acide glutamique (24,74%) (Al-Jassir, 1992 ; Salem, 2005 ; El-Obeïd et al., 2006), suivi par l'arginine, l'acide aspartique, la leucine et la glycine. La protéine la plus étudiée jusqu'à maintenant est la lipase qui catalyse les réactions de trans-estérification (Akova et Ustun., 2000 ; Tuter et al., 2003).

3.2. Vitamines

Après l'étude qui a été faite en Egypte sur la composition de *Nigella sativa* L. révèle un moyen important en vitamines B1, B2, B6 et B9 (Nergiz et Ötles., 2003). Une autre analyse s'effectue en 2002 qui étudie les vitamines liposolubles (A, D, E, K) des graines de *Nigella sativa* L. résulte l'identification de toutes les classes des tocophérols dans l'huile. Les tocophérols totaux constituent 0,05% de l'huile, et sont constitués majoritairement de l' α -tocophérol (48%) et du γ -tocophérol (28%) et d'autres 23 vitamines. Ces mêmes chercheurs ont pu également identifier par Ramadan et Morsel tel que ; la vitamine A (β -carotène) (0,05%) et la vitamine K1 (0,1%) (Ramadan et Mörsel., 2002).

3.1. Sels minéraux

Des analyses sur la composition minérale de la graine de *Nigella sativa* L. ont été réalisées par spectrophotométrie par absorption atomique sur des graines de provenance de 4 pays différents ; Inde (1 échantillon), Syrie (2 échantillons), Turquie (1 échantillon), Jordanie (1 échantillon) (Takruri et Dameh., 1998). Les valeurs obtenues pour chaque échantillon rapportées que sa teneur en potassium est importante (1.18 % de poids total de la graine) et que le calcium, le fer, le sodium représentent 0. 188, 0. 0575 et 0. 0853 % respectivement (Nergiz et Otles., 2003). Le sélénium a été représenté 0,13-0,20 mg/kg des graines (Al-Saleh et al., 2006). La graine de *Nigella sativa* L. présente un moyen important en fer, zinc et phosphore. Il est dommage que le magnésium n'ait pas été évalué.

3.4. Métabolites secondaires

Une des sources essentielles des végétaux réside dans leur capacité à reproduire des composés naturels et diversifiés. Plus des métabolites primaires (glucides, protéides, lipides), ils accumulent fréquemment des métabolites dits « secondaires » dont la fonction physiologique n'est pas toujours claire mais qui représente une origine importante des molécules utilisables par l'homme dans des domaines différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire.

3.4.1. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés azotés, basiques et organiques d'origine naturelle. Ils ont une structure complexe. Ils sont trouvés sous la forme soluble de sels ou sous celle de combinaison avec les tanins. Certains ont présentés des activités thérapeutiques à faibles concentrations, bien qu'ils soient très toxiques à fortes concentration. Plusieurs alcaloïdes ont été isolés à partir des graines de *Nigella sativa* L. les plus importants sont :

- la nigellicine, la nigellidine (Atta-ur-ahman et *al.*, 1985 ; Atta –ur-ahman et *al.*, 1995).
- l'isoquinonenigellimine et sa dérivée la nigellimine N-oxyde (Atta-ur-ahman et *al.*, 1985 ; Atta-ur-ahman et Zamnak., 1992).
- 8 alcaloïdes diterpéniques type-dolabellane, mis en évidence sous le nom de nigellamine A1, A2, B1.B2 (Morikawa et *al.*, 2004a). A3, A4, A5, C (Morikawa et *al.*, 2004b)

3.4.2. Composés phénoliques

Les polyphénols ou bien les composés phénoliques sont formés d'une grande famille des substances organiques comprenant les flavones, les flavonols, les auronnes, les chalcones et leurs hétérosides. Ils sont caractérisés, comme l'indique le nom, par la présence d'au moins deux groupes phénoliques qui sont liés avec des structures plus ou moins complexes, généralement de haut poids moléculaire.

A. Flavonoïdes

Parmi ces composés phénoliques on constate les flavonoïdes qui représentent une large gamme de composés naturels. Ils sont définis tant que des pigments des végétaux, donc ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles, aussi universellement présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles assurant la protection des tissus contre les effets indésirables des rayons ultraviolet (UV). Dans *Nigella sativa* L. on retrouve des hétérosides de flavonols (Merfort et *al.*, 1997 ; Bruneton, 1999). Les polyphénols de *Nigella sativa* L. sont les plus actifs pharmacologiquement. A partir de l'huile des graines, 4 constituants ont été isolés et identifiés structurellement par HPLC et RMN ; la thymoquinone (TQ), le

dithymoquinone, le thymohydroquinone et le thymol (Figure 02) (Gilani et al., 2004 ; Ghedira, 2006).

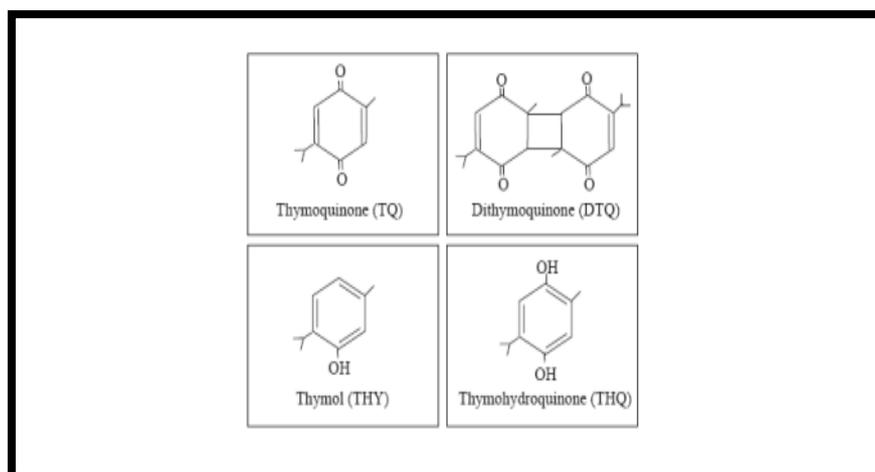


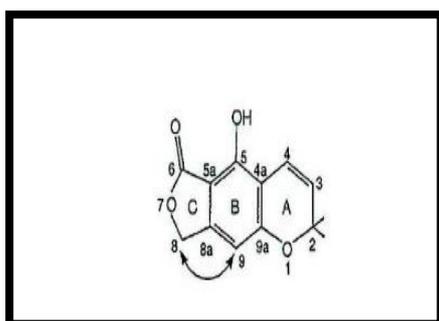
Figure 02 : structure des polyphénols de *Nigella sativa* L. (Salem, 2005)

B. Isobenzofuranone

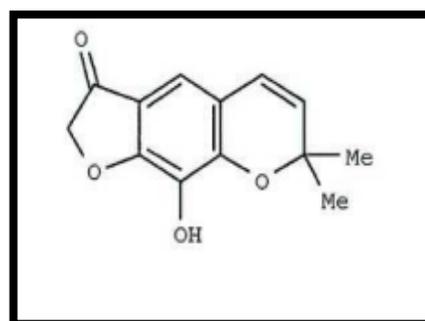
En 2001, ils ont trouvés un nouveau composé appartenant aux isobenzofuranone à partir d'une solution basique de graines dégraissées de *Nigella sativa* L. indiennes (Joshi et al., 2001).

C. Hydroxyacétophénone

Une étude en Egypte en 2001 découverte une nouvelle para-hydroxyacétophénone qui a été isolée à partir de graines de *Nigella sativa* L. (Dawidar et al., 2001).



Isobenzofuranone



Hydroxyacétophénone

3.4.3. Triterpènes saponines (saponoside)

Les saponosides sont formés d'une classe particulière de terpénoïdes, constituée des triterpènes ou de stérols. Ils sont largement distribués dans les végétaux. En 1880, il a été découvert d'après *Nigella sativa* L. une saponine nommée mélanthine (Greenish,

1880). Plusieurs saponosides ont été extraits dont la génine, l'hédéragénine et génine triterpénique. Ces derniers peuvent contenir 2, 3 ou 6 sucres.

4. Huiles de la plante

4.1. Huiles fixes

Dans certains cas, l'huile est dite huile fixe ou huile grasse. L'extraction se fait après broyage des graines par pression à froid ou à l'aide d'un solvant organique. Cette dernière se fait au Soxhlet (Harboune, 1998 ; Bruneton, 1999). Deux solvants sont utilisés : le n-hexane et un mélange chloroforme/méthanol (2 : 1 en volume). L'huile obtenue par pression à froid est de couleur jaune doré, alors que celle extraite par solvant est jaune brunâtre ; ceci serait dû à la capacité du solvant à extraire les pigments liposolubles et les oléorésines présentes dans les graines de *Nigella sativa* L. (Bassimatta, 2003). L'huile fixe représente 37,9 à 39,2% du poids de la graine. Elle est composée majoritairement de triacylglycérols (57,5 à 63,2%), une grande proportion d'acides gras libres : 8,3 à 14,2% (ceci à cause de la présence de lipase), 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% (Tableau 02).

Tableau 02 : Taux des lipides de l'huile fixe de *Nigella sativa* L. extraite par différentes Méthodes (Atta, 2003).

	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
- Stérols libres	03	05
- Inconnu	05,40	04,50
- Acides gras libres	14,20	08,30
- Triacyl-glycerol	57,50	63,20
- Stérols esters	02,50	04,40

L'huile de *Nigella sativa* L. ne contient que peu de tocophérols, comparée à d'autres huiles végétales. La particularité de l'huile de *Nigella sativa* L. est la présence de quinones : TQ, thymohydroquinone et d'un composé phénolique : le thymol. Ces

quinones sont les composés actifs de l'huile de *Nigella sativa* L. lui confèrent d'importantes propriétés pharmacologiques. Elles sont en outre des marqueurs de l'HE, la TQ étant parfois l'un des constituants majoritaires (Orsi-Ilinares, 2005). L'analyse quantitative et qualitative des huiles fixes de *Nigella sativa* L. cultivée dans différentes régions, montre que leur composition en acides gras est fortement influencée par les facteurs de l'environnement (sols, température, climat ...etc.). Des travaux effectués sur les huiles fixes de *Nigella sativa* L. d'origines iranienne, tunisienne et égyptienne (Tableau 03) montrent une variabilité des taux en différents acides gras. 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).

Tableau 03 : Compositions des huiles fixes de *Nigella sativa* L. tunisienne (Cheikh-Rouhou et al., 2007), iranienne (Nickavar et al., 2003 ; Cheikh-Rouhou et al., 2007) égyptienne (Atta, 2003)

Acides gras (AG)	<i>Nigella sativa</i> L. Tunisienne (Cheikh-Rouhou et al., 2007).	<i>Nigella sativa</i> L. iranienne (Nickavar et al., 2003; Cheikh-Rouhou et al., 2007)	<i>Nigella sativa</i> L. égyptienne (Atta, 2003).
AG saturés	22.70%	17 - 25.5%	24%
Acide myristique	0,35	0,40 – 0,50	09,80
Acide palmitique	17,20	12,50 – 18,40	09,90
Acide stéarique	02,84	03,40 – 03,70	03,30
Autres	02,12	02,80	01
AG insaturés	77,30%	74.8 – 82.5%	73,50%
Acide oléique	25	23,40 – 23,70	20,1
Acide linoléique	50,31	19,15 – 55,60	49
Autres	01,81	03,20	04,40

4.2. Huiles essentielles

L'HE de *Nigella sativa* L. a été obtenu par distillation à la vapeur d'eau de l'huile des graines broyées par première pression à froid. L'HE est récupéré dans l'éther éthylique qui est ensuite évaporé. L'HE de *Nigella sativa* L. représente entre 1,4-1,9% du poids de l'huile fixe et 0,18 à 0,50% du poids des graines (Benkacie et al., 2007). L'analyse de cette huile par Chromatographie en phase gazeuse - Spectrométrie de Masse (CPG-

SM) réalisée par l'équipe de Bucar (2000) a permis d'identifier 32 composants, dont la majorité d'entre eux sont : TQ (27,8%-57 %), p-cymène (7,07-15,83 %), carvacrol (5,8-11,6 %), longifolène (1,2-8 %), 4-terpinol (1,98-6,59 %), et le tanéthol (0,25- 4,28 %) (Burits et Bucar., 2000). Alors que l'étude d'HE des graines de *Nigella sativa* L. effectuée par l'équipe de Nickavar démontre que les composés majoritaires sont le trans-anéthol (38.3 %), p-cymène(14.8 %), limonène (4.3 %) et le carvone (4.0 %) (Nickavar et *al.*, 2003). Récemment, l'HE de *Nigella sativa* L. cultivée au Sahara algérien (Timimoune et Adrar), extraite par deux méthodes différentes ; l'hydrodistillation et distillation par micro-onde, cette dernière a été analysée par Chromatographie en phase gazeuse (CPG) et CPG-SM, 112 composants ont été identifiés et caractérisés, et le p-cymène représente le composé le plus abondant, suivi de la TQ (Benkacie et *al.*, 2007). L'HE des graines de *Nigella sativa* L. obtenue par hydrodistillation a été isolé avec un rendement élevé (0,84%). Les résultats analysés par CPG-SM indiquent que l'HE est principalement constituée de monoterpènes (Kazemi, 2015) (Tableau 04).

Tableau 04 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Nigella sativa* L. (kazemi, 2015)

Composants	%	Composants	%
α -Thujène	6	γ -Terpinène	5.12
α -Pinène	1.11	Terpinolène	0.23
Camphène	11	Camphor	1
Sabinène	1	Borneol	0.43
β -pinène	7	Carvone	0.32
β -myrcène	0.21	Thymoquinone	20.32
α -phellandrène	0.45	Thymol	10.12
Limonène	0.13	Carvacrol	10
p-Cymène	22.05	Longicyclène	0.9

5. Activités pharmacologiques

Pendant les dernières années et au cours de l'évolution et le développement scientifique, plusieurs études sont faites sur les plantes médicinales parmi les *Nigella sativa* L. notamment sur l'action de leurs extraits sur le plan cellulaire (*in vivo*) et sur le plan expérimentale (*in vitro*) afin de montrer et confirmer ces utilisations thérapeutiques. Les huiles de *Nigella sativa* L. ont été présentées comme des composants ayant des

différentes activités médicinales contre diverses pathologies ; elles sont utilisées comme traitement antidiabétique (Shabana et *al.*, 2013), antioxydant (Salem, 2005), anti-inflammatoire (E1-Dakhakhny et *al.*, 2002 ; Hajhashemi et *al.*, 2004), antibactérien et antifongique (Ali et Blunden, 2002), anti-cancéreux (Awad, 2005), aussi elles auront un effet stimulant du système immunitaire ...etc (Ghedira, 2010).

5.1. Activité anti-inflammatoire

Plusieurs études rapportent que la TQ est le principe actif de l'activité anti-inflammatoire des extraits de *Nigella sativa* L. la TQ s'est avérée être un puissant inhibiteur des leucotriènes B4 par inhibition enzymatique par le cyclooxygénase (COX) et lipooxygénase (E1-Dakhakhny et *al.*, 2002 ; Hajhashemi et *al.*, 2004). Alors que l'activité de l'huile fixe est plus intéressante que la TQ elle-même ; donc l'activité n'est pas entièrement due à la présence de la TQ. Des acides gras insaturés de type C20 : 2 semblent être impliqués (Houghton et *al.*, 1995 ; Gilani et *al.*, 2004).

