



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية

Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie/Nutrition Moléculaire et Santé

Intitulé :

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

Présenté et soutenu par :

Le :27 /09/2017

DERNOUNE Ouissal et HAMMA Rayene

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : MAAMMARI-HABIBATNI Zineb (MCA- UFM Constantine).

Rapporteur : MOSBAH Asma (MCB- UFM Constantine).

Examinatrice : HALMI Sihem (MCB- UFM Constantine).

Année Universitaire 2016/2017

Remerciements

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

Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre promotrice Dr.

MOSBAH ASMA

Enseignante au Département de Biologie Appliquée à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université CONSTANTINE 1, qui nous a encadrées et dirigées ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'il nous accordé nous ont permis de réaliser ce travail.

Nous offrons nos plus sincères remerciements à membres jurées ;Dr.

MAAMMARI-HABIBATNI Zineb Enseignante au Département de Biologie Animale à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université CONSTANTINE 1 et Dr. HALMI Sihem Enseignante au Département de Biologie Appliquée à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université CONSTANTINE 1, pour ses précieuses remarques pour corriger ce travail et pour l'assistance par des conseils objectifs et éclairés.

Nous remercions aussi tous les membres de la bibliothèque de Département des Sciences Biologiques à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université CONSTANTINE 1

Un grand merci à tous les enseignants du département des sciences de la nature et la vie de l'université CONSTANTINE1.

Nos vifs et sincères remerciements s'adressent tout particulièrement à notre Université de

Constantine 1 qui nous a procuré une bonne formation

DÉDICACE

Je dédie ce travail à Ma famille

***DERNOUNE** et aux personnes les plus chères au monde mes chers*

parents :

*A mon père **Noureddine** :*

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

*A ma très chère mère **Rabia** :*

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 mari **Boubakeur** et sa famille **Boukrouri***

qui n'a jamais cessé de croire source d'amour et de tendresse sans toi ce succès n'aurait jamais un le jour...

Sans oublier mes jumeaux, que Dieu ait pitié d'eux, qui j'ai souhaité leur présence

MOHAMED IYED** et **AHMED SADEN

*A ma belle-mère **Djamila***

*A mon beau-père **Zoioui***

A mes frères et mes beaux frères

A mes sœurs et mes belles sœurs

Je dédie spécial

A mes nouveaux : Amar, Mohamed Amine et Ayhem

A mes meilleurs amis: Ahlem, Aicha, Asma, Bouchra

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

A La promotion de biochimie master 2.

WISSAL

DÉDICACE

Je dédie ce travail à Ma famille

HAMMA et aux personnes les plus chères au monde mes chers

parents :

A mon père MOUHAMED:

Qu'il restera à jamais gravé dans mon Coeur et mon esprit. Paix à son âme.

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.

A ma très chère mère ZELIKHA :

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 mes frères et ses maries

A mes sœurs et ses maris

Je dédie spécial

A mes nouveaux :Taha Amine, Mohamed Yacine, Yahia , anes ,et Mouhamed

A mes nièces: Norhene, Loujaine, Nada, Jana, Zahra, Marame , Ghoufrane et les belle jumeaux Ranim et Tasnim

A mes meilleurs amies:Ahlem, Aicha, Asma, Bouchra

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

A La promotion de biochimie master 2.

Sans oublier a Tous ceux qui ont connus.

Rayene

Sommaire

Liste des abréviations
Liste des figures
Liste des tableaux

Introduction.....	1
Etude bibliographique	
Chapitre I : La plante de <i>Nigella sativa</i>	
1- Description botanique.....	2
2-Classification.....	3
3-Histoire et utilisation traditionnel de <i>Nigella.sativa</i>	3
4-Composition chimique des graines de <i>Nigella.sativa</i>	4
4.1-les huiles de <i>Nigella.sativa</i>	4
4.1.1-Les huiles fixe.....	4
4.1.2-L'huile essentielle.....	5
4.1.3-Obtention de l'huile de <i>Nigella.sativa</i>	5
5.2-Les alcaloides.....	6
4. 3-Les triterpenes saponines.....	6
4.4-Dérivés phénoliques et flavonoides.....	6
4.5-Les proteines.....	7
4.6-Les vitamines et les sels minéraux.....	7
5-Les activités biologique.....	7
5.1-Effet antioxydant.....	8
5.2-Effet sur le système immunitaire.....	8
5.3-Effet anti-inflammatoire	8
5.4-Effet antibactérienne et antifongique.....	8
5.5-Effet anti-tumoral.....	9

Chapitre II : Le stress oxydatif

1-Définition de stress oxydatif.....	10
2-Les radicaux libres.....	10
3-Nature et sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène.....	10
3.1-L'anion super oxyde.....	10
3.2-Le peroxyde d'hydrogène.....	11
3.3-Le radical hydroxyle.....	12
3.4-Les radicaux alkyl et peroxy.....	12
3.5-L'oxygène singulet.....	13
3.6-Le monoxyde de l'azote	13
4-Les endommagements provoqués par les ROS.....	14
4.1-Peroxydation lipidique.....	14
4.2-Oxydation des protéines.....	14
4.3-Dommages de l'ADN.....	15
4.4-Activation du pore de transition de perméabilité.....	16
5-Les antioxydants.....	16
5.1-Les antioxydants endogènes.....	17
5.1.1- Superoxyde dismutase SOD.....	17
5.1.2-Glutathion peroxydase.....	17
5.1.3-Catalase.....	18
5.1.4-Acide urique.....	18
5.1.5-Bilirubine	18
5.1.6-Acide lipoïque.....	19
5.2-Les antioxydants exogènes.....	19
5.2.1-La vitamine E ou α tocophérol.....	19
5.2.2-La vitamine C ou ascorbique.....	20

5.2.3-Les antioxydants exogènes phénoliques.....	20
a-Les antioxydants exogènes phénoliques naturels.....	21
a.1-Les flavonoïdes.....	22
a.2-Les acides phénoliques.....	22
a.3-Le resveratol.....	22
a.4-Les tanins.....	23
b-Les antioxydants exogènes phénoliques de synthèse.....	24

Partie expérimentale

Chapitre III :Matériels et méthodes

1-Matériels	25
2-Méthodesd'extraction.....	25
3- Analyse des extraits des graines de <i>Nigella sativa</i>	25
3.1-Dosage des composés phénoliques	25
3.2-Dosage des flavonoïdes	26
4- Tests, in vitro, de l'activité antioxydante.....	26
4.1- Effet scavenger du radical DPPH	26
3.2- Pouvoir réducteur	27
5-Analyse statistique	28

Chapitre IV : Résultats et discussion

1- Rendement de l'extraction	29
2- Caractérisation des graines de <i>Nigella sativa</i>	29
2.1-Dosage des polyphénols totaux	29
2.2- Dosage des flavonoïdes	30
3-Tests ,in vitro,de l' activité antioxydante	31
3.1- Effet scavenger du radical DPPH	31
3.2- Pouvoir réducteur	33
Conclusion	35

Liste des abréviations :

- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- AGPI** : Acide gras poly insaturé
- AlCl₃** : Chlorure d'aluminium
- ATP** : Adénosine -triphosphate
- Apaf1** : Apoptosis activating factor 1
- CCL4** : Tetrachloromethane ou tetrachlorure de carbone
- CD4** : Cluster de différenciation
- CD8** : Cluster de différenciation 8
- CO₂** : Dioxyde de carbone
- CO₃** : Trioxyde de carbone
- Cu²⁺** : ion de cuivre
- DPPH** : 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl
- EAG** : Equivalent d'acide gallique
- EC50** : Concentration effective à 50%
- EOR** : Espèces réactives de l'oxygène.
- EQ** : Equivalents de quercétine
- Fe²⁺** : Ferrique
- FeCl₃** : Chlorure de fer
- GC-MS** : Gras chromatography-Mass spectroscopy
- GSH** : Glutathion réduit ou glutathion
- GSSG** : Glutathion oxydé ou disulfure de glutathion
- HClO** : Acide hypochloreux
- 4-HNE** : 4-hydroxynonanal
- HPLC** : Chromatographie liquide a haute performance
- HSP** : Heat shock proteins
- LDL** : Lipoprotéines à basse densité (low density lipoproteins)
- MDA** : Malodialdéhyde
- NaHPO₄** : Hydrogénophosphate de sodium
- NaH₂PO₄** : Dihydrogénophosphate de sodium
- NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
- NK** : Natural killer
- NO** : monoxyde d'azote
- NO₂** : Dioxyde d'azote

O₂⁻ : Anion superoxide

OH⁻ : Ion hydroxide

ONOOH : Peroxynitrite

PL : Phospholipide

PTP : Pore de transition perméabilité

RL : Radical libre

ROS : Reactive oxygen species (dérivés réactifs de l'oxygène).

RSNO : S-nitrothiols

SOD : Super oxyde dismutases

TBARS : Acide thiobarbiturique

TBHQ :Tert-Butylhydroquinone

α-Toch : α-Tocophérol

UCP: Uncoupling protein

Liste des figures :

Figure 1 : Fleur et graines de <i>Nigella sativa</i> a reproduction autonome.....	2
Figure 2 : Structure de la vitamine E	19
Figure 3 : Structure de la vitamine C	20
Figure 4 : Structures de quelques flavonoïdes.....	22
Figure 5 : Structures des acides phénoliques et trans resvératol.....	23
Figure 6 : Unité monomère de base pour les ellagitannins	23
Figure 7 : Droite d'étalonnage d'acide gallique.....	30
Figure 8 : Droite d'étalonnage de quercetine.....	31
Figure 9 : Courbe de pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par différents concentration de la quercetine	31
Figure 10 : Courbe d'activité antioxydant de l'huile totale de <i>Nigella sativa</i> vis-à-vis du radical libre DPPH	32
Figure 11 : Courbe de pouvoir réducteur de quercetine	33
Figure 12 : Courbe de pouvoir réducteur de l'huile total de <i>Nigella sativa</i>	34

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Les grandes familles de polyphénols.....	21
Tableau 2 : Rendement d'extraction de l'huile totale de <i>Nigella sativa</i>	29
Tableau 3 : Tenneur en acide gallique µg EAG/g d'extrait.....	29
Tableau 4 : Tenneur en quercetine µg EQ/g d'extrait.....	30
Tableau 5 : La concentration d'inhibition de l'huile totale de <i>Nigella sativa</i>	32
Tableau 6 : La concentration effective de l'huile totale de <i>Nigella sativa</i>	34

INTRODUCTION :

Depuis quelques années, un nouveau concept est envahi le monde des sciences biologiques et médicales, celui du « stress oxydant », qui est la situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive des radicaux oxygénés toxiques, qui sont potentiellement impliqués dans de nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associés à des complications lors de leurs évolutions comme dans le cas du cancer, diabète, les maladies cardiovasculaires et neurodégénérative. Ces dommages sont réalisés par l'attaque des radicaux libres sur de divers biomolécules, en particulier les protéines, les lipides et l'ADN, ayant finalement comme conséquence la dégradation et la mort de cellules. (Moon et Shibamoto, 2009). Pour échapper aux conséquences du stress oxydant, il est nécessaire de rétablir l'équilibre oxydant / antioxydant afin de préserver les performances physiologiques de l'organisme. Les antioxydants font actuellement l'objet de nombreuses études car, en plus d'un intérêt certain dans la conservation des denrées comestibles, ils pourraient s'avérer utiles dans la prophylaxie et le traitement des maladies dans lesquels le stress oxydant est incriminé.

Les antioxydants naturels, issus de plantes médicinales, constituent une source inépuisable de substances ayant des activités biologiques et pharmacologiques très variées. Selon l'organisation Mondiale de la Santé (OMS), a estimé que environ 80% de la population des pays en voie de développement a toujours eu recours à la médecine traditionnelle dans les soins de santé primaire (Newman *et al*, 2000 ; Calixto, 2005). Parmi ces plantes *Nigella sativa* est l'une des plantes médicinales les plus utilisées à travers le monde. Les extraits des graines de cette plante sont largement utilisés, dans la médecine traditionnelle, depuis des siècles contre une multitude de maux, et notamment comme antibactériens et antifongiques, anti tumoral et anti-inflammatoire.

Ce travail de recherche est inscrit dans l'évaluation de l'activité antioxydante de l'huile totale de cette plante ; il est organisé en trois parties ; la première partie est une étude bibliographique constituée de deux chapitres ; le stress oxydatif et *Nigella sativa* , la deuxième partie est matériel et méthodes et la troisième partie présente les résultats et les discussions et finalement on a terminé par conclusion et perspectives.

Etude bibliographique

1-Description botanique :

Le nom de *Nigella* est provient du latin *nigellus* "noirâtre", la nigelle a des petites graines aromatiques menées d'un noire intense communément connues sous le nom de cumin noire, black seed en anglais, *Habbat el baraka* ou encore *El habbah sauda* dans les pays arabes, *Sinoudj* en Algérie (Ghedira, 2006).

Nigella sativa est une plante herbacée appartenant à la famille des *Renonculacées* (Guignard, 2001) Cette plante est annuelle, à tige dressée, côtelée, anguleuse et rameuse d'une soixantaine de centimètres de hauteur, portant des feuilles inférieurs pétiolées et des feuilles supérieurs sessiles.

Les graines sont ovoïdes et couvertes de tubercules granuleux ; triangulaires et ridées transversalement (Benkaci- Ali, 2007) (figure 1). Dont le fruit est une capsule formée de 3 à 6 carpelles soudés entre eux jusqu'à la base des styles persistants (Bonnier, 1990), Chaque capsule contient plusieurs graines triangulaires blanchâtres et, à maturité s'ouvrent et l'exposition des graines à l'air les rend noire. Ces graines sont ovoïdes de 2 à 3.5 mm et présentent 3 à 4 angles avec une face supérieure finement granuleuse et réticulée (Ghedira, 2006).



Figure1. Fleur et graines de *Nigella sativa* à reproduction autonome (Benkaci- Ali, 2007).

2- Classification :

La classification botanique de *Nigella sativa* est basée sur les critères morphologiques, anatomiques et chimiques. Cette plante fait partie de :

- Règne : végétal
- Embranchement : *Spermaphytes*
- Sous- Embranchement : *Angiospermes*
- Classe : *Dicotylédones*
- Ordre : *Renonculales*
- Famille : *Renonculaceae*
- Genre : *Nigella*
- Espèce : *Nigella sativa* (Guignard, 2001).

3- Historique et utilisation traditionnelle de *Nigella sativa*:

L'utilisation thérapeutique de cette plante remonte à des temps très anciens. Des fossiles du début du Crétacé (-250 millions d'années) prouvent l'existence des Nigelles à la fin de l'Ère secondaire (Bittkau, 2005). Tout d'abord la civilisation sumérienne, serait à l'origine de l'utilisation des plantes comme sources de « médicaments ». Ils étaient établis un recueil, sous forme de tablettes d'argile, contenant des formules végétales gravées en caractères cunéiformes et datant de 5000 ans. Par ailleurs, la civilisation égyptienne fait état de la pharmacopée égyptienne, elle est citée *Nigelle* comme médicament pour traiter la toux et les maladies pulmonaires.

La civilisation gréco-romaine, notamment grâce à Hippocrate (460-377 av. J.-C.), ont mentionné près de 400 remèdes à base de plantes dont la *Nigelle*. Claude Galien médecin attitré de l'Empereur Marc Aurèle a amélioré et conseillé de brûler les graines de *Nigelle* pour tuer les moucheron et les moustiques; et Tragus les employait comme antihelminthiques (Chamseddine, 2006).

En Cilicie (le sud de la Turquie actuelle), Pedanius Dioscoride utilise les graines de *Nigella sativa* contre les maux de tête, les affections des yeux, les maux de dents et les morsures d'araignées. Oribase, médecin grec du 4e siècle de l'ère chrétienne, il composa un corpus de médecine. Dans un synopsis, il donne une recette à base de *Nigelle*, pour lutter contre les symptômes Pâles couleurs, taches livides.

Le champ d'application thérapeutique de cette plante, telle est la recommandation faite par le prophète Mohammed au 7^e siècle : « Soignez-vous en utilisant la graine de *Nigelle*, c'est un remède contre tous les maux à l'exception de la mort ».

Né près de Boukhara en Perse (actuel Ouzbékistan), Abu Ali Al-Hussein Ibn Abdallah Ibn Sina, (980-1037), Ils conseillaient de griller les graines et de les réduire en poudre, puis de placer cette préparation dans une bourse en tissu et d'inhaler quotidiennement pour désobstruer les voies nasales (Al-nassimi,1984), aussi dans la dyspnée et dans le traitement de l'asthme et des bronchites. Cette même préparation, prise avec de l'eau bouillie, possède des actions diurétiques et dissolvantes des calculs rénaux (Ibn-sina, 1972). D'autre part, la prise de l'huile de *Nigelle* avec de l'huile d'olive était très réputée comme aphrodisiaque. À la *Nigelle* on reconnaît aussi des propriétés emménagogues, galactagogues, abortives, vermifuges et ténicides.

4-Composition chimique des graines de *Nigella sativa*:

D'après une analyse réalisée sur des graines de *Nigella sativa* de Turquie en 1993 (Nergiz et Otles, 1993), la composition générale des graines de *Nigella sativa* montre une teneur relativement importante en glucides (37,4%), en lipides (32%) et en protéines (20%) (Orsillinares, 2005). Les valeurs et proportions fournies par la littérature diffèrent d'un auteur à l'autre; la variété et l'origine des échantillons peuvent en être partiellement responsables (Tiendrebeogo, 2012).

4.1-les huiles de *Nigella sativa*

4 .1.1-Les huiles fixes :

Les huiles fixes représentent 37,9-39,2% du poids de la graine. Elle est constituée principalement de lipides neutres 96,1-97,2%, de lipides polaires 3% et de phospholipides 0,32-1,05% (Ramadan et Mörsel, 2002a).