5.2. Activité antidiabétique

Pour l'intéressante de l'effet de *Nigella sativa* L. sur les complications diabétiques, plusieurs études ont faites l'objet de leurs recherches, cependant, des résultats d'une étude réalisée ont été montré que *Nigella sativa* L. agit sur le diabète en réduisant le stress oxydatif, et en soutenant l'intégrité des cellules β pancréatiques (Shabana et *al.*, 2013). Elle pouvait agir aussi sur les paramètres déterminants comme les systèmes antioxydants enzymatiques notamment la superoxyde dismutase (SOD), ainsi que l'insulinémie et la glycémie (Adbelmeguid et *al.*, 2010 ; Alenzi et *al.*, 2010), en effet, en 1993, Al-Hader et ses collaborateurs ont réussi à monter l'effet hypoglycémiant de l'HE de *Nigella sativa* L.

5.3. Activité antioxydante

Plusieurs travaux et différentes études ont été réalisés pour évaluer l'activité antioxydante des graines de *Nigella sativa* L. et leurs constituants *in vivo* et *in vitro*.

5.3.1. Étude *in vivo*

L'activité antioxydant de *Nigella sativa* L. a été prouvé par l'utilisation du plusieurs model murin de l'hépatonephrotoxicité causée par le *tert*-butylhydroperoxide (*t*-BHP), tétrachlorure de carbone (CCl₄), KBrO₃ ...etc (Salem, 2005).

Parmi les causes d'un état de stress oxydant l'accumulation de l'homocystéine, alors l'administration des huiles de *Nigella sativa* L. et de la TQ chez des rats bloque leur accumulation (l'hyperhomocystéinémie) et induit par la transformation successive de la méthionine en homocystéine la protection contre la peroxydation lipidique et les changements du statut oxydatif (El-Saleh et al., 2004); ainsi, dans ce cadre-là, chez des lapins avec des complications oxydatifs du diabète ou bien diabète mellitus induit par l'alloxane *in vitro* et après un traitement de deux mois par l'extrait aqueux de *Nigella sativa* L. une amélioration de l'activité du système de défense antioxydant par l'augmentation du taux des antioxydants et aussi une protection contre la peroxydation des lipides (Meral et al., 2001).

5.3.2. Étude *in vitro*

Pour affirmer l'effet antioxydant de *Nigella sativa* L. l'HT et ainsi ses fractions sont mises en évidence par une rapide évaluation des taux des antioxydants en utilisant deux méthodes de CCM de criblage. En effet, en 2000, une étude réalisée a été mise en évidence l'activité anti-radicalaire de la thymoquinone et de la carvacrol, cette étude a été confirmée que ces composés ont une propriété scavenger des radicaux libres car ils neutralisent les radicaux hydroxyles dans la peroxydation lipidique non enzymatique, aussi l'essai de désoxyribose prouve que les fractions de l'HT de *Nigella sativa* L. inhibent la dégradation de désoxyribose par le radical hydroxyle (Burits et Bucar., 2000). Autre étude a été montrée que l'huile fixe a la capacité de piéger les radicaux libres par l'inhibition de la peroxydation lipidique dans les liposomes (Houghton et al., 1995). Par ailleurs, l'extrait méthanolique des graines de *Nigella sativa* L. montre un effet antioxydant vis-à-vis l'effet scavenger des hydroperoxydes lipidiques (acide linoléique) (Thippeswamy et Akhilender., 2005).

5.4. Effet sur le système immunitaire (propriétés immunomodulatrices)

En 1987, la première étude sur le sujet a été publiée après de prouver les propriétés immunomodulatrices de *Nigella sativa* L. *in vivo* sur les Lymphocytes LT (EL-Kadi et

Kandil., 1987), par la suite cette étude a été confirmée par Haq et ses collaborateurs, 1995, qui ont approuvé que les graines de *Nigella sativa* L. stimulent la production d'IL-3 aussi que augmentent la sécrétion de l'IL-1 β par les LT, cela entraînant l'activation des macrophages soit directement ou bien sous l'effet de l'IL-1 β . Ainsi que ces graines ont la capacité de stimuler la production de cytokines (TNF- α) et de provoquer la prolifération des LT en culture (Haq *et al.*, 1999), d'autre part, Salem et Hussain, 2000, ont montré aussi que *Nigella sativa* L. stimule la sécrétion de l'INF- γ ainsi que la prolifération des LT₄ et des macrophages *in vivo*.

En conclusion, *Nigella sativa* L. agira sur la réponse immunitaire spécifique, elle a diminuée la réponse immunitaire humorale et stimulée la réponse cellulaire (Islam *et al.*, 2004). Les effets de *Nigella sativa* L. Sur le système immunitaire ne sont pas élucidée totalement, jusqu'à maintenant juste le rôle immunomodulateur a été attribué.

5.5. Activité antibactérienne

A. De l'huile essentielle

Dans une étude qui a été effectuée sur différentes souches bactériennes sauf quelques souches de *Pseudomonas aeruginosa*, les résultats obtenaient permettre de montrer que l'HE de *Nigella sativa* L. inhibe la croissance cellulaire des bactéries Gram positives (G⁺) et négatives (G⁻) et ainsi que, les composés phénoliques présents dans cette huile seraient responsables de l'activité antibactérienne (Khan, 1999). Plus tard, autre recherche a été réalisée en utilisant la technique de diffusion sur disque pour tester la forte activité d'inhibition de l'HE de *Nigella sativa* L. diluée au centième *vis-à-vis* plusieurs bactéries parmi les *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (E.Coli), *Salmonella typhiet Vibriocholerae*, cette étude a été confirmée un effet plus fort sur les bactéries G⁺ (Ali et Blunden, 2002).

B. De l'huile végétale

En plus de l'HE, l'huile végétale de *Nigella sativa* L. possède aussi des propriétés antibactériennes, notamment dans la conservation des aliments, dans ce sens-là, des investigations ont été approuvées que l'utilisation de l'huile végétale de *Nigella sativa* L. dans la conservation des aliments à une teneur de 0,1% inhibe la croissance des micro-organismes (Khan, 1999). En 2005, une étude comparative entre l'huile de *Nigella sativa* L. et la gentamycine ainsi que une autre huile végétale a été réalisée en

vérifiant leur action sur 20 souches de *Listeria monocytogenes*. par diffusion sur disque, une activité antibactérienne plus forte a été remarquée chez l'huile de *Nigella sativa* L. sur toute les souches, un effet moins marqué a été observé pour la gentamycine, aucun effet a été surveillé chez l'huile végétale (Nair et *al.*, 2005).

5.6. Effet anticancéreux et anti-tumoral

L'activité anticancéreuse a également intéressé les chercheurs dans diverses études *in vivo* et *in vitro*, en étudiant et montrant l'effet de *Nigella sativa* L. sur des types des cellules cancéreuses ainsi que l'effet de l'HE et ses extraits et l'action cytotoxique sur les différents types tissulaires. En effet, les graines de *Nigella sativa* L. ou ses constituants montrent une activité préventive contre le cancer, il est aussi montré que l'HE diminue le potentiel de la fibrinolyse des cellules cancéreuses malignes (Awad, 2005).

D'après l'étude de Salomi et ses collaborateurs en 1992, L'extrait méthanolique brut obtenait à partir des graines de *Nigella sativa* L. a eu une faible cytotoxicité sur les LT normaux (cytotoxicité minimale) (Salomi et *al.*, 1992).

5.7. Effet de *Nigella sativa* L. sur le système gastro-intestinal

Depuis longtemps et notamment dans la médecine traditionnelle, les graines de *Nigella sativa* L. sont largement utilisées pour le traitement de désordres gastro-intestinaux, en effet, d'après une sécession des études les chercheurs, ils ont confirmé que l'administration de l'huile fixe de *Nigella sativa* L. durant deux semaines avec une moyenne de 0.88g/kg/jours provoque une baisse du niveau de l'histamine sans influencer l'acidité libre ni le suc gastrique, avec une élévation de la mucine gastrique et le contenu en GSH (EI-Dakhakhny et *al.*, 2000), par ailleurs, une autre étude a été mise en évidence l'effet gastro-intestinal de l'extrait aqueux des graines de *Nigella sativa* L. les résultats de cette étude ont approuvé qu'en cas d'ulcère provoqué par acétylsalicylique, cet extrait a permis la réduction de l' indice ulcéreuse de 32 à 36%, avec une diminution de l'activité peptique et la production d'acide chez les rats (Ghedira, 2006).

5.8. Effets sur le système respiratoire

Nigella sativa L. est représentée comme la plante médicinale la plus recommandée pour le traitement des pathologies respiratoires grâce à ses propriétés anti-tussives et antiasthmatique (effet bronchodilatateur) qui sont montrées par nombreuses études.

En 1993, El Tahir et ses collaborateurs ont réalisé une étude où l'effet de l'HE de *Nigella sativa* L. a mis en évidence, de façon dose dépendante, une augmentation du quotidien respiratoire et de la pression intratrachéal chez le cobaye a été observée (El Tahir et *al.*, 1993), en effet, d'autre étude a intéressé à l'effet de leur l'extrait brut méthanolique, après l'administration de cet extrait un effet spasmodique et bronchodilatateur, ainsi que un blocage des canaux calcique a été marqué (Gilani, 2001).

Chapitre 02 : stress oxydatif

Introduction

Sur le plan mondiale le stress oxydatif est classé parmi les problèmes les plus connus de la santé publique car il représente généralement la cause de la plupart des pathologies humaines, de nombreux arguments sont montrés que ce stress est dû principalement d'un déséquilibre dans le rapport oxydant/antioxydant c'est-à-dire un déséquilibre entre les systèmes de défenses et la production des radicaux libres (RL) ce qui entraîne des lésions biochimiques au niveau cellulaire avec des conséquences sur le plan moléculaire telles que les altérations au niveau des protéines, l'apparition de cassures au niveau de l'Acide Désoxyribonucléique (ADN), ou des atteintes de l'intégrité de la membrane cellulaire par l'induction de la peroxydation lipidique (Lenzi, 2011). L'oxygène (O₂) est un composé chimique essentiel pour les espèces multicellulaires car il joue un rôle très important dans la réaction d'oxydation de la matière organique. En effet, une certaine partie de cet composé est convertit en métabolite toxique par nos cellules, c'est qu'on appelle les RL. Au cours de l'évolution, la défense contre ces espèces activées de l'O₂ est capable d'agresser les substances qui sont indispensables pour la viabilité cellulaire, il y a aussi un équilibre entre les pro-oxydants et antioxydants au sein de l'organisme (Bartosz, 2003).

1. Stress oxydatif

1.1. Définition

Le stress oxydatif est une perturbation dans la balance métabolique d'un organisme ou d'une cellule d'un compartiment cellulaire, ou bien un déséquilibre entre les oxydants et le système de défense antioxydant soit par une élévation de production des oxydants et /ou diminution des défenses antioxydants (Sorg, 2004 ; Atamer *et al.*, 2008).

1.1.1. Origine d'un stress oxydatif

Le stress oxydatif a plusieurs origines différentes, il peut survenir de la superproduction endogène des agents pro-oxydants inflammatoires (la production successive des molécules réactives), un déficit nutritionnel ou bien alimentaire en antioxydants (Rolfe et Brown., 1997 ; Koppenol, 2001 ; Atamer *et al.*, 2008), exposition environnementale à des facteurs oxydants tel que le tabac, alcool, certains médicaments, les rayons gamma ou UV, l'intoxication par les métaux lourds toxiques (Pincemail *et al.*, 2002; Bartosz, 2003 ; Favier, 2003 ; Sorg, 2004 ; Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Chapitre 02 : stress oxydatif

2. Radicaux libres, espèces réactives en biologie et ses origines

2.1. Définition

Les RL sont des espèces chimiques (atome ou molécules) très réactive, possède un ou plusieurs électrons célibataires non apparié sur ses orbitales, ils sont très électrophiles (Lehucher-Michel *et al.*, 2001), ils ont une demi de vie courte (Afonso *et al.*, 2007). D'après Penna et ces collaborateurs, il existe deux types des espèces réactives, celles qui proviennent de l'O₂ sont nommées espèces réactives de l'oxygène (ERO), alors que les RL qui proviennent de l'azote (N) sont appelés espèces réactives de l'azote (ERN) (Penna *et al.*, 2009) (Tableau 05).

Tableau 05 : Principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques (Bartoscz., 2003)

Espèces radicalaires	Espèces non radicalaires
Anion superoxyde O ₂ ^{•-} Radical hydroxyle OH [•] Monoxyde d'azote NO [•]	Peroxyde d'hydrogène H ₂ O ₂ Acide hypochlorique HOCl Oxygène singulier ¹ O ₂ peroxynitrite ONOO ⁻

2.2. Origines des radicaux libres

Les facteurs responsables de l'augmentation de la production des RL par l'organisme sont appelés facteurs oxydants. Ils se subdivisent en deux facteurs endogènes et exogènes (Figure 03).

2.2.1. Origines endogènes

La production endogène des RL à lieu au niveau de plusieurs organites cellulaires, elle s'effectue par la production de l'anion radicalaire superoxyde (O₂^{•-}) par respiration.

- **Mitochondries**

C'est le principal organite de la production endogène des RL, elle utilise l'O₂ comme substrat afin de produire l'énergie nécessaire pour l'organisme sous forme d'ATP. Au cours de la respiration, la consommation de l'O₂ permet leur réduction en H₂O par le cytochrome respiratoire et la production d'O₂^{•-} et de H₂O₂ (Sturtz *et al.*, 2001).

- **Microsomes**

Au niveau des microsomes, l'activation de l'O₂ par le cytochrome P450 (cyt P450) entraînant la formation des RL pour assurer les biotransformations (Cai *et*

Chapitre 02 : stress oxydatif

Harrison., 2000).

- *cytosol*

Cette réaction nécessite le Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Réduit (NADPH) comme cofacteur et des enzymes telles que : la Xanthine oxydase (XO), NADPH oxydase dans les neutrophile et les enzymes de réticulum endoplasmique lisse (REL) (cytP450) (Cai et Harrison., 2000).

2.2.2. Origine exogène

- *Rayonnements UV*

Les radiations UV provoquent des dégâts au niveau de l'ADN, ils induisent la synthèse des RL dérivés de l'O₂ tels que (O₂^{•-}), (OH[•]), (¹O₂) (Sutherland et *al.*, 1980).

- *Monoxyde d'azote (NO) et dioxyde d'azote (NO₂)*

Ils sont formés par une enzyme qui est la Nitrique oxyde synthase (NOS). Ils sont des toxiques présents dans notre environnement (Moller et *al.*, 1996).

- *L'alimentation*

Les aliments riches en protéines et en lipides et alcool pouvant être un précurseurs de production des RL, donc ils ont une faible consommation des antioxydants (Hu et *al.*, 2006 ; Moller et *al.*, 1996). L'ingestion de l'alcool est suivie de la production des RL. La XO et l'aldéhyde oxydase peuvent oxyder l'acétaldéhyde dérivé de l'éthanol avec une formation d'O₂^{•-} (Robineau et Mercier., 2012).

- *Certains médicaments*

L'utilisation des médicaments comme un traitement anticancéreux provoque aussi la synthèse des RL (Moller et *al.*, 1996).