Les stérols représentent environ 2% de l'huile fixe. On y trouve aussi des stérols libres et estérifiés. L'analyse des stérols libres montre que le β -sitostérol représente le composant majeur soit 60% des stérols, puis arrive le stigmastérol avec environ 20%. On peut rencontrer le cholestérol à l'état de traces, environ 1% (Ramadan et Mörsel, 2002b ; Cheikhrouhou, 2008 ; Hamrouni-sellami, 2008).

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).

-L'analyse des phospholipides par (HPLC) a permis d'identifier principalement sept constituants où le phosphatidyl choline représente le composant majoritaire (46% des PL) (Ramadan et Mörsel, 2002).

4.1.2- L'huile essentielle :

L'huile essentielle représente entre 1,4 à 1,9 % du poids de l'huile fixe et 0,18 à 0,50 % du poids des graines (Benkaci- Ali et al, 2006). L'analyse de cette huile par GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectroscopy) réalisée par l'équipe de Bucar (2000) a permis d'identifier 32 composants, dont la majorité d'entre eux sont ; la thymoquinone (27,8-57 %), le p-cymène (7,07-15,83 %) et le carvacrol (5,8-11,6 %) (Burits et Bucar, 2000).

Contrairement à l'étude précédente, Moretti et ses collaborateurs (2004), ses résultats ont montré que le composant majeur est le p-cymene suivi du thymol alors que la thymoquinone présente un taux faible. La particularité de l'huile de *Nigella sativa* est la présence de quinones : thymoquinone et thymohydroquinone ; et d'un composé phénolique : thymol. Ces quinones sont les composés actifs de l'huile qui lui confèrent ses propriétés pharmacologiques. La photodimérisation de la thymoquinone aboutit à la dithymoquinone anciennement citée sous le nom de nigellone (Orsi- Ilinares, 2005).

4.1.3 -Obtention de l'huile de *Nigella sativa*:

L'intérêt thérapeutique de *Nigella sativa* réside en grande partie dans l'utilisation de son huile obtenue à partir de la récolte de ses graines. L'huile végétale de nigelle peut être obtenue par pression à froid (extraction mécanique) ou par des techniques de pression à chaud permettant un meilleur rendement. L'huile peut être aussi extraite chimiquement avec l'aide d'un solvant.

Les huiles obtenues à chaud ou au moyen de produits chimiques doivent subir par la suite un raffinage par une série de divers traitements plus ou moins nocifs pour certains composés de l'huile pouvant ainsi diminuer sa qualité.

4.2- Les Alcaloïdes :

Dans les graines de *Nigella sativa* 12 alcaloïdes ont été retrouvés;

- Nigellicine (Atta-Ur-Rahman et al, 1985a) .
- Nigellimine N-oxyde (Atta-Ur-Rahman et al, 1985b) .
- Nigellidine, ayant un noyau indazol (Atta-Ur-Rahman et al, 1993) .
- L'isoquinone nigellimine (Atta-Ur-Rahman et al, 1992) .
- les alcaloïdes diterpènes Dollablane-types nigellamines A1, A2, B1, B2 (Morikawa et al, 2004a), A3, A4, A5, et C (Morikawa et al, 2004b).

Ce qui est très intéressant dans la graine de *Nigella sativa* c'est cette présence concomitante de 12 alcaloïdes de trois structures de base différentes, ces alcaloïdes est une caractéristique rarement observée dans d'autres plantes (Orsi– Ilinares, 2005).

4.3- Les triterpènes saponines :

Les saponosides sont des hétérosides de stérols ou de triterpènes. Ils libèrent par hydrolyse un ou plusieurs oses et une génine (sapogénine). De nombreux saponosides ont déterminés à partir des graines, de l'extrait éthanolique et des huiles de *Nigella sativa* (Ansari *et al*, 1975 ; Greenish, 1880 ; Abdel-Aal et Attia, 1993).

A partir des graines de *Nigella sativa* une saponoside triterpénique douée de propriétés anti tumorales appelée l' α -hederine. L'extrait méthanolique de la *Nigelle* égyptienne, a menée à l'isolement de deux triterpène saponines, appelés sativosides A et B, douées d'une activité anti-inflammatoire (Bhupendra *et al*, 2009). Un autre triterpène glycosylé a été identifiée dans l'extrait éthanolique des graines (Bhupendra et al, 2009).

4.4- Dérivés phénoliques et flavonoïdes :

En Turquie, Nergiz et Ötles en 1993 ont déterminé la teneur en dérivés phénoliques des graines de *Nigelle* turques. La teneur totale de dérivés phénoliques trouvée était de 1744 ± 10.6 mg/g d'huile. En 1997, trois nouveaux flavonoïdes triglycosylés ont été isolés par Merfort à partir des graines de *Nigella sativa* et leurs structures ont été déterminées (Merfort *et al*, 1997). En 2008, quatorze composés phénoliques ont été isolés à partir d'un extrait méthanolique de pousses et de racines de *Nigella sativa* (Bourgou, 2008).

4.5- Les protéines :

Les graines de *Nigella sativa* sont très riches en protéines (environ 20 %), avec dominance d'acide glutamique (22,4%), d'acide aspartique (10,05%) et d'arginine (9,18%) (Al-Gaby, 1998). Le fractionnement de ces dernières par SDS-PAGE montre des bandes de poids moléculaire compris entre 10 et 94 KDa (Haq et al, 1999).

Une analyse de la composition en acides aminés a été réalisée par Saleh Al-Jassir sur des graines de *Nigelle* d'Arabie Saoudite en 1992 (Al-Jassir, 1992) révèle la présence de 17 acides aminés y compris 8 acides aminés essentiels.

4.6- Les vitamines et sels minéraux :

La composition en vitamines a été déterminée et révèle la présence des vitamines A, B1, B2, B6, PP et de l'acide folique (Nergiz et Ötles, 2003). Ramadan et Mörsel (2002b) ont analysé les vitamines liposolubles des graines de *Nigella sativa* et ont pu identifier toutes les classes des tocophérols dans l'huile. Les tocophérols totaux constituent 0,05% de l'huile, et sont constitués majoritairement de l' α -tocophérol (48%) et du γ -tocophérol (28%). Ces mêmes chercheurs ont pu également identifier d'autres vitamines liposolubles; la β -carotène (0,05%) et la vitamine K1 (0,1%). Dans une étude ultérieure, l'analyse par HPLC démontre que les teneurs en α et γ -tocophérols sont relativement élevées: de 5, 65 à 11,39 et de 2, 26 à 6,95 mg/kg respectivement (Al-Saleh et al, 2006).

Des travaux sur la composition minérale de la graine de *Nigella sativa* ont rapporté que sa teneur en potassium est importante (1,18 % du poids total de la graine), la présence du calcium, du fer, du sodium du phosphore, du zinc, du cuivre et du sélénium a été prouvée (Takruri et Dameh, 1998 ; Nergiz et Ötles, 2003 ; Al-Saleh et al, 2006).

5-Les activités biologiques :

5.1- Effet antioxydant :

L'huile de graine de *Nigella sativa* est bien connue pour ses fortes propriétés antioxydantes (Badary *et al*, 2003). Des études antérieures ont démontrés que le prétraitement avec la thymoquinone (TQ) protège les organes contre les dommages oxydatifs induits par une variété d'agents générant des radicaux, tels que le tétrachlorure de carbone (Nagi *et al*, 1999).

La thymoquinone, la dithymoquinone, et le thymol ont été testés contre plusieurs ROS, et tous les composés testés de *Nigella sativa* ont exercé des effets antioxydants forts (Kruk *et al*, 2000). La TQ pourrait agir comme un capteur de RLs et elle conserve l'activité de diverses enzymes antioxydantes (Woo *et al*, 2012).

5.2- Effets sur le système immunitaire :

la poudre de *Nigella sativa* a entraîné une augmentation de la population lymphocytaire *T helper* (CD4) et a contribué à l'amélioration du rapport cellules *T helper*/cellules T suppresseurs (CD4/CD8). Par ailleurs, *Nigella sativa* augmente de 30% l'activité des cellules tueuses NK (El-Kadi et Kandil, 1987). *Nigella sativa* stimule aussi la libération des interleukines-1 β . Cela entraîne une stimulation de l'activité phagocytaire des leucocytes polynucléaires et macrophages (Haq *et al.*, 1995).

5.3- Effets anti-inflammatoire :

L'huile essentielle de *Nigella sativa* et la thymoquinone ont été utilisées pour déterminer leurs effets sur la douleur ressentie (Abdel-Fattah *et al*, 2000). L'inhibition de la production d'eicosanoïdes, l'inhibition de la synthèse de prostaglandines et la diminution de la production de monoxyde d'azote sont les trois types de mécanismes anti-inflammatoires qui ont été mis en évidence dans les différentes études (Toparslan, 2012).