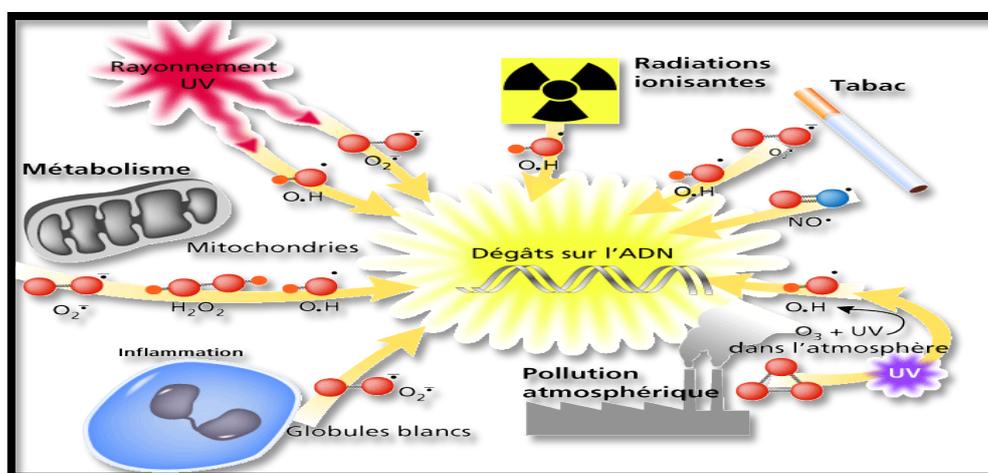


Figure 03 : Origine des radicaux libres (<http://www.la-famille-des-radicaux-libres.html>)

Chapitre 02 : stress oxydatif

3. Espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Ce groupe représente la classe importante des RL dans les systèmes vivants (Seifried et al., 2007), ils comprennent l' $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} et certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires tels que l' H_2O_2 et le ONOO (Bartosz, 2003 ; Halliwell et Whiteman., 2004).

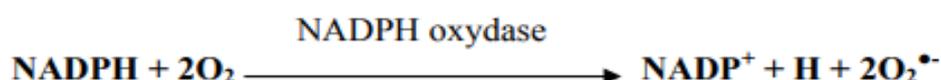
Différentes formes des ERO

- *Radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$)*

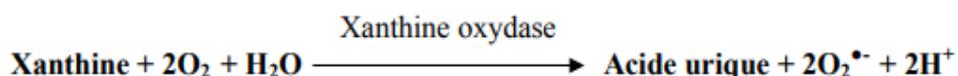
C'est un radical qui possède deux électrons non appariés, heureusement un blocage cinétique limite sa réactivité. Cependant, dans l'organisme, une partie de cet O_2 peut capter d'une manière univalente un électron conduisant à la production de l' $O_2^{\bullet-}$ (Koechlin-Ramonatxo, 2006).



Au niveau du complexe I (NADH /ubiquinone oxydoréductase) et du complexe III (ubiquinol /cytochrome coxydoréduction), la chaîne de transport d'électrons mitochondrial est représentée comme la source de ce radical (Bartosz, 2003 ; Chiarugi et Fiaschi., 2007).



Le système enzymatique xanthine/xanthine oxydase intervient aussi dans la production du superoxyde au cours de l'oxydation de la xanthine en acide urique selon la réaction suivante :



- *Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)*

Appelé aussi dioxyde, dihydrogène ou bien l'eau oxygénée (H_2O_2), il se forme par ladismutation spontanée ou enzymatique de l' $O_2^{\bullet-}$ (Pal Yu., 1994), cette réaction est catalysée principalement par le Superoxyde Dismutase (SOD).



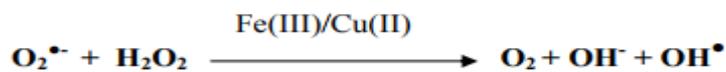
Chapitre 02 : stress oxydatif

- **Radical hydroxyle (OH^\bullet)**

Le radical hydroxyle (OH^\bullet) est produit par la dégradation du H_2O_2 en présence de métaux de transition sous leur forme réduite, ainsi H_2O_2 associé au fer ferreux (Fe^{+2}) conduit à la réaction de Fenton.



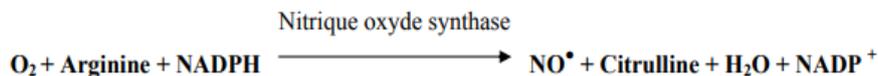
H_2O_2 peut interagir avec l' $\text{O}_2^{\bullet-}$ pour former l' OH^\bullet , selon la réaction d'Haber et Weiss (Sorg, 2004).



Il existe d'autres voies de la production de l' OH^\bullet parmi les ; la décomposition de l'acide peroxonitrique (ONOO^-) et la réaction de l'acide hypochloreux (HOCl) avec $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Bartosz, 2003).

- **Monoxyde d'azote**

Le monoxyde d'azote (NO^\bullet) est produit chez les organismes supérieurs par l'oxydation de l'un des atomes N terminaux de l'arginine, cette réaction est catalysée par la NOS (Sorg, 2004).

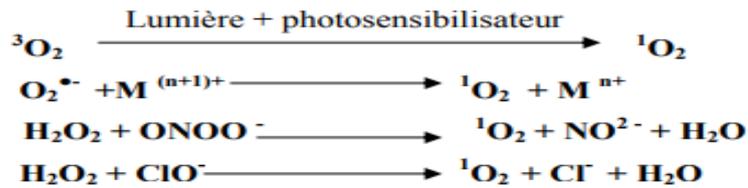


A forte concentration, le NO devient délétère pour les cellules en réagissant avec le $\text{O}_2^{\bullet-}$ pour former un puissant oxydant le ONOO^\bullet qui peut secondairement se décomposer en d'autres oxydants comme le NO_2 et le OH^\bullet (Densiov et Afanas'ev, 2005).

- **Oxygène singulier ($^1\text{O}_2$)**

Il fait partie des ERO. Il peut être formé par plusieurs voies d'oxydation incluant des enzymes telle que la peroxydase et la lipooxygénase (Sorg, 2004). Ce type d' O_2 est plutôt faible et non toxique pour les tissus des mammifères.

Chapitre 02 : stress oxydatif



- **Peroxynitrite (OONO⁻)**

Une interaction entre le NO[•] et l'O₂^{•-} conduit à la formation du peroxynitrite selon la réaction suivante :



L'OONO⁻ possédant une forte cytotoxicité, il cause surtout les lésions tissulaires, l'oxydation des Lipoprotéines a faible densité (LDL) (Halliwell, 1997), des protéines et des 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).

4. Conséquences du stress oxydatif et ses cibles biologiques

Les RL constituent des espèces hautement dangereuses, leur apparition provoque des dégâts cellulaires et tissulaires souvent irréversibles dont les principales cibles biologiques sont les lipides membranaires et l'ADN (Halliwell et Whiteman., 2004 ; Valko et al., 2006) et de manière moins importante les protéines et les glucides (Lenzi, 2011) (Figure 04).

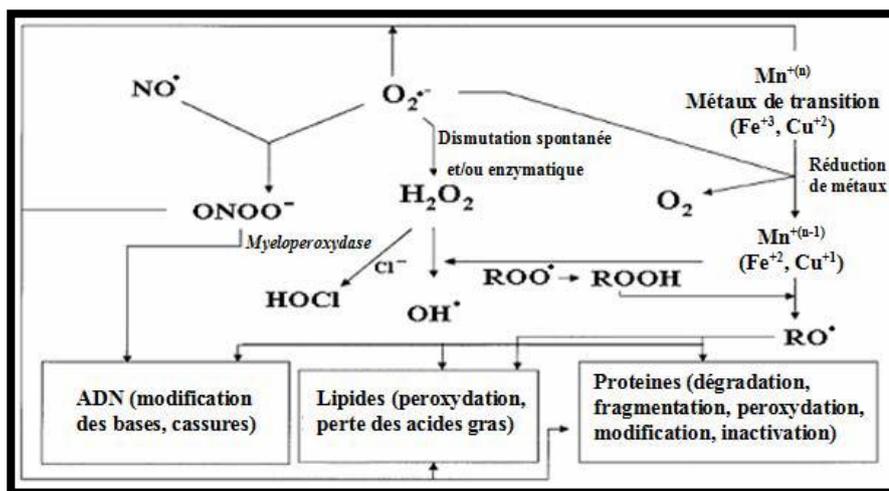


Figure 04 : Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les EOR (Kohen et Nyska., 2002)

Chapitre 02 : stress oxydatif

4.1. Dommages oxydatifs liés à l'ADN

C'est la cible majeure des ERO (Dizadaroglu et *al.*, 2002). Elles peuvent lui induire de nombreuses modifications covalentes telles des pontages avec des résidus protéiques (pontage cross-links) inter et intra brin ou des cassures simples ou doubles brin de la chaîne oligonucléotidique (Sorg, 2004).

Ces modifications peuvent avoir de graves conséquences sur la réplication du génome (Daum-Badouard, 2006 ; Haleng et *al.*, 2007) telles que l'altération des bases puriques, pyrimidiques et le désoxyribose qu'ils sont alors transformés en produits de fragmentations et en bases oxydées (Martinez-Cayuella, 1995) (Figure 05).

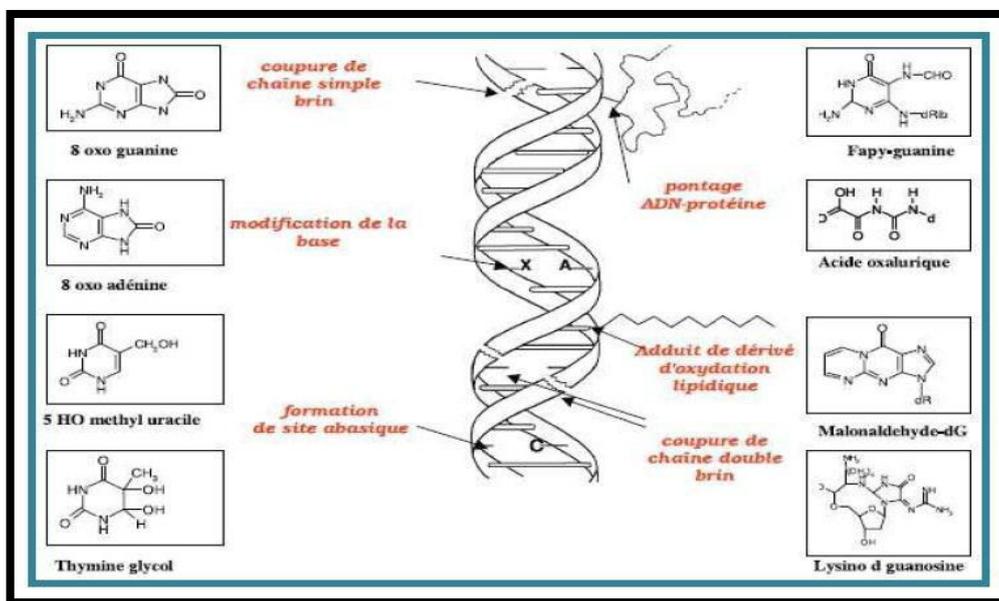


Figure 05 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (Favier, 2003)

4.2. Dommages oxydatifs liés aux lipides

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont la cible privilégiée des ERO. Ces derniers représentent les lipides majeurs des membranes cellulaires. Les produits formés de l'oxydation lipidique peuvent agir comme des composés toxiques responsables des dysfonctionnements et d'altérations cellulaires (baisse de la fluidité membranaire, privation d'AGPI, modulation de l'activité des enzymes) (Beckman et Ames., 1998 ; Lehucher-Michel, 2001).

La peroxydation lipidique, se déroule en trois phases ; l'initiation, la propagation et la terminaison (Martínez-Cayuella, 1995 ; Lehucher-Michel, 2001 ; Khohen et Nyska, 2002) (Figure 06).

Chapitre 02 : stress oxydatif

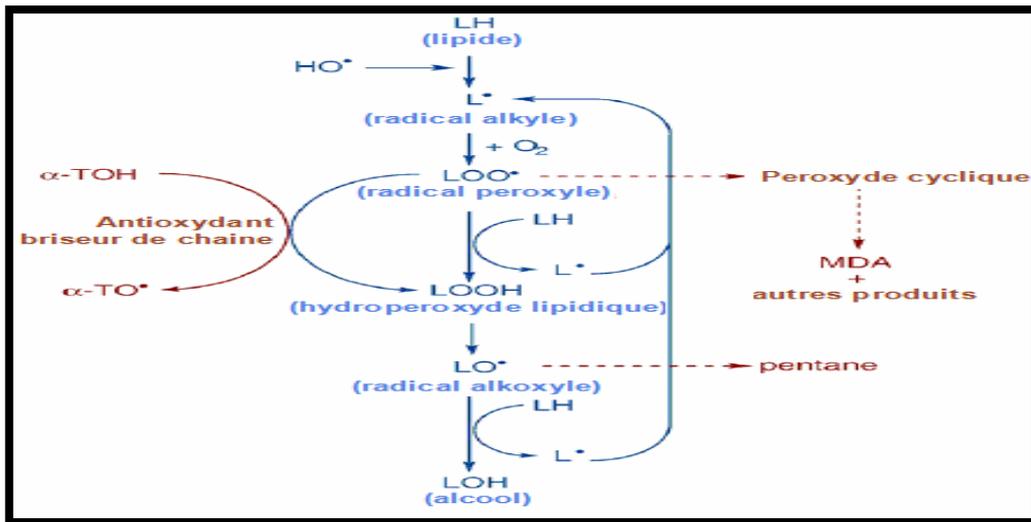


Figure 06 : Trois étapes de la peroxydation lipidique (D'après Sachdev et Davies, 2008)

4.3. Dommages oxydatifs liés aux protéines

Au cours du stress oxydant, les protéines subissent des modifications soit en présence de métaux de transition, soit sous l'action des RL (Halliwell et Gutteridge., 1990). Les AA des protéines sont la cible des ERO soit au niveau de leur chaîne latérale, soit au niveau de la liaison peptidique (Berlett et Stadtman., 1997). Ils causent la dénaturation des protéines par une altération des groupements thiols, formation de ponts disulfures, accentuation du caractère hydrophobe (Auberval, 2010), des modifications structurales (Martinez-Cayuella, 1995 ; Lehucher-Michel et *al.*, 2001 ; Valko et *al.*, 2007), des changements de la conformation spatiale et l'altération de la fonction de la protéine (Favier, 2003) (Figure 07).

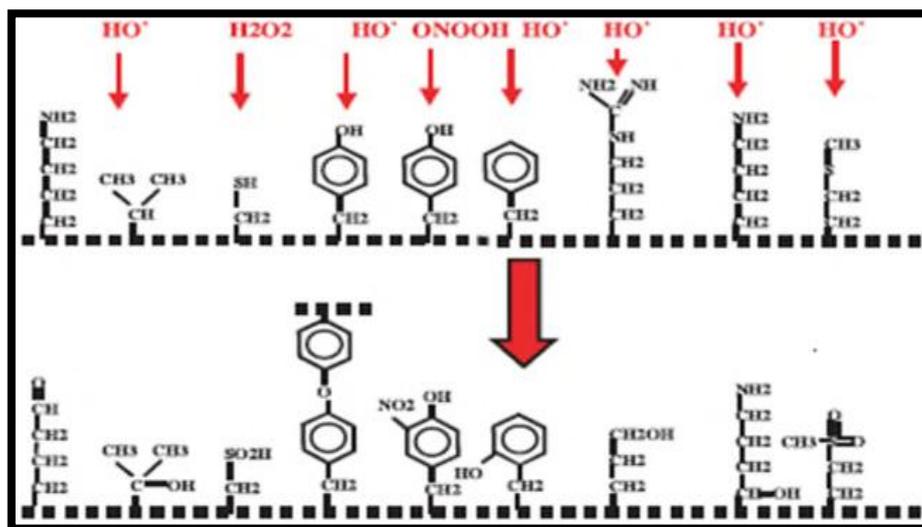


Figure 07 : L'oxydation des protéines après attaque radicalaire (Favier, 2003)

Chapitre 02 : stress oxydatif

4.4. Dommages oxydatifs liés aux glucides

Le glucose et les protéoglycanes du cartilage sont les cibles des RL. En effet, l'oxydation du glucose (glycosoxydation) regroupe en deux mécanismes ; soit par une oxydation directe du glucose, donnant des dérivés carbonyles, soit par la formation d'une liaison covalente entre un ose et les groupements aminés libres d'une protéine, pour former des produits finaux de glycosylation (PFG) (Halliwell et Gutteridge, 2007). Alors qu'en présence des métaux, la glycosoxydation peut libérer des RL comme le H_2O_2 et $l'O_2^{\bullet-}$ formant ainsi des PFG (Chevion et *al.*, 2000).