5.4- effets antibactériennes et antifongiques :

Différents extraits bruts issus de la graine ont été testés *vis-à-vis* de germes antibiorésistants (16 Gram négatifs et 6 Gram positifs), les alcaloïdes totaux et le décocté se sont révélés d'être les extraits les plus actifs, notamment à l'égard des bactéries à gramme positif (Morsi, 2000). Huiles volatiles de *Nigella sativa* a une activité antibactérienne qui a été démontrée sur 37 souches de *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* et

Shigella boydii ainsi que 10 souches de *Vibrio cholerae* et *Escherichia coli* (Ferdous *et al*, 1992). L'huile fixe présente également une excellente activité antifongique, notamment sur *Aspergillus niger* (Agrawal *et al*, 1979). Par ailleurs, l'extrait de l'éther et la thymoquinone exercent une activité inhibitrice sur 8 espèces de dermatophytes (Aljabre *et al*, 2005).

5.5- effets anti tumoral :

Les graines de *Nigella sativa* ou ses constituants présentent une action préventive des cancers et/ou réductrice de la cytotoxicité des médicaments antinéoplasiques usuels. En effet, la thymoquinone a un effet inhibiteur de la carcinogenèse de l'estomac et du fibrosarcome induit par le 2 ométhylcholanthrène chez la souris (Badary *et al*, 1999 ; Badary et Gamal, 2001).

1-Définition de Stress oxydant :

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants (Ratnam *et al*, 2006). Il peut se produire en raison de la surproduction d'oxydants, la diminution de la défense antioxydante ou une combinaison de ces deux facteurs (Ece *et al*, 2007).

2-Les radicaux libres :

Les radicaux libres ont été découverte à moins de 50 ans (Dröge, 2002). Un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) contenant un électron non apparié. Ce déséquilibre n'est que transitoire et est comblé par l'acceptation d'un autre électron ou par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule (Afonso *et al*, 2007). Les espèces réactives de l'oxygène(ERO) sont des radicaux libres issus de l'oxygène moléculaire, elles représentent la plus importante classe d'espèces réactives générées dans les organismes vivants à cause de l'importance du métabolisme aérobie (Valko *et al*, 2007).

le terme « espèces réactives de l'oxygène » est désigné un ensemble plus large de molécules :

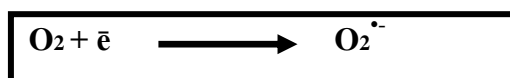
- Des radicaux oxygénés caractérisés par un électron non apparié: (l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$, les radicaux hydroxyles HO^{\cdot} , peroxyde ROO^{\cdot} , alkoxyde RO^{\cdot} (Favier, 2003).

- Des dérivés de l'oxygène non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , L'oxygène singulet 1O_2 et le nitroperoxyde $ONOOH$, mais qui sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux libres (Favier, 2003).

3-Nature et sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène :

3.1- L'anion superoxyde :

Il est le radical le plus fréquemment produit dans l'organisme, et le type le moins réactif des ERO (Scheibmeir *et al*, 2005). Il est chargé négativement et généré par la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire (Lacolley *et al*, 2007). Cette réaction semble surtout catalysée par des NADPH oxydases membranaires (Wolin, 2009).



Dans des conditions physiologiques et physiopathologiques, $O_2^{\cdot-}$ peut également être formé dans certains organites cellulaires (Gardès-Albert *et al*, 2005). Tels que les

peroxysomes, via la conversion de l'hypoxanthine en xanthine, puis en acide urique, catalysée par la xanthine oxydase (Wolin, 2009), et les mitochondries où 2% à 5% d'oxygène consommé est transformé en radicaux superoxydes (Favier, 2003).

Il existe également des sources exogènes d'anion superoxyde comme la fumée de cigarette ou les radiations ionisantes particulièrement impliquées dans les pathologies pulmonaires (Ames *et al*, 1993). L'O₂⁻ est relativement stable, peu toxique pour l'organisme. Cette faible réactivité permet d'ailleurs son utilisation par l'organisme comme médiateur régulant des fonctions biologiques (Favier, 2003).

Le radical superoxyde ne traverse pas rapidement la membrane plasmique et se dismute spontanément au pH physiologique en produisant du peroxyde d'hydrogène :



Bien que le radical superoxyde ne soit pas considéré comme particulièrement réactif, son principal danger vient de sa réaction de neutralisation productrice de peroxyde d'hydrogène ou d'acide hypochloreux nettement plus puissants. L'O₂⁻ est régulé par des enzymes, les superoxydes dismutases qui catalysent sa dismutation (Halliwell, 1989).

3.2-Le peroxyde d'hydrogène :

Le Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), qui n'est pas un radical libre, peut être formé secondairement à la dismutation de O₂⁻ par le superoxyde dismutase ou produit par réduction bivalente de l'oxygène grâce à un grand nombre de déshydrogénases, notamment l'acylCoA déshydrogénase, la NADH déshydrogénase, la xanthine oxydase, l'uricase, la mono-amineoxydase... etc.



L'H₂O₂ n'est pas un radical libre mais a la capacité de générer des radicaux hautement réactifs. En présence de métaux de transition (fer et cuivre), l'H₂O₂ donne naissance via la réaction de Fenton à un radical hydroxyle HO[•] hautement réactif

(Wardman et Candeias, 1996). Contrairement à l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène est capable de traverser les membranes des cellules et des organites cellulaires pour engendrer des dommages loin de son site de production (Halliwell et Gutteridge, 1996).

3.3-Le radical hydroxyle (HO•) :

Le radical hydroxyle est l'oxydant le plus réactif et le plus puissant (Marusawa *et al*, 2002). Le peroxysome grâce à des oxydases spécifique représente l'une des sources les plus importantes productrices de ce radical (Poortmans et Boisseau, 2009).

Parmi les voies conduisant à la formation de ce radical on peut citer celle qui implique les métaux de transition, le cuivre et le fer sous leur forme réduit par une réaction appelée réaction de fenton (Favier, 2003).



L' H_2O_2 peut aussi réagir avec le radical superoxyde, aboutissant à la production du HO•, ce mécanisme réactionnel est appelé réaction d'Haber et Weiss (Sorge, 2004).



Le radical hydroxyle a une durée de vie extrêmement faible (inférieure à la Microseconde) et les distances qu'ils peuvent parcourir sont également très faibles. Ce sont donc des radicaux qui diffusent peu et qui réagissent quasiment sur le lieu de leur production. Le HO• est capable de réagir avec la plupart des molécules biologiques comme l'ADN, les protéines, les sucres et les lipides membranaire. Parmi les ERO le radical hydroxyle est de loin le plus réactif. Le radical $\text{O}_2\cdot\cdot$ a une demi vie plus longue et bien qu'il soit moins réactif il est aussi délétère que le radical HO• (Delattre *et al*, 2005).

3.4-Radicaux alkyles (R•) et peroxy (ROO•) :

Les radicaux peroxy sont des radicaux secondaires issus de l'addition de l'oxygène sur les radicaux centrés sur le carbone R•.



Les radicaux R• sont généralement issus de l'action des radicaux hydroxyles sur les

substrats biologiques (par arrachement d'atome d'hydrogène ou addition sur les doubles liaisons) (Delattre *et al*, 2005).

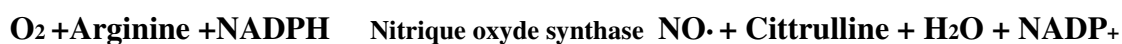


3.5-L'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) :

Il correspond à une forme excitée de l'oxygène O_2 , il possède la même structure électronique que l'oxygène, mais «agencée» différemment, à savoir que les électrons de la couche externe initialement non appariés se sont appariés. Il n'est donc pas radicalaire. Son état «excité» lui confère un potentiel oxydant supérieur à celui de l'oxygène (Bonnefont – Rousselot *et al*, 2003).

3.6-Le monoxyde d'azote(NO) :

Le monoxyde d'azote (ou oxyde nitrique) est un radical libre ubiquitaire synthétisé dans la cellule endothéliale à partir de l'arginine et l' O_2 grâce à l'action d'enzymes appelées NO synthase (Bonnefont- Rousselot *et al*, 2003 ; Vincent et Martin, 2008) .



Il se caractérise par sa grande faculté de diffusion dans les membranes cellulaires et sa réactivité moyenne (de l'ordre de quelques secondes *in vivo*), le monoxyde d'azote radicalaire peut aisément réagir avec la plupart des espèces oxygénées et se transformer en dioxyde d'azote (NO_2) :



Lequel peut donner du trioxyde d'azote (N_2O_3) :



Pour enfin aboutir à un ion nitrate stable (NO_2^-) :



De plus, le monoxyde d'azote forme avec l'anion superoxyde le peroxydinitrite (ONOO^-):



Ce dernier est moins réactif que son précurseur azoté, mais responsable de l'oxydation de nombreuses biomolécules (Rezaire, 2012).

4-Les endommagements provoqués par les ROS :

Les endommagements induits par les radicaux libres sont : une peroxydation des lipides, une oxydation des protéines, des mutations de l'ADN. Ces altérations peuvent conduire à des pertes de fonction et d'intégrité, voire à la mort cellulaire notamment par l'intermédiaire de l'apoptose qui est initié également par les RL en activant l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP).