5. Stress oxydatif et implication pathologiques des ERO

Le stress oxydant est apparait en cas d'un excès des ERO qui peuvent s'accumuler à cause de différentes situations pathologiques (Noctor et Foyer., 1998). En effet, la production des ERO joue un rôle dans la pathogénèse l'Alzheimer, l'épilepsie, l'ischémie cérébrale (Noctor et Foyer., 1998 ; Willcox et *al.*, 2004) (Figure 08), et même le vieillissement du cerveau en soi (Martinez-Cayuela, 1995 ; Lehucher-Michel et *al.*, 2001; Sorg, 2004 ; Valko et *al.*, 2007) (Tableau 06).

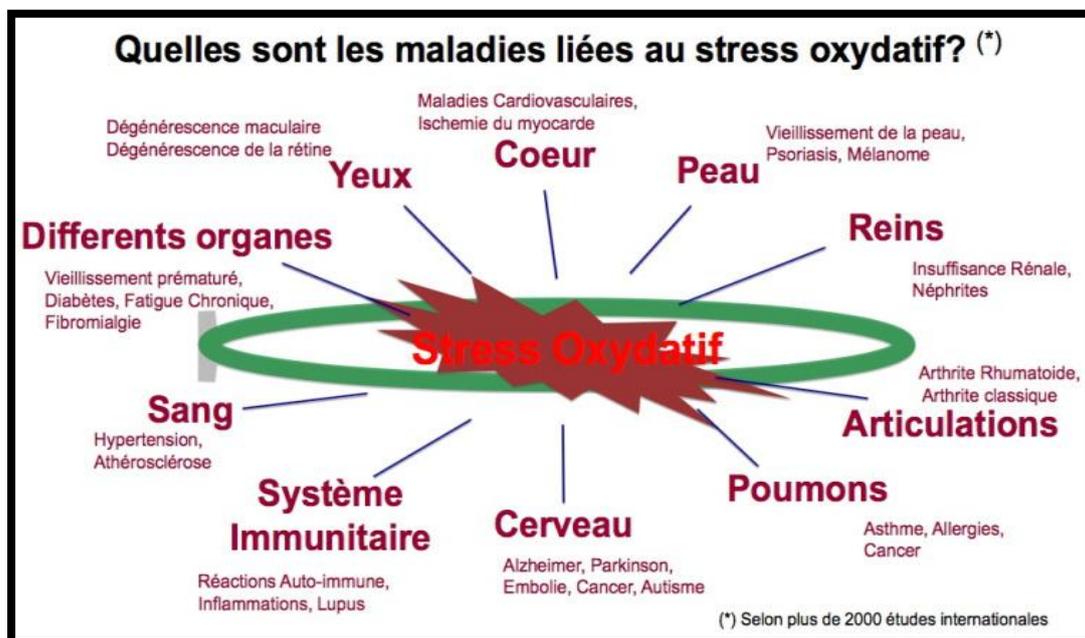


Figure 08 : Pathologies associées aux espèces réactives (Pham-Huy et *al.*, 2008)

Chapitre 02 : stress oxydatif

Tableau 06 : Les principales affections liées à la production des ERO

Pathologies	Références
- Lésions de reperfusion post-ischémique	(Zweier et Talukder., 2006)
- Maladies auto-immunes	(Halliwell et Guetteridge., 1990)
- Arthrite rhumatoïde	(Ahsan et al., 2003)
- Maladies inflammatoires	(Densiov et Afanas'ev., 2005)
- Athérosclérose	(Harrison et al., 2003)
- Maladies d'Alzheimer, de parkinson	(Sorg, 2004)
- Emphysème	(Lechuer-Michel et al., 2001)
- Diabète sucré	(Pal Yu, 1994)
- Certains cancers	(Valko et al., 2007)
- Anémie drépanocytaire	(Martinez-Cayuela, 1995)

6. Système de défense antioxydant

Le maintien d'un niveau non cytotoxique des ERO 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 l'oxydation de ces substrats (Berger, 2006). Les cellules utilisent de nombreuses stratégies anti-oxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leurs niveaux des ERO (Figure 09). La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires. Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en système enzymatique et système non enzymatique (Goudable et Favier, 1997) (Tableau 07).

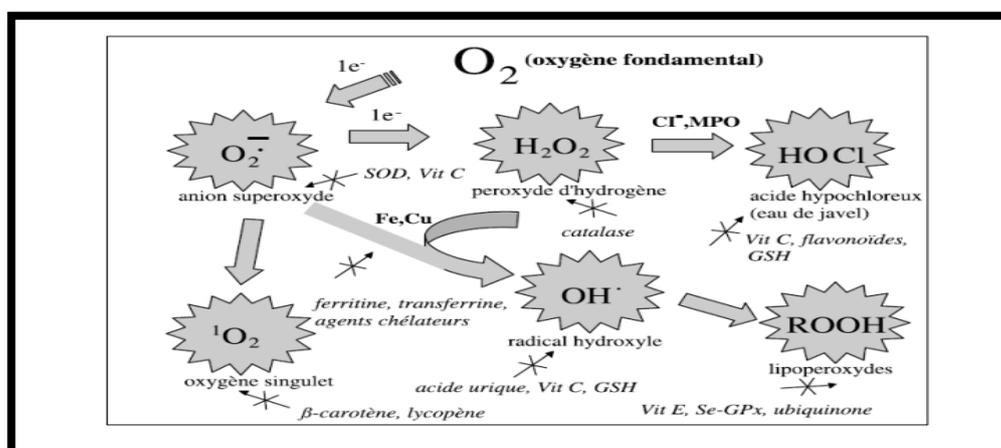


Figure 09 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants (Pincemail et al., 2002)

Chapitre 02 : stress oxydatif

Tableau 07 : Systèmes de défense antioxydant (Favier, 2003 ; Parihar et *al.*, 2008)

Système enzymatique	
Superoxyde dismutase (SOD)	<p>- Catalyse la dismutation de l'O₂^{•-} et H⁺ en H₂O₂ :</p> $2\text{H}^+ + 2\text{O}_2^{\bullet-} \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ <p>- Comporte trois isoformes (SOD1, SOD2, SOD3) dont l'activité est dépendante de la localisation et les apports nutritionnels en cuivre et a un moindre degré en zinc.</p>
Catalase (CAT)	<p>- Transforme le H₂O₂ en simple molécule d'eau :</p> $2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ <p>- Il est lié au NADPH dans les peroxysomes qui la protège et améliore son activité et détruit le H₂O₂.</p>
Glutathion peroxydase (GPx) et Glutathion réductase (GR)	<p>- Elle se trouve essentiellement dans le cytosol et les mitochondries, est fonctionné en présence de glutathion réduit.</p> $\text{ROOH} + 2\text{GSH} \longrightarrow \text{ROH} + \text{GSSH} + \text{H}_2\text{O}$
Système non enzymatique	
Vitamine C	- C'est un piègeur de O ₂ ^{•-} , H ₂ O ₂ , OH [•] , protège les biomembranes et les lipoprotéines et régénère la vitamine E
Vitamine E	- protège les cellules contre les dommages associés aux RL (inhibe la peroxydation lipidique).
β-carotène	- C'est un précurseur de la vitamine A, neutralise l'O ₂ ^{•-} et le radical peroxyde.
Glutathion	- C'est un tripeptide composé de cystéine, glutamine et glycine et joue un rôle dans la protection des lipides, des protéines et l'ADN contre l'oxydation.
Oligoéléments	- Zn, Cu, Mg, Sn et Fe jouent le rôle des cofacteurs pour maintenir l'activité catalytique des enzymes antioxydantes.
Polyphénols	- Les composés phénoliques sont capables d'agir comme des antioxydants qui peuvent neutraliser les RL en donnant un électron ou un atome d'hydrogène. ils peuvent réagir avec ERO et ERN. Le pouvoir antioxydant des composés phénoliques est également attribué à leur capacité de chélater les métaux ioniques et inhiber les enzymes impliquées dans la production de RL.

Chapitre 02 : stress oxydatif

La bilirubine	- Capable de piéger les radicaux peroxydes et l' 1O_2 , protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (Neuzil et Stocker, 1993).
Flavonoïdes	- Apportés également par l'alimentation, jouent un rôle similaire de pièges des RL (Koechlin– Ramonatxo, 2006 ; Pietta, 2000 ; Cotelle, 2001).

1. Matériel

1.1. Matériel végétal

Les graines de *Nigella sativa* L. utilisées dans cette étude ont été achetées chez un herboriste de la ville de Constantine, elles ont subi un nettoyage pour éliminer toutes les traces de poussière, puis broyées à l'aide d'un broyeur électrique. La poudre obtenue est stockée à l'obscurité et à 4°C jusqu'à leur prochaine utilisation. La quantité utilisée dans ce travail est de l'ordre de 402,56g parmi la quantité achetée (1Kg).

1.2. Réactifs chimiques et matériel

Les différents solvants utilisés sont : le méthanol, l'hexane, le chloroforme, l'acétone et l'acide acétique au cours d'extraction et de fractionnement.

Le DMSO, H₂O₂ au cours des tests.

Les pesés : gel de silice, sodium salicylate, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, FeSO₄, NaOH .

- Le soxhlet comme appareil d'extraction pour obtenir l'extrait méthanolique.
- Le rotavap comme appareil d'évaporation pour éliminer le solvant d'extraction.
- L'ampoule à décanter pour séparer les deux phases.
- La colonne pour récupérer les différentes fractions à partir de l'huile totale.
- Le pH mètre
- Le vortex et le spectrophotomètre.

2. Méthodes :

2.1. Préparation de l'extrait méthanolique :

L'objectif de l'extraction est de récupérer les molécules bioactives présentes dans les graines de *Nigella sativa* L. selon le protocole de Ramadan et Mörsel (2002a) avec quelques modifications, la poudre obtenue est soumise à une extraction par soxhlet (Extraction à chaud), en utilisant le méthanol comme solvant, 3 cycles ont été réalisés dans une période du temps défini pour chaque volume de solvant méthanolique (250 ml pour chaque extraction donc 3.5 L pour les 14 extractions effectuées).

Le méthanol est par la suite éliminé par évaporation sous pression réduite à 40°C en utilisant un rotavapeur (BÜCHI). Cette opération permet ainsi d'obtenir un extrait

caractérisé par une couleur vert-foncée, cet extrait est considéré comme étant l'extrait méthanolique.

2.2. Extraction de l'huile totale à froid

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

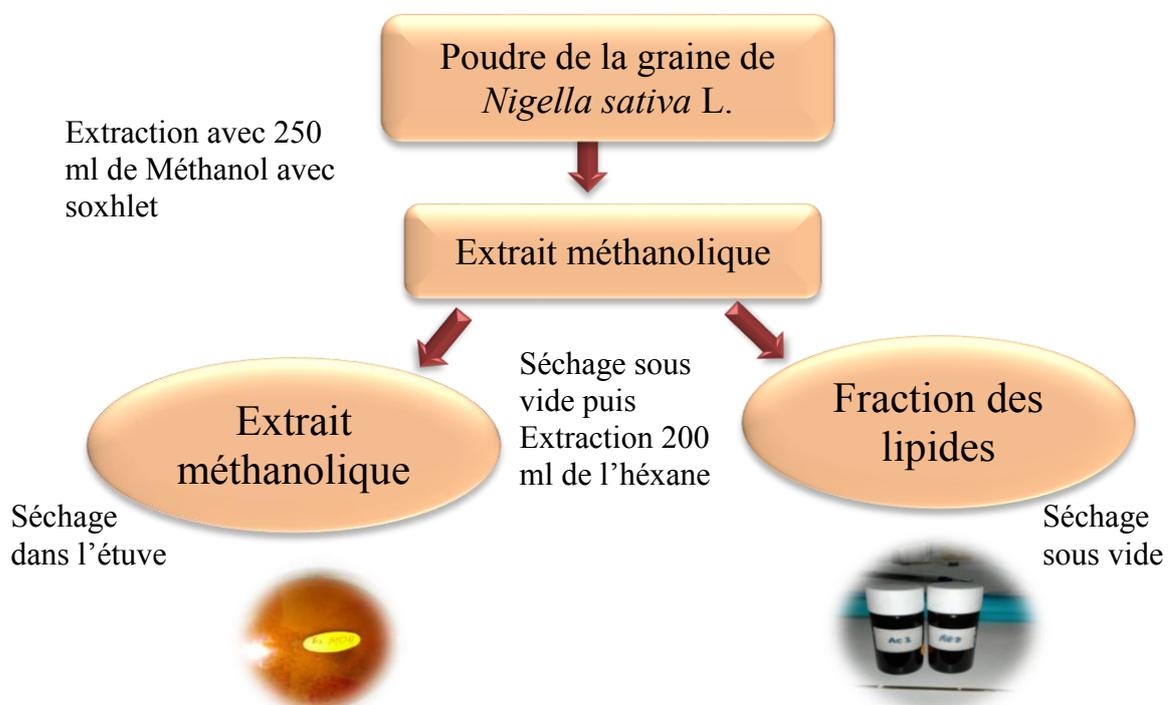


Figure10 : Schéma d'extraction de l'huile totale et de l'extrait méthanolique à partir des graines de *Nigella sativa* L.

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

Le fractionnement de HT des graines de *Nigella sativa* L. est réalisé en utilisant une 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) mélangé avec certain volume de chloroforme pure.

L'élution des différentes fractions a été réalisée selon un ordre croissant de polarité. En commençant avec le chloroforme pur (100%) suivie par Acétone (100%), méthanol (100%) et finalement l'Acide acétique (100%). Les solvants sont éliminés par évaporation sous pression réduite à 40°C en utilisant un rota vapeur (BÜCHI) pour récupérer les différentes fractions et la conserver jusqu'à leur utilisation (Ramadan et Mörsel, 2002a) (Figure 11).



Figure 11 : Fractionnement de l'huile totale par chromatographie sur colonne du gel de silice

2.4. Evaluation de l'effet scavenger

Après fractionnement dans la colonne, on a obtenu quatre fractions de l'HT :

- La fraction chloroformique (FCH).
- La fraction acétonique (FAC).
- La fraction méthanolique (FMOH).
- La fraction de l'acide acétique (FAcAC).

Dans notre expérience, nous intéressons sur l'activité antioxydante ou antiradicalaire c'est pourquoi on a choisi des tests pour cibler les radicaux libres :

- Test 01 : Evaluation de l'effet scavenger du radical hydroxyle (OH•).