4.1-Peroxydation lipidique :

Les premières cibles des ROS sont les lipides, notamment ceux présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation (Pamplona *et al*, 2000 ; Hulbertl *et al*, 2005). L'oxydation des lipides génère des peroxydes lipidiques qui sont eux-mêmes très réactifs.

La peroxydation de lipides induit une modification de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes (Hong *et al*, 2004). Elle fournit également une grande variété de produits qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN (Marnett, 1999). Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), l'acides thiobarbiturique (TBARS) et le 4-hydroxynonanal (4- HNE) sont étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique.

4.2-Oxydation des protéines :

De façon comparable à l'oxydation des lipides, les protéines sont aussi susceptibles d'être oxydées par les ROS. Cette oxydation provoque l'introduction d'un groupe carbonyle dans la protéine (Peng *et al*, 2000 ; Levine, 2002). Ces réactions

d'oxydation, fréquemment influencées par les cations métalliques comme le Cu^{2+} et le Fe^{2+} , peuvent être classées en deux catégories :

1°) Celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne protéique.

2°) Les modifications des peptides par l'addition de produits issus de la peroxydation lipidique.

Ces changements sont tels qu'ils conduisent à une modification structurale des protéines dont les conséquences sont majeures (perte de fonction catalytique, augmentation de la sensibilité aux protéases...) (Levine, 2002). L'oxydation des protéines peut être un signal pour les "protéines de stress" (Heat Shock Protein, HSP) connus pour leur rôle cytoprotecteur (Welch, 1992). Ainsi, les membres de la famille de HSP70 ont un rôle de protéines chaperonnes. Elles prennent en charge les protéines dénaturées (participation à la restauration de la fonction de ces protéines) mais aussi les protéines en cours de maturation (participation à leur synthèse, à leur importation vers le réticulum endoplasmique et la mitochondrie). La synthèse des HSP pourrait ainsi compléter les capacités de défense santioxydantes lorsque les protéines intracellulaires sont endommagées par les ROS (Essig et Nosek, 1997).

4.3-Dommage de l'ADN :

Le stress oxydant étant principalement d'origine mitochondriale, ces organites sont les premières cibles des ROS. En effet, le génome mitochondrial présente une susceptibilité au stress oxydant qui est 10 fois supérieure à celle du génome nucléaire (Richter *et al*, 1988). Les mécanismes explicatifs proposés sont :

- 1°) L'absence d'histones protectrices autour de l'ADN mitochondrial.
- 2°) Sa localisation proche de la membrane interne.
- 3°) Des mécanismes de réparations frustrés.
- 4°) Une structure circulaire sans introns augmentant statistiquement le risque de mutations pathogènes (Cann et Wilson, 1983 ; Cortopassi *et al*, 1992 ; Ames *et al*, 1993).

L'idée d'un "cercle vicieux" ou d'une théorie avec un feed-back positif est avancée pour expliquer les altérations mitochondriales dues au vieillissement : des dysfonctionnements de la chaîne respiratoire pourraient augmenter la production de ROS et induire ainsi une augmentation progressive des mutations du génome mitochondrial et des protéines synthétisées. Comme le génome mitochondrial code pour quelques sous-unités des protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative (sept sous-unités du complexe I, une du complexe III, trois du complexe IV et deux de l'ATP synthase), leur défaut d'expression

pourrait exacerber la fuite d'électrons de la chaîne respiratoire au profit de la production de ROS.

Ainsi, plus la fuite d'électrons est importante, plus la formation de ROS provoquant de nombreuses mutations mitochondriales aggraverait ce phénomène (Wong et Cortopassi, 1997 ; Beckman et Ames, 1998). Les fonctions de la mitochondrie sont donc particulièrement exposées aux dommages oxydatifs provoquant principalement une diminution de la synthèse d'ATP mais aussi engageant la cellule dans un programme de mort cellulaire par apoptose avec l'induction du pore de transition de perméabilité.

4.4-Activation du pore de transition de perméabilité:

Bien que la nature moléculaire du PTP reste encore à ce jour inconnue, il apparaît que le PTP est un complexe multiprotéique avec de nombreuses protéines candidates

L'ouverture du PTP provoque un gonflement mitochondrial résultant de l'entrée dans la matrice de composés osmotiquement actifs. Suite à ce gonflement, la membrane externe peut se rompre et entraîner la sortie de molécules pro-apoptotiques tel que la cytochrome c qui est interagit avec Apaf-1 (Apoptosis Activating Factor-1) et la pro-caspase 9, ce qui a pour conséquence l'activation de la cascade des caspases déclenchant l'apoptose (Green et Reed, 1998). L'ouverture du PTP est très finement régulée. Les ROS agissent directement sur l'ouverture du PTP, qui serait consécutive à l'oxydation d'un groupement thiol constituant ce pore (Vercesi *et al*, 1997; Kowaltowski *et al*, 2001).

5-Les antioxydants :

Les antioxydants sont des agents redox qui réagissent avec les oxydants et soit stoppent, soit ralentissent les processus d'oxydation. Pendant ces réactions, les antioxydants s'oxydent en dérivés stables, ou persistent pendant un certain temps sous forme radicalaire. Ces formes radicalaires peuvent devenir des prooxydants.

Ces antioxydants se divisent en deux principales catégories :

- 1-les endogènes (molécules issues de la biosynthèse).
- 2- les exogènes (vitamines, oligoéléments,ou antioxydants de synthèse).

5.1-Antioxydants endogènes :

Ce groupe de systèmes antioxydants renferme de nombreuses substances endogènes parmi lesquelles on peut citer le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, l'acide lipoïque.

5.1.1 Les superoxydes dismutases (SOD):

La SOD est une enzyme cellulaire possédant une fonction antioxydante « anti-O₂^{•-} », la SOD catalyse la dismutation de l'O₂^{•-} en dioxygène et H₂O₂ selon la formule (Afonso V et al, 2007).



Chez l'homme, trois isoformes compartimentées de l'enzyme SOD ont été caractérisées de façon biochimique et moléculaire. La SOD1 cytosolique, et la SOD3 extracellulaire, utilisent le cuivre et le zinc comme cofacteurs nécessaires à l'activité enzymatique (Cu/Zn-SOD), et la SOD2 mitochondriale utilise le manganèse (Mn-SOD) (Afonso V et al, 2007).

5.1.2- Les glutathion peroxydases (GPx):

Les GPx catalysent la décomposition du H₂O₂ en couplant sa réduction en H₂O avec l'oxydation du glutathion réduit (GSH) en bisulfure de glutathion (GSSG) (Halliwell B et al, 1986).



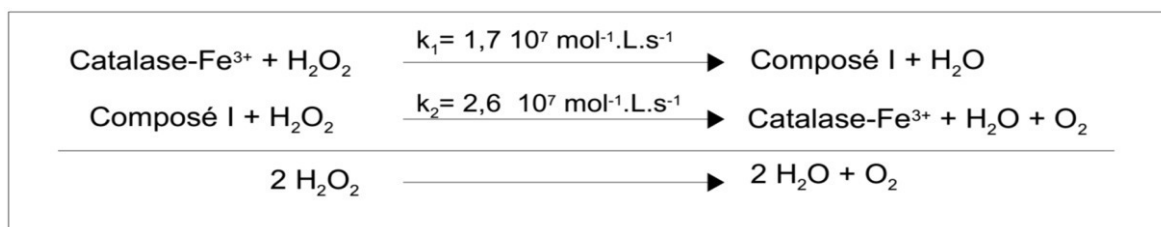
Chez l'homme quatre iso-enzymes numérotés de 1 à 4 ont été identifiés. Les GPx sont majoritairement localisées dans le cytoplasme. Une proportion plus faible est présente dans la matrice mitochondriale. Les mitochondries sont dépourvues des enzymes nécessaires à la synthèse du GSH qui doit donc être importé du cytoplasme. La plus grande partie d'H₂O₂ produit au niveau des mitochondries ou du cytoplasme est éliminé par les GPx plutôt que par la catalase (Halliwell B et al, 1986) (Halliwell B et al, 1988).

5.1.3- Les catalases (CAT):

La CAT est une enzyme héminique capable de transformer H_2O_2 en eau et en oxygène moléculaire. Elle est essentiellement présente dans les peroxysomes et dans les érythrocytes (Delattre J *et al*, 2005).

La CAT humaine est formée de quatre sous-unités, chaque sous-unité comporte un groupement ferriprotoporphyrine dans son site actif avec un atome de fer à l'état Fe^{3+} (KO TZ *et al*, 2000).

La réaction catalysée par cette enzyme est une dismutation d' H_2O_2 : (Delattre J *et al*, 2005).



5.1.4-L'acide urique :

Le tissu humain ne possède pas l'urate oxydase qui dégrade l'acide urique en allantoïne, en conséquence, l'acide urique s'accumule comme produit final de catabolisme des purines, et est présent en quantité importante dans le plasma humain avant d'être éliminé par voie rénale. La perte de cette enzyme au cours de l'évolution pourrait avoir un effet antioxydantes (Lacolley *et al*, 2007).

A un pH physiologique l'acide urique est majoritairement ionisé sous forme d'urate, un piègeur puissant de radicaux ($\text{OH}\cdot$, $\text{ROO}\cdot$, $\text{NOO}\cdot$...) (Haleng *et al*, 2007).

5.1.5 –Bilirubine :

La bilirubine est un produit terminal de la dégradation de l'hème, ce composé liposoluble est capable de piéger les radicaux peroxy, l'oxygène singulet et le radical hydroxyle, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (Algeciras-Schimnich *et al*, 2007). La bilirubine est oxydée par certaines espèces recyclée par la biliverdine réductase (Halliwell et Gutteridge, 2007).

5.1.6- Acide lipoïque :

C'est un antioxydant puissant qui peut régénérer d'autres antioxydants tels que les vitamines C et E (David, 2015). Il est capable de piéger le HO•, ROO•, HOCl• et 1O_2 (Packer *et al*, 2001) .

5.2-Antioxydants exogènes :

L'organisme possède une seconde ligne de défense « les piègeurs de radicaux libres » qui sont des composés pour la plupart apportés par l'alimentation et dont le rôle essentiel est de neutraliser les effets toxiques des ERO, limitant ainsi toute atteinte de l'intégrité cellulaire (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

5.2.1- Vitamine E ou α -tocophérol :

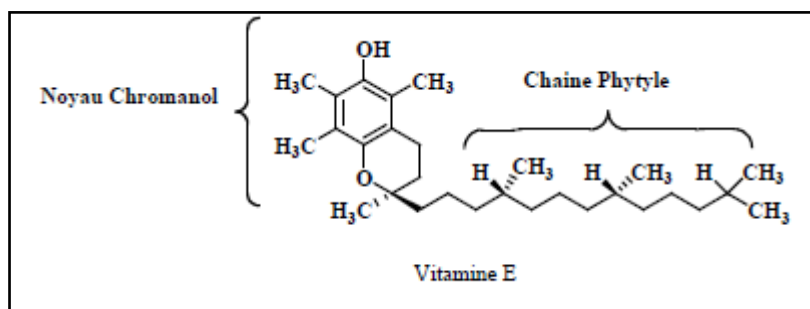


Figure 2: Structure de la vitamine E .(Lopez G V *et al*, 2005).

La vitamine E ou α -tocophérol (α -ToCH) est le principal antioxydant de la famille des tocophérols, elle est contenue principalement dans les LDLs, sa structure moléculaire comporte une extrémité hydrophile, correspondant au noyau chromanol et une extrémité hydrophobe (chaîne phytyle). Lors de l'initiation de la peroxydation lipidique, suite à une attaque radicalaire, l' α -ToCH, qui est un inhibiteur de la

propagation radicalaire, cède son hydrogène situé dans le noyau phénolique, réduisant ainsi le radical RO₂•, et constitue par ce biais le seul antioxydant liposoluble assurant cette protection. L' α -ToCH, en cédant son hydrogène, se transforme lui-même en produit radicalaire mais de faible réactivité.

L' α -ToCH peut réagir directement avec le radical initiateur, tel que le radical hydroxyle (OH•), inhibant ainsi la formation du radical RO₂•. La réaction de la vitamine E

avec l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ est très lente et par conséquent peu probable. L' α -TocH peut aussi réguler à la hausse les enzymes antioxydantes, telles que la SOD, la glutathion peroxydase, la catalase du foie, la glutathion-transférase et la NADPH réductase. (Lopez G V *et al*, 2005).

5.2.2- Vitamine C ou acide ascorbique :

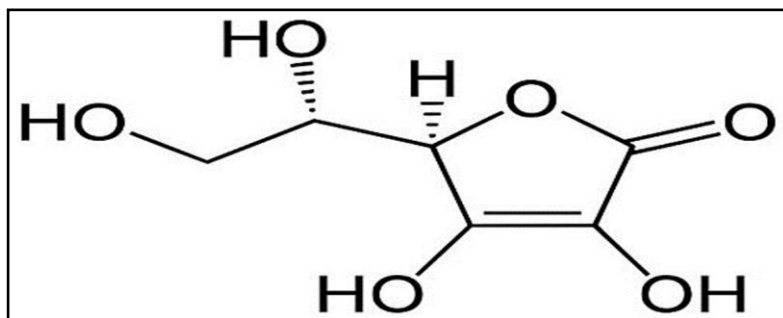
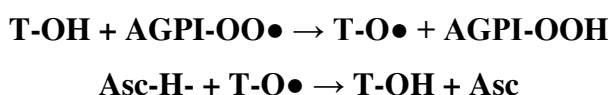


Figure 3: Structure de la vitamine C (Vertuani S *et al*, 2004).

La vitamine C est l'un des principaux antioxydants hydrosolubles présents dans les fluides intra- et extra-cellulaires (compartiments hydrophiles). L'anion ascorbate (forme présente dans le milieu physiologique) agit principalement en piégeant directement les ROS et/ou RNS (majoritairement $O_2^{\bullet-}$ et le $ONOO^-$). Il est aussi capable de recycler l' α -tocophérol de façon à agir en synergie avec ce dernier dans la prévention de la peroxydation lipidique :



5.2.3- Antioxydants exogènes phénoliques :

Les phénols sont des molécules qui contiennent un ou plusieurs noyaux aromatiques avec un ou plusieurs groupes hydroxyle (OH). Ils peuvent être extraits à partir de plantes ou synthétiques.

Chapitre II : Stress oxydatif

a- Antioxydants exogènes phénoliques naturels :

Une grande partie de ces molécules est présente dans l'alimentation. Les plus connus sont les acides phénoliques (benzoïque ou cinnamique), les flavonoïdes, et les tanins. Les stilbènes et le lignane sont moins connus (Dai J et al, 2010)

Tableau 1 : Les grandes familles de polyphénols.(Defraigne J O,et al ;2008).

Famille	Principaux composés	Origine
Acide hydroxy- benzoïques	Acide vanillique Acide gallique	Vanille Feuilles de thé
Acides hydro- cinnamiques	Acide caféique Acide férulique Acide chlorogénique	Café Riz, blé, asperges Pelure de pomme de terre, pomme, Artichaut
Stilbène	Resvératrol	Raisin, vin
Flavanoïdes - Flavonols - Flavones - Flavanones - Flavones-3-ols - Isoflavones - Anthocyanidines	Quercétine, kaempférol Luéoline, apigénine Naringénine Catéchine, épicatechine Génistéine, daidzéine Cyanidine	Oignon, brocoli Céleri Agrumes Raisin, thé vert, chocolat, Soja Fruits rouges, raisin
Tannins hydrosolubles ou non	Polyphénols de haut poids Moléculaire	Plantes supérieures
Lignines	Lignane	Bois

a.1- Flavonoïdes :

Ce sont des pigments naturels qui donnent leurs couleurs aux plantes, elles rassemblent de nombreux composés naturels répartis en plusieurs familles dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanols, les flavanones, les isoflavones et les anthocyanines (Alan C,*et al*, 2009).

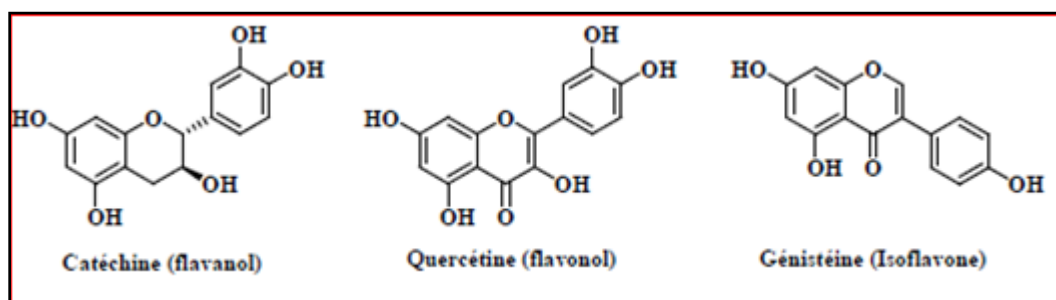


Figure 4 :Quelques flavonoides (Alan C *et al*, 2009).

a.2- Acides phénoliques :

Les acides phénoliques sont divisés en deux catégories : les dérivés de l'acide benzoïque comme l'acide gallique ou vanillique et les dérivés de l'acide cinnamique comme l'acide caféique, coumarique, sinapique et férulique. Ces derniers ont une bonne activité antioxydante.(Defraigne J O *et al*, 2008).

a.3- Resvératrol :

C'est un polyphénols naturel présent dans de nombreuses familles de plantes supérieures. Le resvératrol est un bon antioxydant contre l'oxydation des LDLs.(Wu J M,*et al* 2011)