- Test 02 : Evaluation de l'effet scavenger de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$).
- Test 03 : Evaluation de l'effet scavenger sur le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

2.4.1. Evaluation de l'effet scavenger du radical hydroxyle (OH^{\bullet})

Cette technique est estimée selon la méthode décrite par Smirnov et Cumbes (1989). Le principe de cette technique est basé sur la production d' OH^{\bullet} dans le milieu réactionnel à travers la réaction de Fenton, ensuite le radical OH^{\bullet} produit réagit avec le sodium salicylate pour former le complexe salicylate hydroxylé.

Le volume finale du milieu réactionnel est 355 μ l, le milieu est constitué de 125 μ l de $FeSO_4$ (1.5 mM), 90 μ l de H_2O_2 (6 mM), 40 μ l de sodium salicylate (20 mM) et 100 μ l des différentes concentrations de l'HT et de ses fractions. Après une incubation à 37°C pendant 1h, l'absorbance du complexe hydroxyle salicylate est mesurée dans le visible à longueur d'onde de 562 nm. Le pourcentage d'inhibition d' OH^{\bullet} est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [1 - (A1-A2) / A0] \times 100$$

A0 : l'absorbance du contrôle (sans extrait).

A1 : l'absorbance en présence d'extrait.

A2 : l'absorbance sans sodium salicylate.

2.4.2. Evaluation de l'effet scavenger de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$)

Le principe de ce test est basé sur la production de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) qui va réduire le NBT^{+2} ayant une coloration jaune en diformazan ayant une coloration bleu foncé, ce dernier absorbe la lumière à 560 nm.

En présence des antioxydants doués d'un effet piègeur *vis-à-vis* de ($O_2^{\bullet-}$), la formation de diformazan est inhibée, ce qui se traduit par la diminution de l'absorbance. L'effet scavenger vis-à-vis de ($O_2^{\bullet-}$) est déterminé selon la méthode décrite par Elizabeth et Rao (1990). Brièvement, 10 μ l du (NBT) dissoutes dans le DMSO à une concentration de 1 mg/ml et 30 μ l des différentes concentrations des extraits ou du standard sont ajoutés à 1 ml du DMSO alcalin qui est préparé en ajoutant 1ml DMSO à 5mM NaOH. Les absorbances sont mesurées à 560 nm et le DMSO pure est utilisé comme blanc. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(Ab_{sc} - Ab_{se}) / A_c] * 100$$

Absc : absorbance du contrôle.

Abse : absorbance d'une concentration donnée de substance à tester

2.4.3. Evaluation de l'effet scavenger du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Le piégeage du H₂O₂ est déterminé selon la méthode décrite par Ruch et ses collaborateurs (1989) avec quelques modifications. Le principe de cette méthode est basé sur la capacité de HT et ses fractions (antioxydant) à neutraliser le H₂O₂ en eau et oxygène selon la réaction suivante :



Une solution du H₂O₂ (120 mM) est préparée dans un tampon phosphate (50mM, pH 7.4). Le tampon phosphate est près a l'emploi, il faut d'abord ajouter certain volume de H₂O₂ dans le tampon puis lancer le test.

Le milieu réactionnel est composé de 200µl de l'extrait a différents concentration (HT ou les fractions neutre ou le standard) +35 µl de solution H₂O₂ (120 mM dans un tampon phosphate de PH=7.4), mélanger le milieu par le vortex laisser incubé à température ambiante pendant 10 min. Les absorbances sont mesurées, à 230 nm (UV). Le pourcentage du piégeage du H₂O₂ (ou % d'inhibition) est calculé en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(\text{Absc} - \text{Abse}) / \text{Absc}] * 100$$

Absc : l'absorbance du contrôle (la solution du H₂O₂).

Abse : l'absorbance du H₂O₂ en présence de HT/ l'extrait ou du standard (l'α-tocophérol)

Résultats et discussion

1. Résultats et discussion

1.1. Rendement de l'extraction

L'extraction et le fractionnement de l'huile totale à partir des graines de *Nigella sativa* L. cultivées dans le sud d'Algérie, a été effectuée selon la méthode de Ramadan et Mörsel (2002a) avec quelques modifications. Dans cette étude, le rendement de l'huile totale est de 11.79 g/ml qui représente 13.61% du poids de la graine. La chromatographie sur colonne a permis d'extraire la FCH avec un rendement de 68.53% de HT, la FAC avec un rendement de 2.98% de HT, la FMOH avec un rendement de 1,11% de HT et la FAcAC avec un rendement de 1.21% de HT (Tableau 08).

Tableau 08 : Rendement d'extraction et de fractionnement de l'HT des graines de *Nigella sativa* L.

fractions	Rendement (g/ 3.5 L)	Rendement %
HT	11.7904	13,61 des graines
FCH	8,08	68.53 de HT
FAC	0,35142	2.98 de HT
FMOH	0.13086	1,11 de HT
FAcAC	0,1430	1.21 de HT

Nos résultats sont comparables à ceux rapportés par Bassimatta, leur résultats concernant L'huile fixe représente 37,9 à 39,2% du poids de la graine (Bassimatta, 2003). La ressemblance des résultats est due à l'utilisation du même procédé d'extraction. En comparant nos résultats avec ceux rapportés par Ramadan et Morsel, on souligne que notre rendement est légèrement inférieur. Ceci est due à l'utilisation du éthanol lors de l'extraction à chaud qui est plus polaire que le chloroforme/méthanol utilisés par Ramadan et Morsel (2003). La ressemblance des résultats est due à l'utilisation du même procédé d'extraction. D'autres travaux effectués sur les graines de *Nigella sativa* L. rapportent que la teneur en l'HT et ses fractions des graines de *Nigella sativa* L. est très variable. Cette variabilité peut être attribuée surtout à la différence dans la procédure d'extraction, la qualité, l'origine géographique, les conditions du stockage des graines ainsi que les sources des solvants utilisés lors de la manipulation (Atta, 2003 ; Bourgou, 2008 ; Hamrouni-Sellami, 2008).

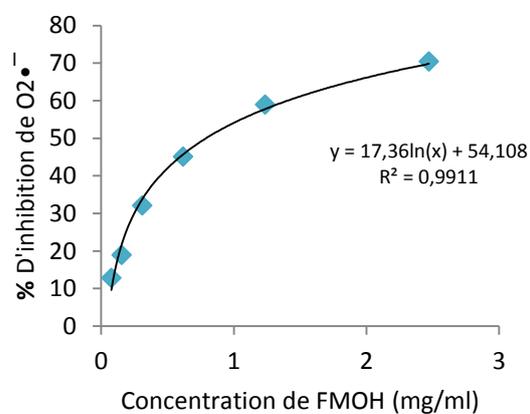
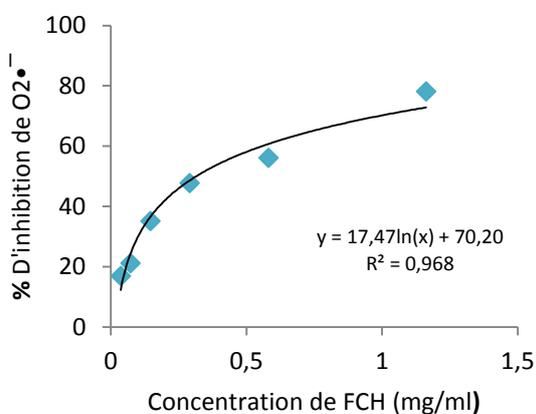
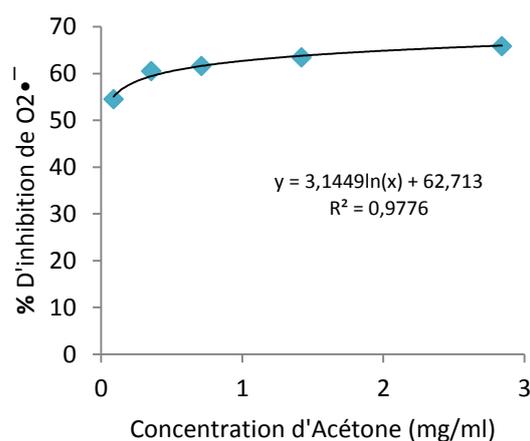
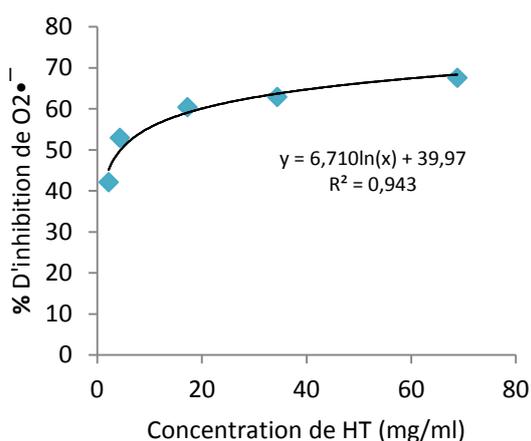
Résultats et discussion

Tableau 09 : IC₅₀ des différentes fractions pour les trois tests

Huiles	IC ₅₀ (mg/ml)		
	O ₂ ^{•-}	OH ⁻	H ₂ O ₂
Huile totale (HT)	4,4583	6,6984	1426,7549
FCH	0,3146	0,0957	23,0751
FMOH	0,7896	0,5443	66,5863
FACcAC	0,0759	0,4154	87,4387
FAC	0,0175	0,1323	86,7598
α-Tocophérol	0,2614	0,1047	62,8218

1.2. Evaluation de l'effet scavenger de l'anion superoxyde (O₂^{•-})

Les résultats de l'effet scavenger des différentes fractions de HT de *Nigella sativa* L. sont représentés dans les graphes suivantes :



Résultats et discussion

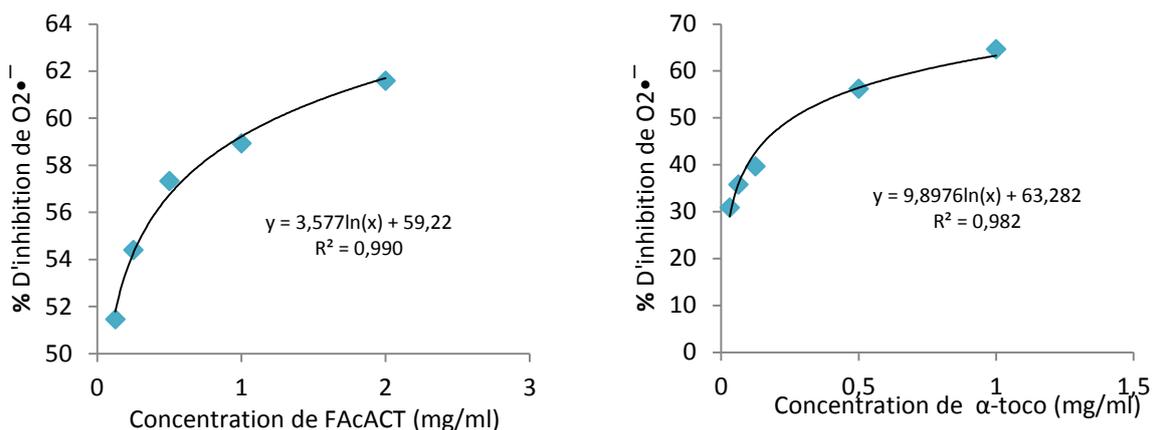
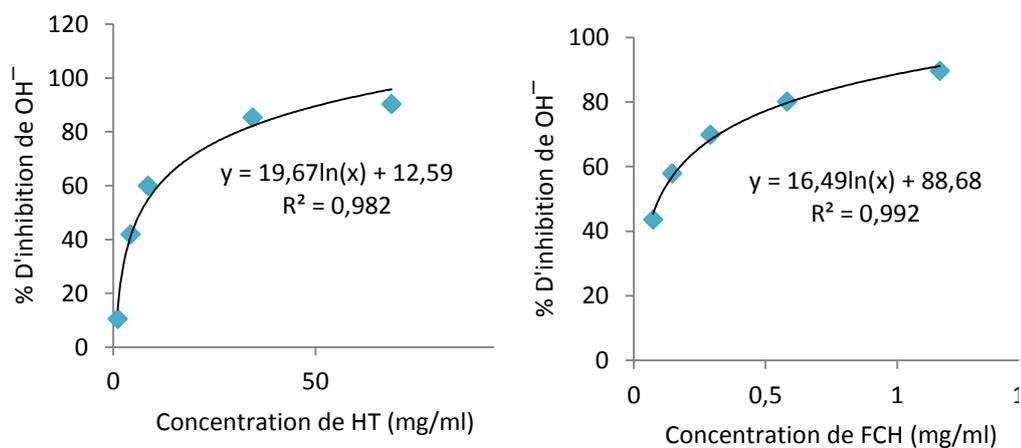


Figure 12 : Courbes d'évaluation de l'effet scavenger de l'HT et les différentes fractions vis-à-vis l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$)

L'huile totale et les différentes fractions des graines de *Nigella sativa* L. inhibent l' $O_2^{\bullet-}$ d'une manière dose-dépendante. La fraction acétonique présente une bonne activité anti radicalaire avec une IC_{50} de 0,0175 mg/ml suivi par la fraction de l'acide acétique avec une IC_{50} de 0,0759 et ça en comparaison avec l' α -tocophérol qui présente une IC_{50} de 0,2614. En revanche, les fractions méthanolique et chloroformique présentent des IC_{50} élevées (0,7896 . 0,3146 mg/ml respectivement), et l'huile totale présente l' IC_{50} la plus élevée avec une valeur de 4,4583mg/ml. Ces résultats indiquent une activité anti radicalaire relativement faible comparée à celle de l' α - tocophérol (Figure 12).