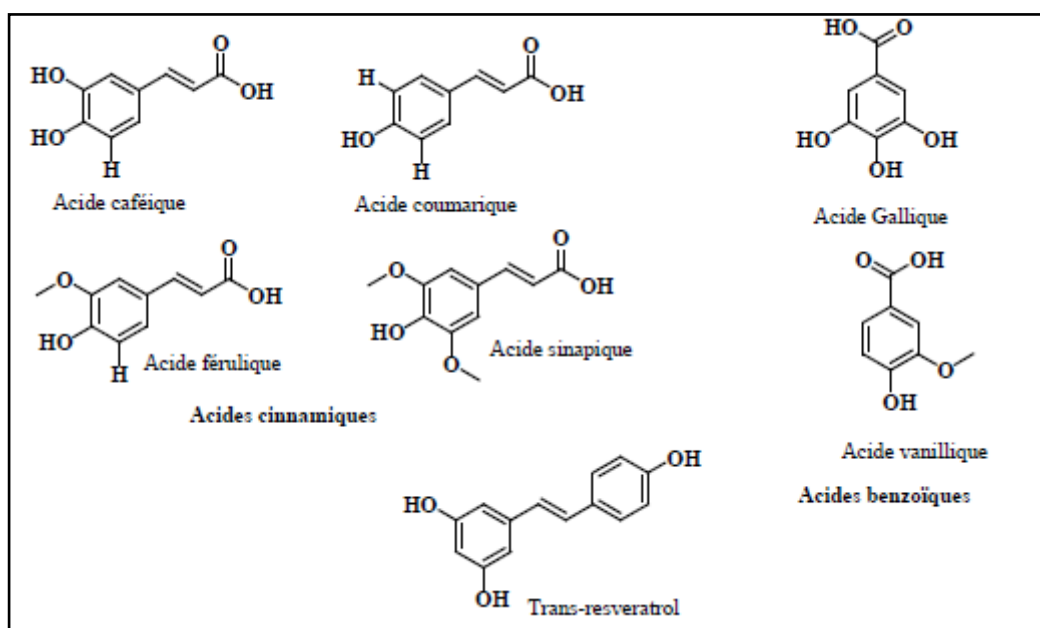


Figure 5 : Les acides phénoliques et le trans-resvératrol. (Wu J M et al, 2011).

a.4- Tannins :

Les tannins sont des polyphénols de structure complexe, avec une activité antioxydante très puissante due au piégeage de $O_2^{\bullet-}$ grâce aux différents groupes phénoliques. Les deux familles les plus importantes sont les gallotanins et les ellagitanins (Anderson J W *et al*, 1995).

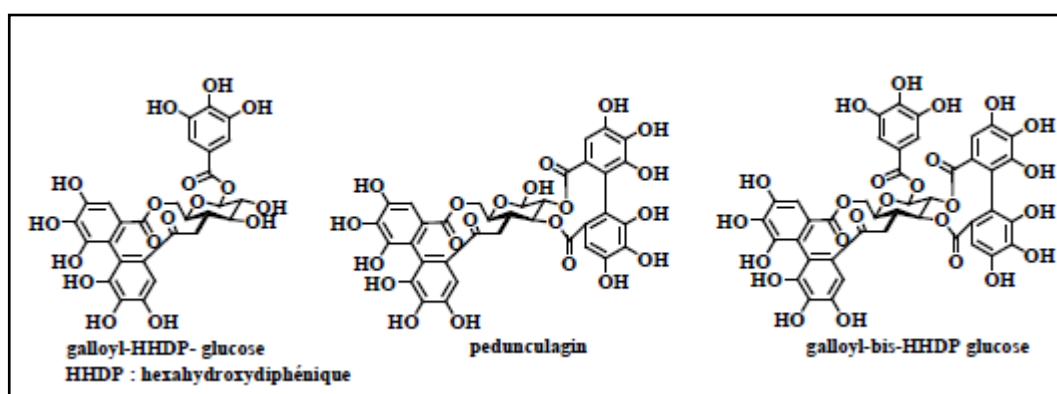


Figure 6: Unités monomères de base pour les Ellagitanins.(Anderson J W *et al*,1995).

b- Antioxydants exogènes phénoliques de synthèse :

Il existe aussi de nombreux antioxydants synthétiques dont les squelettes sont souvent dérivés des antioxydants naturels (hémisynthèse ou mime de structures naturelles). Le but de ces synthèses est l'amélioration de l'activité antioxydante, la biodisponibilité et le coût des molécules. (Vacaresse N *et al*, 2001).

Partie expérimentale

1-Matériau végétal :

Les graines de *Nigella sativa* sont locales, ils ont été achetés à partir d'un marché à Constantine. Les graines sont nettoyées des débris végétaux. Elles étaient broyées dans un moulin avant d'être utilisées dans ce travail.

2-Méthode d'extraction:

La méthode utilisée pour l'extraction est la méthode de Bligh-Dyer modifiée par Kim (Kim LL, 1992), décrite comme suit:

La poudre de graines de *Nigella* (20 g) a été homogénéisée dans un mélangeur pendant 2 minutes avec 20 ml de chloroforme et 40 ml de méthanol. Ensuite, 20 ml de chloroforme ont été ajoutés sous agitation pendant 30 s, finalement, 20 ml d'eau distillée ont été ajoutés avec agitation pendant 30 s.

Ensuite, l'homogénat, a été filtré à travers un papier filtre de diamètre de 15 cm. Les filtrats combinés ont été transférés dans un décanteur pour les séparer. Après certain temps deux couches ont été émergées; la couche inférieure c'est la phase chloroformique et la couche supérieure c'est la phase méthanolique. À la fin de l'extraction de l'huile, le chloroforme a été évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif (Eyela A-3S, Tokyo, Japon) pour obtenir l'huile totale.

3- Analyse des extraits des graines de *Nigella sativa* :

Afin de caractériser l'huile totale des graines de *Nigella sativa*, un dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes a été effectué. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydantes des plantes leur sont attribuées.

3.1-Dosage des composés phénoliques :

La teneur en composés phénoliques a été estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu selon (Li *et al*, 2007) qui est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique (WO₄²⁻) phosphomolybdique (MoO₄²⁻) de réactif de Folin par les

groupement oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (Georgé *et al*, 2005).

Brièvement, 1 ml de réactif de Folin (10 fois dilué) est ajouté à 200 µl d'échantillon ou standard (préparés dans le méthanol) avec des dilutions convenables, Après 4 min, 800 µl d'une solution de carbonate de sodium (75 mg/ml) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 h d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesurée à 765nm.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0,5-5 µg/ml) et est exprimée en µg d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG/mg d'extrait).

3.2-Dosage des flavonoïdes :

La méthode du trichlorure d'aluminium (Bahorun *et al*, 1996) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits de *Nigella sativa*. À 1 ml d'échantillon ou standard (préparés dans le méthanol) est ajouté 1 ml de la solution d'AlCl₃ (2% dans le méthanol). Après 10 minutes de réaction, l'absorbance est lue à 430 nm. La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0-40 µg/ml) et est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg d'extrait).

4- Tests, *in vitro*, de l'activité antioxydante :

4.1- Effet scavenger du radical DPPH :

Pour étudier l'activité antiradicalaire de l'huile totale, nous avons opté pour la méthode qui utilise le DPPH (diphényl picryl-hydrayl) comme un radical libre relativement stable, selon le protocole décrit par Mansouri *et al* (2005). Dans ce test les antioxydants réduisent le diphényl picryl-hydrayl ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphényl picryl-hydrazine, dont l'intensité de la couleur est

inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Sanchez-Moreno, 2002).

Brièvement, La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2,4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol. 25 μ L des solutions d'extraits ou standards (quercétine, TBHQ) sont ajoutés à 975 μ L DPPH, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517 nm . L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

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

3.2- Pouvoir réducteur :

Cette méthode consiste à évaluer l'aptitude de l'échantillon à donner un électron pour convertir le Fe^{3+} en Fe^{2+} , cette forme est quantifiée par la mesure de la couleur bleu-vert du complexe (bleu de Pruss $\text{Fe}_4 [\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$) qui absorbe à 700 nm. Une absorbance élevée indique que l'échantillon possède un grand pouvoir réducteur (Barros et al, 2007). Ce test est effectué selon la méthode de Prasad et ses collaborateurs (2009).

Brièvement, préparation de solution A : 700 ml du tampon phosphate (0,2M, pH=6,6) et 700 ml de 1% de potassiumferricyanide [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] sont ajoutés à 25 μ l des différentes concentrations de l'huile totale. Après 20 min d'incubation à 50 °C, 700 ml d'une solution aqueuse de TCA à 10% sont ajoutés au milieu réactionnel. Après agitation et incubation 10 min à température ambiante , 700 ml d'eau distillée et 125 μ l de 0,1% FeCl_3 sont ajoutés à 700 ml du solution A, puis l'absorbance est déterminée à 700 nm contre le blanc.

Les résultats sont exprimés en concentration effective à 50 % (CE50) qui traduit la concentration d'antioxydant nécessaire pour l'obtention de 0,5d'absorbance.