1.3. Evaluation de l'effet scavenger du radical hydroxyle (OH^{\bullet})



Résultats et discussion

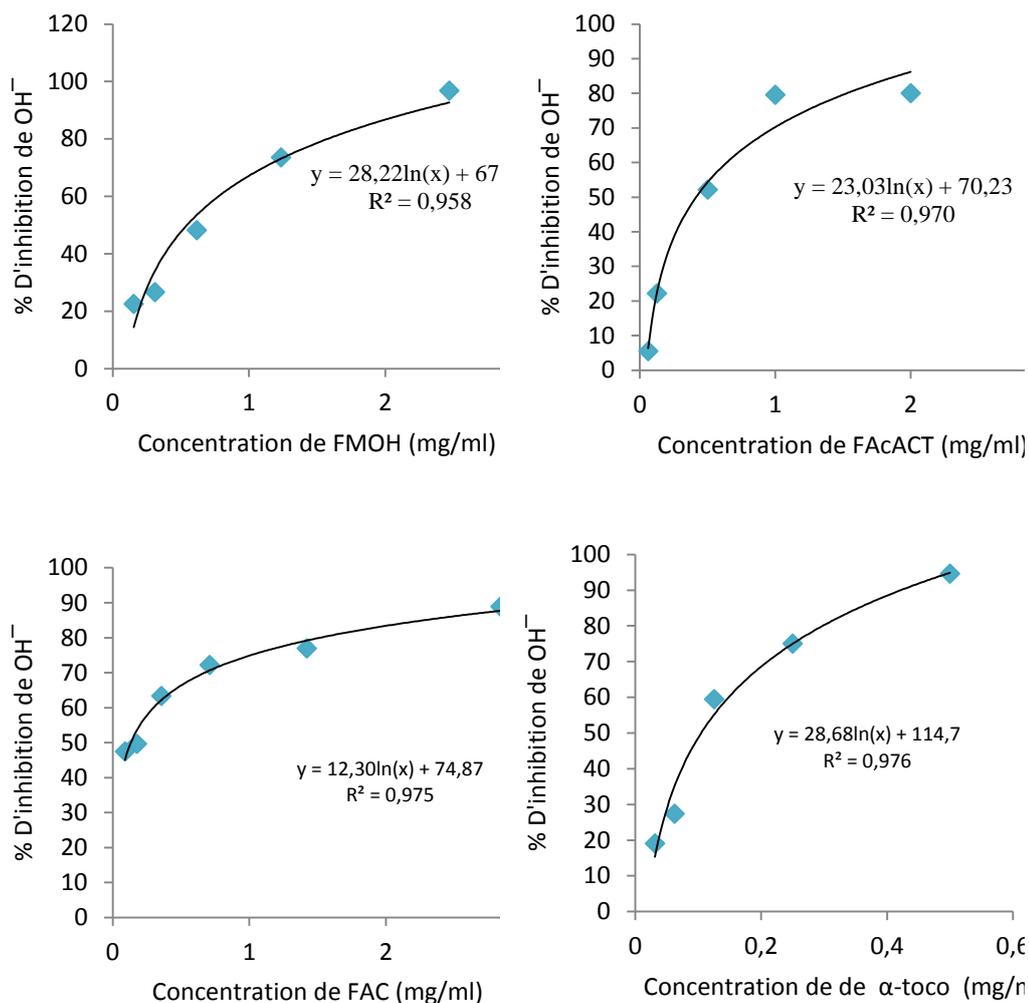


Figure 13 : Courbes d'évaluation de l'effet scavenger de l'HT et les différentes fractions vis-à-vis le radical hydroxyle (OH^\bullet).

L'activité de piégeage du radical OH^\bullet a été estimée en fonction de la concentration de HT et ses fractions le pourcentage d'inhibition du radical OH^\bullet pour chaque extrait a été déterminé et les résultats obtenus sont présentés dans la figure 13 et les valeurs des IC_{50} sont présentées dans le tableau 09.

Les huiles des graines de *Nigella sativa* L. montrent une capacité antiradicalaire dose-dépendante et la FCH montre la meilleur activité avec une IC_{50} de 0,0957 mg/ml, comparable à l' α -Tocophérol qui présente une IC_{50} de 0,1047mg/ml. Alors que la FAC présente une IC_{50} de 0,1323 proche à celle de l' α -Tocophérol. Par ailleurs les fractions, FAcAC, FMOH, et l'HT présentent des IC_{50} différenciées (respectivement de 0,4154. 0,5443. 6,6984 mg/ml) (Figure 13).

Résultats et discussion

1.4. Evaluation de l'effet scavenger du peroxyde d'hydrogène H₂O₂

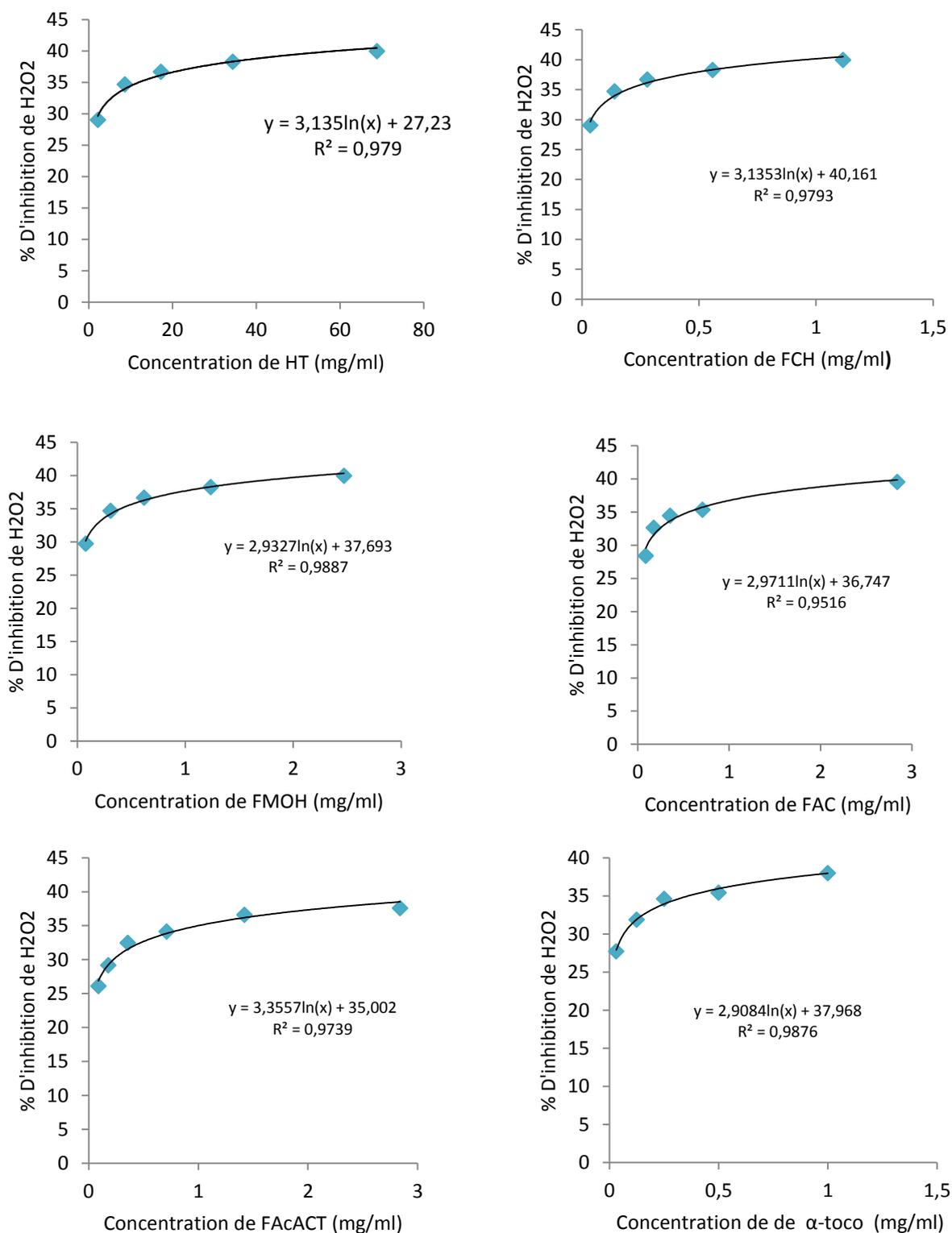


Figure 14 : Courbes d'évaluation de l'effet scavenger de l'HT et les différentes fractions vis-à-vis le peroxyde d'hydrogène H₂O₂.

Résultats et discussion

Dans le présent test, le pourcentage d'inhibition est proportionnel à l'absorbance de la molécule H_2O_2 qui absorbe dans l'UV à 230 nm. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 14. Nos résultats montrent que la FCH est un excellent piègeur du H_2O_2 avec une IC_{50} de l'ordre de 23,0751 mg/ml par rapport à l' α -Tocophérol qui a une IC_{50} de 62,8218mg/ml. Cependant, les fractions FMOH, FAC, FAcAC et l'HT sont des piègeurs du H_2O_2 moins efficaces que l' α -Tocophérol avec des IC_{50} présentées respectivement de l'ordre de 66,5863. 86,7598. 87,4387. 1426, 7549 mg/ml (Figure 14).

1.5. Différence entre l'effet scavenger de l'huile totale et ses fractions sur l' $O_2^{\bullet-}$, l' OH^{\bullet} et l' H_2O_2

D'après le tableau 09 on remarque que l'HT présente une IC_{50} pour l'effet scavenger de l' $O_2^{\bullet-}$ inférieur à celui de l' OH^{\bullet} , veut dire que l'HT contient des molécules qui captent l' $O_2^{\bullet-}$ mieux que l' OH^{\bullet} (bonne piègeur pour l'anion super oxyde). C'est le même constat pour la FAcAC et FAC. Alors que pour la FCH, FMOH et l' α -Tocophérol l' IC_{50} présentée par le radical hydroxyle est inférieure à celle de l'anion superoxyde oxyde, donc ces fractions avec le standard piègent l' OH^{\bullet} mieux que l' $O_2^{\bullet-}$. Par ailleurs, l'effet antiradicalaire de l'huile totale et ses fractions sur H_2O_2 montre des valeurs de l' IC_{50} de l'HT et ses fractions plus élevées en comparaison avec les deux espèces radicalaire ($O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet}), cela pourrait être expliqué avec l'espèce non radicalaire de peroxyde d'hydrogène qui ne présente pas des électrons libres.

2. Discussion général

Globalement, les résultats de l'effet scavenger des différentes fractions de HT des graines de *Nigella sativa* L. indiquent que l'HT et ses fractions sont doués d'une bonne activité anti-radicalaire. Cette activité pourrait être expliquée par la richesse naturelle de l'huile végétale en lipides bioactifs tels que les phytostérols, les vitamines liposolubles notamment, les α -tocophérols et les β -carotènes, les acides gras insaturés notamment l'acide linoléique et l'acide oléique (Mosbah, 2016).

En effet, l'acide linoléique est un acide gras polyinsaturé qui possède 2 doubles liaisons (C18 : ω -6, ω -9), alors que l'acide oléique est un AG monoinsaturé au niveau de (C18 : ω -9) (Ramadan et Morsel., 2002a; 2003). De plus, l'huile totale peut aussi contenir des composés phénoliques à caractères amphiphiles (Sultan et al., 2009).

Résultats et discussion

D'après les structures détaillées de chacun du chloroforme et l'acétone qui ne possèdent pas des groupements hydroxyle (OH), ils sont des solvants apolaires donc ils permettent l'élution des molécules apolaires à partir de l'HT. Cependant ces derniers ont un effet scavenger important par apport à l' OH^\bullet car ils contiennent des groupements hydrogènes (protons H^+) donc ils captent mieux lors de l'interaction des de OH^\bullet avec les H^+ pour former l' H_2O qui est stable.

Par contre la structure détaillée du méthanol et l'acide acétique qui indiquent la présence des groupements OH montrent un effet scavenger moins important à celle du chloroforme et l'acétone par apport à l' OH^\bullet donc par l'interaction d'OH avec l' OH^\bullet on obtient l' H_2O qui est stable et un autre radical libre (R^\bullet) qui est instable.

D'après la structure détaillée de l'acétone qui ne possèdent pas des groupements hydroxyle (OH), il est un solvant apolaire donc il permet l'élution des molécules apolaires à partir de l'HT. Cependant ces derniers ont un effet scavenger important par apport à l' $\text{O}_2^{\bullet-}$ donc la FAC riche en autres molécules telles que les lipides bioactifs qui sont responsables de piégeage des RL. Par contre la FCH porte des molécules qui n'ont pas des groupements OH et les lipides bioactifs ce qui explique leur faible effet scavenger.

Malgré la FMOH contient des molécules qui ont des groupements OH, elle montre un effet piègeur moins considérable.

Finalement la FAcAC présente le meilleur effet scavenger par rapport aux autres fractions à cause de présence des molécules qui ont des groupements OH et des lipides bioactifs à la fois.

Concernant l' H_2O_2 qui présente une espèce non radicalaire, elle est structurellement stable et par conséquent ne cherche pas à apparier avec une autre structure, pour cela son effet est lié à la présence des lipides bioactifs ce qui explique les valeurs élevées des IC_{50} des différentes fractions utilisées aussi bien ça pourrait être expliqué par d'autre mécanismes pour réaliser l'effet antioxydant.

Les plantes médicinales présentent une source indéfinie de molécules bioactive, ces molécules résultant de métabolites secondaires qui sont très utilisées par l'homme dans les domaines médicinales.

Conclusion et perspectives

La plante *Nigella sativa* L. est parmi les plantes largement exploitées dans la civilisation islamique et fortement utilisées de nos jours en médecine traditionnelle à travers le monde. Cette plante est utilisée pour lutter contre le stress oxydatif qui résulte d'une perturbation dans la balance métabolique cellulaire durant laquelle, la génération d'oxydants accable le système de défense antioxydant

L'objectif de l'étude développée dans le présent travail est consacré à l'évaluation de l'effet antiradicalaire des huiles de graines de *Nigella sativa* L. *in vitro*.

Dans une première étape, nous avons procédé à l'extraction de l'huile totale à partir des graines de *Nigella sativa* L. puis à son fractionnement sur une colonne de chromatographie pour récupérer quatre différentes fractions (selon la polarité des solvants). Ensuite nous avons procédé à l'étude de l'activité antioxydante *in vitro* de ces fractions en ciblant les mêmes espèces réactives de l'oxygène.

Les résultats de l'étude de la capacité à piéger l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ le radical hydroxyle OH^{\bullet} et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 montrent un effet antioxydant considérable et la FAC représente la meilleure capacité antioxydante pour $O_2^{\bullet-}$ en raison de sa richesse en lipides bioactifs, pour la FCH le meilleur résultat est enregistré pour OH^{\bullet} à cause de la présence des groupements OH, enfin, les résultats pour H_2O_2 montrent un effet antiradicalaire faible ce qui indique la présence d'un autre mécanisme par lequel il exerce son effet.

Au vu des effets obtenus *in vitro*, les perspectives médicales de l'huile de *Nigella sativa* L. et ses fractions sont donc très prometteuses mais les essais *in vivo* et cliniques manquent. Cette étude pourrait être complétée par des études de caractérisation moléculaire de toutes les fractions isolées afin de préciser les molécules responsables de cette activité. Aussi bien, nous avons recommandé de réaliser d'autres essais afin de développer des approches appropriées dans le but d'une éventuelle application chez l'homme.

Références bibliographiques

- Abdelmeguid N.E., Fakhoury R., Kamal S.M., Al Wafai R.J. (2010). Effects Of *Nigella Sativa* L. And Thymoquinone On Biochemical And Subcellular Changes In Pancreatic B-Cells Of Treptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Diabetes* ; 2: 256-266.
- Afonso, V., Champy, R., Mitovic, D., Collin, P., Lomri, A. (2007). Radicaux Libres Dérivés De L'oxygène Superoxydes Dismutases : Rôle Dans Les Maladies Rhumatismales. *Revue Du Rhumatisme*, (74): 636-643.
- Ahsan, H., Ali, A., Ali, R. (2003). Oxygen Free Radicals And Systemic Autoimmunity. *Clinical And Experimental Immunology*. 131: 398-404.
- Akova, A., Ustun, G. (2000). Activity And Adsorption Of Lipase From *Nigella Sativa* L. Seeds On Celite At Different Ph Values. *Biotechnology Letters*, 22: 355-359.
- Aksoy, A., Türkay, S., Tuter, T., Ustun, G., Riva, S., Secundo, F. (2001). Investigation Of Substrate Selectivity Of *Nigella Sativa* L. Seed Lipase(S). Joint Research Project (1999-2001). Cnr (Consiglio Nazionale Delle Ricerche). Italy And Tubitak (Turkish Scientific And Technical Research Center), Turkey.
- Alenzi F., El-Bolkiny Y.S., Salem M. (2010). Protective Effects Of *Nigella Sativa* L. Oil And Thymoquinone Against Toxicity Induced By The Anti-Cancer Drug Cyclophosphamide. *Br J Biomed Sci*; 67: 20-28.
- Al-Hader, A., Aqel, M., Hasan, Z.(1993). Hypoglycemic Effects Of The Volatile Oil Of *Nigella Sativa* L. Seeds. *International Journal Of Pharmacognosy*. 31: 96-100.
- Ali, B., & Blunden, G. (2002). Pharmacological And Toxicological Properties Of *Nigella Sativa* L. *Phytother Res*, 15, 59-69.
- Al-Jassir, S. (1992). Chemical Composition And Microflora Of Black Cumin (*Nigella Sativa* L.) Seeds Growing In Saudi Arabia. *Food Chemistry*, 45: 239-242.
- Al-Saleh, I. A., Billedo, G., El-Doush, I. I. (2006). Levels Of Selenium, D α -Tocopherol, D β -Tocopherol, All-Trans-Retinol, Thymoquinone And Thymol In Different Brands Of *Nigella Sativa* L. Seeds. *Journal Of Food Composition And Analysis*, 19: 167-175.
- Atamer A., Bilici A., Yenice N., Selek S., Ilhan N., Atamer Y. (2008).The Importance Of Paraoxonase 1'activity, Nitric Oxide And Lipid Peroxidation In Hepatosteatosi. *J Int Med Res* ; 36: 771-776.
- Atta, M. B. (2003). Some Characteristics Of *Nigella* (*Nigella Sativa* L.) Seed Cultivated In Egypt And Its Lipid Profile. *Food Chemistry*, 83: 63-68.
- Atta-Ur-Rahman M., Ahmed S., Choudhary M., Habib-Urrahman.(1985). Nigellimine-N-Oxide-A New Isoquinoline Alkaloid From The Seeds Of *Nigella Sativa* L. *Heterocycles*; 23: 953-955.
- Atta-Ur-Rahman M., Hassan S., Coudhary M., Ni C., Clardy J. (1995). Nigellidine: A New Indazole Alkaloid From The Seeds Of *Nigella Sativa* L. *Tetrahedron Letters* ; 36: 1993-1996.
- Atta-Ur-Rahman M., Zaman K. (1992). Nigellimine: A New Isoquinoline Alkaloid From *Nigella Sativa* L. *J Nat Prod* (55), Pp. 676-678.
- Auberval N. (2010). Stress Oxydant Et Le Diabète. Prévention Du Stress Oxydant Dans Le Diabetes Ses Coplicatios Par Des Antioxydants D'origine Naturelle. Ed, Université De Strasbourg ; P: 50-58.

Références bibliographiques

Awad, E.M. (2005). In Vitro Decrease Of The Fibrinolytic Potential Of Cultured Human Fibrosarcoma Cell Line, Ht1080, By *Nigella Sativa* L. Oil. *Phytomedicine*. 12: 100-107.

Bartosz, G. (2003). Generation Of Reactive Oxygen Species In Biological Systems. *Comments On Toxicology*. 9: 5-21.

Bassim Atta M. Some Characteristics Of *Nigella* (*Nigella Sativa* L.). (2003). Seed Cultivated In Egypt And Its Lipid Profile. *Food Chemistry*; 83: 63-68.

Beckman, K.B., Ames, B.N. (1998). The Free Radical Theory Of Aging Matures. *Physiological Reviews*. 78: 547-581.

Benkaci-Ali F., Baaliouamer A., Meklati B.Y., Chemat F. (2007). Chemical Composition Of Seed Essential Oils From Algerian *Nigella Sativa* L. Extracted By Microwave And Hydrodistillation. *Flavour & Fragrance Journal* ; 22: 148-153.

Berger, M.M. (2006). Manipulations Nutritionnelles Du Stress Oxydant : Etat Des Connaissances. *Nutrition Clinique Et Métabolisme*. 20: 48-53.

Berlette, B.S., Stadtman, E.R. (1997). Protein Oxidation In Aging Disease, And Oxidative Stress. *The Journal Of Biological Chemistry*. 272: 20313-20316.

Bonnier G., Douin R. (1993). *La Grande Flore En Couleur*. Paris : Tome 3, Belin.

Bourgou S., Ksouri R., Bellila A., Skandrani I., Falleh H., Marzouk B. (2008). Phenolic Composition And Biological Activities Of Tunisian *Nigella Sativa* L. Shoots And Roots. *C. R. Biologies*; 331: 48-55.

Brunneton J. (1999). Flavonoïdes. In : *Pharmacognosie, Phytochimie: Plantes Médicinale*, 3ème Edition, Technique Et Documentation (Paris), Pp : 310-353.

Burits, M., Bucar, F. (2000). Antioxidant Activity Of *Nigella Sativa* L. Essential Oil. *Phytotherapy Research*, 14: 323-328.

Cai H, Harrison Dg. (2000). Endothelial Dysfunction In Cardiovascular Diseases: The Role Of Oxydant Stress. *Circ Res*; 87(10):840-4.

Cheikh-Rouhou, S., Besbes, S., Hentati, B., Blecker, C., Deroanne, C., Attia, H. (2007). *Nigella Sativa* L.: Chemical Composition And Physicochemical Characteristics Of Lipid Fraction. *Food Chemistry*, 101: 673-681.

Chevion M., Berenshtein E., Stadtman E. R. (2000). Human Studies Related To Protein Oxidation: Prote In Carbonyl Content As A Marker Of Damage. *Free Radie Res*; 33: 99 -108.

Chiarugi, P., Fiaschi, T. (2007). Redox Signalling In Anchorage-Dependent Cell Growth. *Cellular Signalling*. 19: 672-682.

Cotelle, N. (2001). Role Of Flavonoids In Oxidative Stress. *Current Topics In Medicinal Chemistry*. 1: 569- 590.

Daum-Badouard. C. (2006).: 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; P 13.

Dawidar A.M ; Ezmirly S.T. ; Abdel-Mogib M. ; Hashem N. ; Kasem T. (2001). New P-Hydroxyacetophenone From *Nigella Sativa* L. *Journal Of Saudi Chemical Society*: 5 189-192

Références bibliographiques

Densiov, E.T., Afanas'ev, I.B. (2005). In: Oxidation And Antioxidants In Organic Chemistry And Biology. Eds: Taylor & Francis Group (U.S.A), Pp: 703-861.

Dizadaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., Rodriguez, H. (2002). Free Radical induced Damage To Dna : Mechanisms And Measurement. *Free Radical Biology & Medicine*, 32: 1102–1115.

El-Dakhakhny, M., Madi, N. J., Lembert, N., Ammon, H. P. T. (2002). *Nigella Sativa* L. Oil, Nigellone And Derived Thymoquinone Inhibit Synthesis Of 5-lipoxygenase Products In Polymorphonuclear Leukocytes From Rats. *Journal Of Ethnopharmacology* , 81: 161-164..

El-Dakhakhny, M., Barakat, M., Abd Ei-Halim, M., Aly, S.M. (2000). Effect Of *Nigella Sativa* L.Oil On Gastric Secretion And Ethanol Induced Ulcer In Rats. *Journal Of Ethnopharmacology*. 72: 299-304.

Elizabeth K, Rao MNA. (1990). Oxygen radical scavenging activity of cur cumin. *International Journal of Pharmaceutics*. 58: 237-240.

El-Kadi, A., & Kandil, O. (1987). The Black Seed (*Nigella Sativa* L.) And Immunity: Its Effect On Human T Celle Subset. *Federation Proceedings*, 46, 1222.

El-Obeid, A., Al-Harbi, S., Al-Jomah, N., Hassib, A. (2006). Herbal Melanin Modulates Tumor Necrosis Factor Alpha (Tnf-A), Interleukin 6 (Il-6) And Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf) Production. *Phytomedicine*, 13: 324–333.

El-Saleh, S.C., Al-Sagair, O.A., Al-Khalaf, M.I. (2004). Thymoquinone And *Nigella Sativa* L.Oil Protection Against Methionine-Induced Hyperhomocysteinemia In Rats. *International Journal Of Cardiology*. 93: 19-23.

El-Tahir, K. E., Ashour, M.M., Ai-Harbi, M.M. (1993). The Respiratory Effects Of The Volatile Oil Of The Black Seed (*Nigella Sativa* L.) In Guinea Pigs: Elucidation Of The Mechanism(S) Of Action. *General Pharmacology*. 24: 1115-1122.

Favier, A. (2003). Le Stress Oxydant: Intérêt Conceptuel Et Expérimental Dans La Compréhension Des Mécanismes Des Maladies Et Potentiel Thérapeutique. *L'actualité Chimique*, 108-115.

Ghedira, K. (2006). La Nigelle Cultivée : *Nigella Sativa* L. (Ranunculaceae). *Phytothérapie*, 4: 1-7.

Ghedira, K., Le Jeune, R. (2010). Huile De Nigelle Cultivée, *Nigella Sativa* L. (Ranunculaceae). *Phytothérapie*, 8: 124–128.

Gilani, A. H., Jabeen, Q., Khan, M. A. U. (2004). A Review Of Medicinal Uses And Pharmacological Activities Of *Nigella Sativa* L. *Pakistan Journal Of Biological Sciences*, 7: 441-451.

Gilani, A.H., Aziz, N., Khurram, I.M., Chaudary, K.S., Iqbal, A. (2001). Bronchodilator, Spasmolytic And Calcium Antagonist Activities Of *Nigella Sativa* L. Seeds (Kalonji). *Journal Of The Pakistan Medical Association*. 51: 115-120.

Goudable, J. Favier, A. (1997). Radicaux Libres Oxygénés Et Antioxydants. *Nutrition Clinique Et Métabolisme*. 11: 115-20.

Greenish H. (1880). Contribution To The Chemistry Of *Nigella Sativa* L. (Vol. 10). *Pharmac J Trans*.

Références bibliographiques

Guignard, J.-L. (2001). Botanique Systématique Moléculaire (Ed. 12e Edition). Paris: Masson.

Hajhashemi, V., Ghannadi, A., Jafarabadi, H. (2004). Black Cumin Seed Essential Oil, As a Potent Analgesic And Antiinflammatory Drug. *Phytotherapy Research*, 18: 195-199.

Haleng J., Pincemail ., Defraigne Jo., Harlier Cc ., Chapelle Jp. (2007). Le Stress Oxydant. *J Med Liege*; 62: 628-638.

Halliwell B, Gutteridge Jm. (1990). Role Of Free Radicals And Catalytic Metal Ions In Human Disease: An Overview. *Methods Enzymol* ; 186:1-85. .

Halliwell B., Gutteridge J M. (2007). *Free Radicals In Biology And Medicine*, Oxforduniversity Press.

Halliwell B. (1997). Antioxidants And Human Disease: A General Introduction. *Nutr Rev*; 55:S449.

Halliwell, A., Gutteridge, J.M.C. (1990). The Antioxidant Of Human Extracellular Fluids. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*. 280: 1-8.

Halliwell, B., Whiteman, M. (2004). Measuring Reactive Species And Oxidative Damage In Vivo And In Cell Culture: How Should You Do It And What Do The Results Mean? *British Journal Of Pharmacology*. 142: 31-2.

Hamrouni-Sellami I, Kchouk ME and Marzouk B. (2008). Lipid and aroma composition of black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds from Tunisia. *Journal of Food and Biochemistry*. 32, 335-352.

Haq, A., Abdullatif, M., Lobo, P.I., Khabar, K.S.A., Sheth, K.V., Al-Sedairy, S.T. (1995). *Nigella Sativa* L. Effect On Human Lymphocytes And Polymorphonuclear Leukocyte Phagocytic Activity. *Immunopharmacology*. 30: 147-155.

Harbone J.P. (1998). *Phytochemical Methods, A Guide To Modern Techniques Of Plant Analysis*. Chapman & Hall, Londres.

Harrison, D., Griendling, K.K., Landmesser, U., Hornig, B., Drexler, H. (2003). Role Of Oxidative Stress In Atherosclerosis. *The American Journal Of Cardiology*. 91: 7-11.

Houghton, P.J., Zarka, R., De Las Heras, B., Hoult, J.R. S. (1995). Fixed Oil Of *Nigella Sativa* L. And Derived Thymoquinone Inhibit Eicosanoid Generation In Leucocytes And Membrane Lipid Peroxidation. *Planta Med*. 61: 33-36.

[Http://Dx.Doi.Org/10.1371/Journal.Pone.0113486](http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0113486).

Hu Y., Block G., Norkus E. P., Morrow J. D., Dietrich M., Hudes M. (2006). Relations Of Glycemic Index And Glycemic Load With Plasma Oxidative Stress Markers. *Am J Clin Nutr*; 84: 70-76., Quiz 266-267.

Islam, S., Begum, P., Ahsan, T., Huque, S., & Ahsan, M. (2004). Immunosuppressive And Cytotoxic Properties Of *Nigella Sativa* L. *Phyther Res*, 18,395-398.

Joshi B.S. ; Singh K.L. ; Roy R. (2001). Structure Of A New Isobenzofuranone Derivates From *Nigella Sativa* L. in *Mag.Res.Chem*: 39 771-772

Judd ; Campbell ; Kellogg ; Stevens. (2002). *Botanique Systématique, Une Perspective Phylogénétique*. De Boeck Universités, Paris.

Références bibliographiques

- K**azemi M.(2015). Chemical Composition And Antioxidant Properties Of The Essential Oil Of *Nigella Sativa* L. Bangladesh J. Bot. (March); 44(1): 111-116,
- Khan, M. (1999). Chemical Composition and Medicinal Properties of *Nigella Sativa* L. in *Inflammopharmacology*, 7 (1), 15-35.
- Knight J. (1999). *A Free Radicals, Antioxidants, Aging, & Disease*. Washington D.C.: Aacc Press; 20: 21-43.
- Koehler-Ramonatxo, C. (2006). Oxygen, Oxidative Stress And Antioxidant Supplementation, Or An Other Way For Nutrition In Respiratory Diseases. *Nutrition Clinique Et Métabolique*. 20:165-177.
- Kohen, R., Nyska, A. (2002). Oxidation Of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions And Methods For Their Quantification. *Toxicologic Pathology*. 30: 620-650.
- Koppenol W. H. (2001). 100 Years Of Peroxynitrite Chemistry And 11 Years Of Peroxynitrite Biochemistry. *Redox Rep*; 6(6): 339-41.
- L**ehucher-Michel, M.P., Lesgards, J.F., Delubac, O., Stocker, P., Durand, P., Prost, M. (2001). Stress Oxydant Et Pathologies Humaines. *La Presse Médicale*. 30: 1076-1081.
- Lenzi F. (2011). Le Stress Oxydant Cellulaire. Contribution A L'étude Du Stress Oxydant Cellulaire Chez Le Chien De Traineau En Course De Sprint. Ed, Université Vetagro Supcampus Veterinaire De Lyon; P 25-56.
- M**artínez-Cayueta, M. (1995). Oxygen Free Radicals And Human Disease. *Biochimie*. 77: 147-161.
- Mcvean M., Kramer-Stichland K., Liebler Dc. (1999). Oxidants And Antioxidants In ultra violet induced Non melanoma Skin Cancer In: Papas Am, Editor. *Antioxidant status, Diet, Nutrition, And health*. Boca Raton, Fla.:Crc Press; P401-30.
- Meral, I., Yener, Z., Kahraman, T., & Mert, N. (2001). Effect Of *Nigella Sativa* L. on Glucose Concentration, Lipid Peroxidation, Anti-Oxidant Defence System And Liver Damage In Experimentally Induced Diabetic Rabbits. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* , 48, 593-599.
- Merfort I. ; Wray V. ; Barakat H.H. ; Hussein S.A.M. ; Nawwar M.A.M. ; Willuhn G. (1997). Flavonol Triglycosides From Seeds Of *Nigella Sativa* L. *Phytochemistry*: 46 359-363
- Moller P., Wallin H., Knudsen L. E. (1996). Oxidative Stress Associated With Exercise, Psychological Stress And Life-Style Factors. *Chem Biol Interact*; 102: 17-36.
- Morikawa T., Xu F., Kashima Y., Matsuda H., Ninomiya K., Yoshikawa M. (2004a). Novel Dolabellane-Type Diterpene Alkaloids With Lipid Metabolism Promoting Activities From The Seeds Of *Nigella Sativa* L. *Organic Letters*; 6: 869-872.
- Morikawa T., Xu F., Ninomiya K., Matsuda H., Yoshikawa M. Nigellamines A3, A4, A5 And C.(2004b). New Dolabellane-Type Diterpene Alkaloids, With Lipid Metabolism Promoting Activities From The Egyptian Medicinal Food Black Cumin. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*.; 52: 494-497.
- N**air, M., Vasudevan, P., & Venkitanarayanan, K. (2005). Antibacterial Effect Of Black Seed Oil On *Listeria Monocytogenes* .*Food Control* , 16,395-398.

Références bibliographiques

Nergiz, C., Otlés, S. (2003). Some Characteristics Of Nigella (*Nigella Sativa* L.) Seed Cultivated In Egypt And Its Lipid Profile. Food Chemistry, 83: 63-68

Neuzil, J., Stocker, R. (1993). Bilirubin Attenuates Radical-Mediated Damage To Serum Albumin. Febs Letters. 331: 281-284.

Nickavar, B., Mojaba, F., Javidniab, K., Amolia, M. A. R. (2003). Chemical Composition Of The Fixed And Volatile Oils Of *Nigella Sativa* L. From Iran. Journal Of Biosciences, 58: 629-631.

Noctor G, Foyer Ch. (1998). Ascorbate And Glutathion: Keeping Active Oxygen Under Control. Annu. Rev.Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol; 49 : 249-279.

Orsi-Llinares F.(2005). La Nigelle, Une Epice D'intérêt Médicinal. Thèse De Pharmacie. Université De Grenoble.

Ozenda P. (2000). Les Végétaux : Organisation Et Diversité Biologique.2^{ème} Edition Dunod, Paris.

Pal Yu, B. (1994). Cellular Defencesagainst Damage Fromreactiveoxygenspecies. Physiopathologicalreviews. 74: 139-155.

Parihar, A., Parihar, Ms., Milner, S. (2008). Bhat S. Oxidative Stress And Antioxidative Mobilization In Burn Injury. Burns, 34:6-17.

Penna, C., Mancardi, D., Rastaldo, R., Pagliaro, P. (2009). Cardio Protection: A Radical View Free Radicals in Pre and Post Conditioning. Biochimica Et Biophysical Acta, 1787: 781-793.

Pham-Huy, M., ET Hébuterne, X. (2008).Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. International Journal Of Biochemical Science, 4(2):89-96.

Pietta, P.G. (2000). Flavonoids As Antioxidants. Journal Of Natural Products. 63: 1035-1042.

Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.O. (2002). Physiological Action Of Antioxidant Aaaadefences. Nutrition Clinique Et Métabolisme. 16: 233-239.

Ramadan M. F., Mörsel J.T. (2002). Direct Isocratic Normal-Phase Hplc Assay For Fat Soluble Vitamins And B-Carotene In Oil Seeds. European Food Research And Technology; 214: 521-527.

Ramadan, M.F., Mörsel, J.T. (2002a). Characterization Of Phospholipid Composition Of Black Cumin (*Nigella Sativa* L.) Seed Oil. Nahrung Food. 46: 240-244.

Robineau P., Mercier T. (2012). Quelle Evaluation Pour Les Produits Phytopharmaceutique Which Assessment For Plant Protection Products. Archiv Des Maldies Professionnelles Et De L'environnement ; 6 :927-933.

Rolfe D. F., Brown G. C. (1997). Cellular Energy Utilization And Molecular Origin Of Standar Metabolic Rate In Mammals. Physiol. Rev; 77(3) : 731-58.

Ruch Rj, Cheng Sj, Klaunig Je. (1989). Prevention Of Cytotoxicity And Inhibition Of Intercellular Communication By Antioxidant Catechins Isolated From Chinese Green Tea. Carcinogenesis. 10: 1003- 1008.

Références bibliographiques

Sachdev, S., Davies, K.J.A. (2008). Production, Detection, And Adaptive Responses To Free Radicals In Exercise. *Free Radical Biology & Medicine*. 44: 215–223.

Salem, M.L. (2005). Immunomodulatory And Therapeutic Properties Of The *Nigella Sativa* L. Seed. *International Immunopharmacology*. 5: 1749-1770.

Salem, M.L., Hossain, M.S. (2000). Protective Effect Of Black Seed Oil From *Nigella Sativa* L. Against Murine Cytomegalovirus Infection. *International Journal Of Immunopharmacology*. 22: 729-740.

Salomi, N., Nair, S., Jayawardhanan, K., Varghese, C., & Panikkar, K. (1992). Antitumour Principles From *Nigella Sativa* L. Seeds. *Cancer Letters*, 63, 41-46.

Seifried, H. E., Anderson, De., Fisher Ei, Milner Ja. (2007). A Review of the Interaction among Dietary Antioxidants and Reactive Oxygen Species. *Journal Of Nutritional Biochemistry*; 18: 567–579.

Shabana A., El-Menyar A., Asim M., Al-Azzeh H., Al Thani H. (2013). Cardiovascular Benefits Of Black Cumin (*Nigella Sativa* L.). *Cardiovascular Toxicol* ; 13: 9-21.

Smirnoff N and Cumbes QJ. (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*. 28, 1057-1060.

Sorg, O. (2004). Oxidative Stress: A Theoretical Model Or A Biological Reality. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences et des Lettres de Paris*. 327: 649-662.

Spichiger R.E. ; Savolainen V.V. ; Figeat M. ; Jeanmonod D. (2002). *Botanique Systématique Des Plantes A Fleurs*. Lausanne: 2^{ème} édition Presses Polytechniques Et Universitaires Romandes.

Sturtz L. A., Diekert K., Jensen L. T., Lill R., Culotta V. C. (2001). A Fraction Of Yeast Cu,Zn-Superoxide Dismutase And Its Metallochaperone, Ccs, Localize To The Intermembrane Space Of Mitochondria. A Physiological Role For Sod1 In Guarding Against Mitochondrial Oxidative Damage. *J Biol Chem*; 276: 38084-38089.

Sutherland B. M, Harber Lc, Kochevar Ie. (1980). Pyrimidin Dimer Formation And Repair In Human Skin. *Cancer Res*; 40:3181-5.

Takruri H.R.H. (1998). Dameh M.A.F. Study of the Nutritional Value of Black Cumin Seeds (*Nigella Sativa* L.). *J.Sci.Food Agric*: 76 404-410

Thippeswamy, N.B., Akhilender, N.K. (2005). Antioxidant Potency Of Cumin Varieties-Cumin, Black Cumin And Bitter Cumin-On Antioxidant Systems. *European Food Research And Technology*. 220: 472- 476.

Tuter, M., Secundo, F., Riva, S., Aksoy, H. A., Ustun, G. (2003). Partial Purification Of *Nigella Sativa* L. Seed Lipase And Its Application. In *Transesterification Reactions*. *Journal Of The American Oil Chemists' Society*, 80: 43-48.

Üstun, G., Kent, L., Cekin, N., Civelekoglu, H. (1990). Investigation Of The Technological Properties Of *Nigella Sativa* L. (Black Cumin) Seed Oil. *Journal Of The American Oil Chemists' Society*, 67: 958-960.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free Radicals And Antioxidants In Normal Physiological Functions And Human Disease. *Biocell*. 39: 44-84.

Références bibliographiques

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006). Free Radicals, Metals And Antioxidants In Oxidative Stress-Induced Cancer. *Chemico-Biological*

Willcox L. K., Ash S. L., Catignani G. L. (2004). Antioxidants And Prevention Of Chronic Disease. *Cru Rev Food Sei Nutr*; 44: 275-295.

Zweier, J.L., Talukder, M.A.H. (2006). The Role Of Oxidants And Free Radicals In Reperfusion Injury. *Cardiovascular Research*. 70: 181-190.

Résumé

RÉSUMÉ

Les espèces oxygénées réactives (ERO) ont une grande capacité d'endommager presque tous les types de constituants cellulaires et tissulaires dans l'organisme, ce qui explique leur implication dans l'induction et/ou l'amplification de plusieurs pathologies tel que : le cancer, l'hépatotoxicité ...etc. La supplémentation de l'organisme par des antioxydants exogènes s'avère très utile pour lutter contre ces espèces nocives.

Ce travail de recherche a pour but d'estimer l'activité antioxydante notamment l'activité antiradicalaire de l'huile totale et ses fractions neutres de *Nigella,sativa* L. On a commencé le travail par l'extraction de l'huile totale, ensuite on a procédé au fractionnement de l'huile totale pour obtenir quatre différentes fractions selon leur polarité et finalement on a testé l'activité antiradicalaire de ces fractions vis-à-vis les trois espèces réactives de l'oxygène les plus présentées dans notre organisme ; le radical hydroxyle (OH^{*}), le radical anion superoxyde (O₂^{•-}) et le peroxyde d'hydrogène(H₂O₂).

Le rendement obtenu de l'huile totale est de 11.7904 mg/ml qui correspond de 13,61% des graines et les rendements obtenus des différentes fractions : la FCH, FAC, FMOH, FAcAC sont respectivement de 68.53, 2.98, 1.11, 1.21% de l'huile totale.

D'après les résultats obtenus dans ce travail, on peut dire que les graines de *Nigella sativa* L. possèdent une activité antioxydante considérable qui est localisée dans les huiles de cette plante.

Mots-clés : *Nigella sativa* L. l'huile totale, fractions neutres, stress oxydatif, ERO, ERN, oxydant/ antioxydant, activité antiradicalaire.

Résumé

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) have a great ability to damage almost cellular and tissue constituents types in the body, which explains their involvement in the induction and / or amplification of several pathologies such as: cancer, hepatotoxicity ... etc. The supplementation of the body by exogenous antioxidants is very useful to fight against these harmful species.

This research work aims to estimate the antioxidant activity including the antiradical activity of the total oil and its fractions of *Nigella sativa* L. We started the work by extracting total oil, then we have fractionated it to obtain four different fractions according to their polarity and finally we tested the antiradical activity of these fractions *vis-à-vis* the three most reactive oxygen species presented in our body; the hydroxyl radical (OH[•]), the superoxide anion radical (O₂^{•-}) and hydrogen peroxide (H₂O₂).

The yield obtained of total oil is 11.7904 mg /ml, which corresponds to 13.61% of seeds, and the yields obtained of the different fractions FCH, FAC, FMOH, FAcAC are respectively 68.53, 2.98, 1.11, and 1.21% of the total oil.

From the results obtained in this work, it can be said that the seeds of *Nigella sativa* L. possess considerable antioxidant activity, which is localized in the oils of this plant.

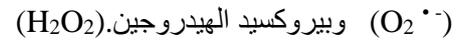
Keywords: *Nigella sativa* L. total oil, neutral fractions, oxidative stress, ERO, ERN, oxidant / antioxidant, antiradical activity.

Résumé

الملخص

تتمتع الأنواع التفاعلية للأكسجين (ROS) بقدرة كبيرة على إتلاف جميع أنواع المكونات الخلوية والأنسجة في الجسم تقريباً، مما يفسر مشاركتها في تحريض و / أو تضخيم العديد من الأمراض مثل : السرطان، سمية الكبد... الخ مكملات الجسم مفيدة للغاية لمحاربة هذه الأنواع الضارة عن طريق مضادات الأكسدة الخارجية..

يهدف هذا العمل البحثي إلى تقدير نشاط مضادات الأكسدة بما في ذلك النشاط المضاد للجراثيم من إجمالي الزيت *Nigella sativa L.* وجزياته المحايدة. لقد بدأنا العمل من خلال استخراج الزيت الكلي، ثم تجزئته للحصول على أربعة كسور مختلفة طبقاً لقطبيتها، وأخيراً قمنا باختبار النشاط المضاد للجراثيم لهذه الكسور مقابل الأنواع الأكسجين الثلاثة الأكثر تفاعلية الموجودة في أجسامنا؛ جذري الهيدروكسيل (OH^{*}) ، جذري أنيون الفائق



العائد الذي تم الحصول عليه من إجمالي النفط 11.7904 ملغ / مل وهو ما يعادل 13.61 ٪ من البذور والعوائد التي تم الحصول عليها من الكسور المختلفة FCH ، FAC ، FMOH ، FAcAC هي على التوالي 68.53 ، 2.98 ، 1.11 ، 1.21 ٪ من مجموع النفط.

من النتائج التي تم الحصول عليها في هذا العمل، يمكن القول إن بذور *Nigella sativa L.* تمتلك نشاطاً كبيراً مضاداً للأكسدة وهو موضعي في زيوت هذا النبات.

الكلمات المفتاحية : الزيت الكلي، الكسور المحايدة، الإجهاد التأكسدي، ERO ، ERN الأكسدة / مضادات الأكسدة، النشاط المضاد للجراثيم.

Thème :
Etude de l'activité antiradicalaire des fractions de l'huile totale de *Nigella sativa* L.

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

RÉSUMÉ

Les espèces oxygénées réactives (ERO) ont une grande capacité d'endommager presque tous les types de constituants cellulaires et tissulaires dans l'organisme, ce qui explique leur implication dans l'induction et/ou l'amplification de plusieurs pathologies tel que : le cancer, l'hépatotoxicité ...etc. La supplémentation de l'organisme par des antioxydants exogènes s'avère très utile pour lutter contre ces espèces nocives.

Ce travail de recherche a pour but d'estimer l'activité antioxydante notamment l'activité antiradicalaire de l'huile totale et ses fractions neutres de *Nigella sativa* L. On a commencé le travail par l'extraction de l'huile totale, ensuite on a procédé au fractionnement de l'huile totale pour obtenir quatre différentes fractions selon leur polarité et finalement on a testé l'activité antiradicalaire de ces fractions vis-à-vis les trois espèces réactives de l'oxygène les plus présentées dans notre organisme ; le radical hydroxyle (OH^{*}), l'anion superoxyde (O₂^{*-}) et le peroxyde d'hydrogène(H₂O₂).

Le rendement obtenu de l'huile totale est de 11.7904 mg/ml qui correspond de 13,61% des graines et les rendements obtenus des différentes fractions : la FCH, FAC, FMOH, FAcAC sont respectivement de 68.53, 2.98, 1.11, 1.21% de l'huile totale.

D'après les résultats obtenus dans ce travail, on peut dire que les graines de *Nigella sativa* L. possèdent une activité antioxydante considérable qui est localisée dans les huiles de cette plante.

Mots-clés : *Nigella sativa* L. l'huile totale, fractions neutres, stress oxydatif, ERO, ERN, oxydant/antioxydant, activité antiradicalaire.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de la Biochimie

Devant le jury :

- ✚ Président du jury: Mme. MADI Aicha (MCB)
- ✚ Rapporteur : Melle. MOSBAH Asma (MCA)
- ✚ Examineurs : Mme. CHERFIA Radia (MAA)

Date de soutenance : 17/07/2019

Résumé

Résumé