5-Analyse statistique :

Les résultats des tests effectués *in vitro* sont exprimés en moyenne \pm SD. Les valeurs d' IC_{50} sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe d'étalonnage

Chapitre III : Matériels Et Méthodes

en utilisant le logiciel (Graph Pad. Prism. V 5.00). La différence entre le contrôle et les différents tests, est déterminée par le test ANOVA univariée suivie du test de Dunnett/Tukey pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification. Les valeurs de $p \leq 0.05$ sont considérées significatives.

1-Rendement de l'extraction :

L'extraction de l'huile totale à partir des graines de *Nigella sativa*, a été effectuée selon la méthode de (Modified Bligh–Dyer) avec quelque modification par Kim (1992) . Dans cette étude, le rendement de l'huile totale est de 1,9292 g par 20 g des graines de *Nigella sativa* (9,65%) (tableau 2) .

Nos résultat est différent à ceux rapporté par Ramadan et Morsel (2002a)ou ils ont montré que les graines de *Nigella sativa* ont un rendement de 25,44 % de l'huile total.

Les travaux effectués sur les graines de *Nigella sativa*, montrent que la teneur en huile totale des graines de *Nigella sativa* est très variable. Cette variabilité peut être attribuée à la différence dans la procédure d'extraction et à l'influence des autres facteurs comme l'origine géographique, les facteurs écologiques, les pratiques agronomiques, les conditions du stockage (Atta, 2003; Bourgou, 2008; Hamrouni-Sellami, 2008).

Tableau 2 : Rendement d'extraction.

Extrait	Rendement %
Huile total	9,65

2- Caractérisation des graines de *Nigella sativa* :

2.1- Dosage des polyphénols totaux :

La méthode utilisés pour dosages des polyphénols totaux dans l'extrait de *Nigella sativa* est celle de Folin-Ciocalteu (Li *et al*, 2007). L'acide gallique a été utilisé comme standard. Pour la détermination quantitative des polyphénols de l'huile totale nous avons utilisé la gamme d'étalonnage d'acide gallique ($y = 0,491 x + 0,094$, $R^2 = 0,996$) .

Nos résultats montrent que l'huile totale de *Nigella sativa* constitue une quantité de polyphénols avec une teneur de 3.379 μg EAG/g d'extrait. Ces résultats sont différent à ceux publiés par Ramadan et ses collaborateurs (2003) où ils ont montré que l'huile totale contient $12.72 \pm 0,11$ μg EAG/g d'extrait .

Chapitre IV : Résultats Et Discussion

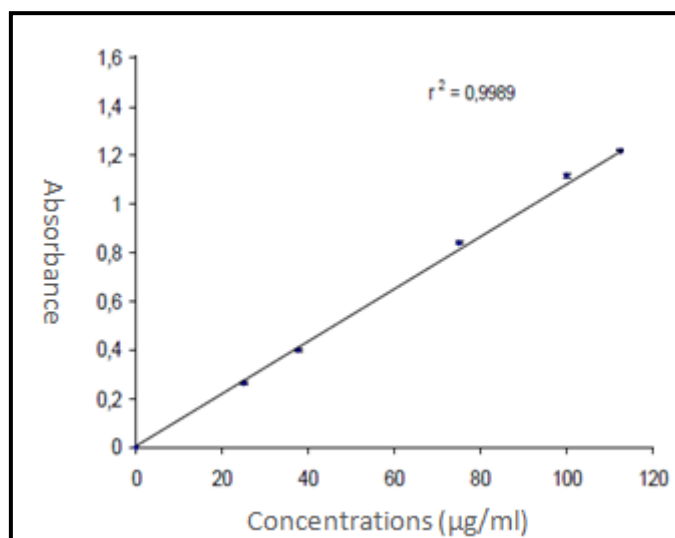


Figure 7 : Droite d'étalonnage de L'acide gallique.

Les résultats sont exprimés en µg équivalent d'acide gallique µg (EAG) / g d'extrait et sont représentés dans (le tableau 3)

Tableau 3: Teneur en acide galique µg EAG/g d'extrait de l'huile de *Nigella sativa*

Extrait	Teneur en acide galique µg EAG/g d'extrait
Huile totale	3,379

2.2-Dosage des flavonoïdes :

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium (Bahorun *et al*, 1996) en utilisant comme standard la quercétine dont l'équation de la gamme d'étalonnage est $y = 0,0039 x + 0,2667$, $R^2 = 0,9971$. Nos résultats sont représentés (dans le tableau 4) et les gammes d'étalonnages dans (le Figure8) montre que l'huile totale de *Nigella sativa* contient une grande quantité de flavonoïdes avec une teneur 6.923 µg EQ/g d'extrait ; ce résultat est similaire a ceux publiés par Ramadan et ses collaborateurs (2003).

Tableau 4 : La teneur en quercétine dans l'huile totale de *Nigella sativa*.

Extrait	Teneur en quercétine µg EQ/g d'extrait
Huile totale	6,923

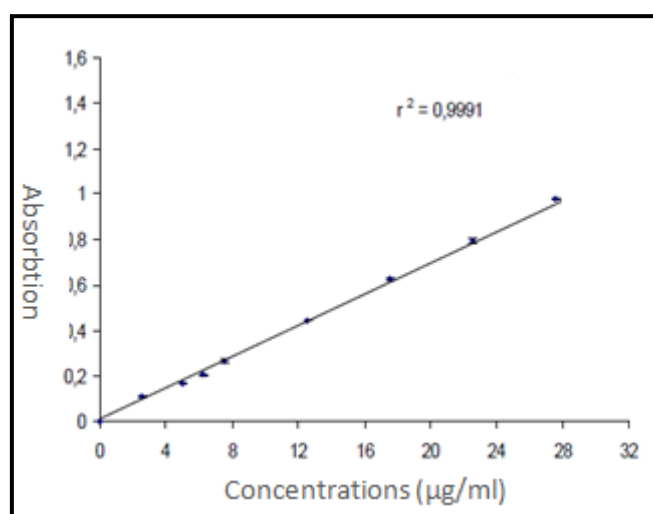


Figure 8: Droite d'étalonnage de la quercétine.

3-Tests, *in vitro*, de l'activité antioxydante :

3.1-Effet scavenger du radical DPPH :

A fin de déterminer l'activité antioxydante de l'huile totale de *Nigella sativa* spectrophotométriquement, nous avons mis l'extrait *vis-à-vis* du radical DPPH et en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par un changement de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm (figure 9).

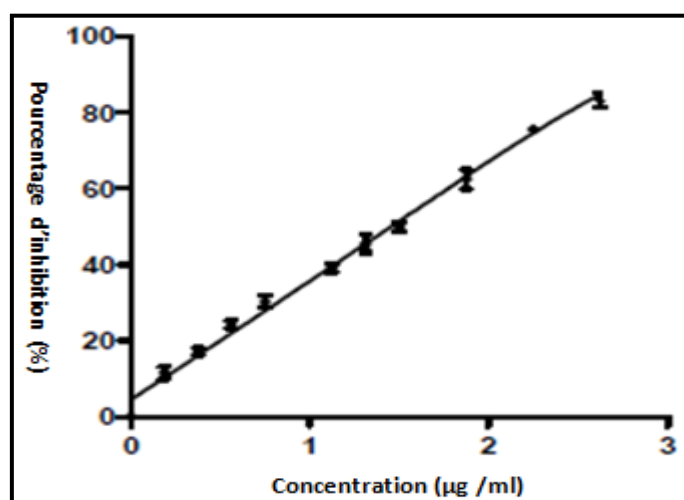


Figure 9: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH par différentes concentrations de la quercétine.

Chapitre IV : Résultats Et Discussion

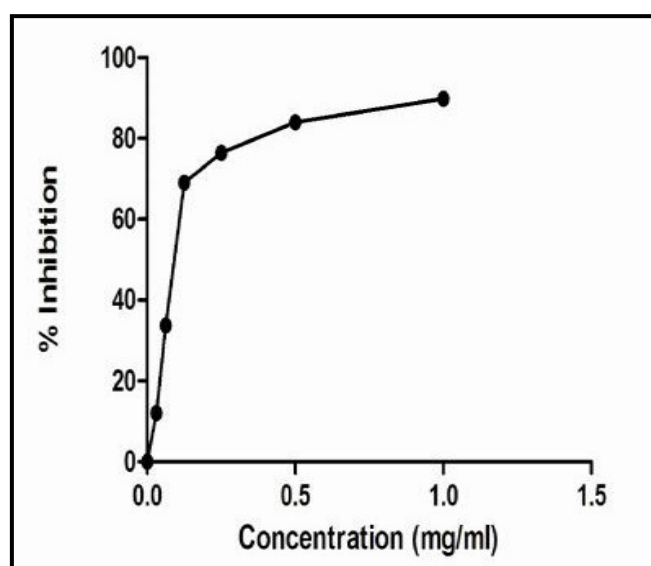


Figure 10: Activité antioxydante d'huile totale de *Nigella sativa* vis-à-vis du radical DPPH

Tableau 5 : La concentration inhibitrice de l'huile totale de *Nigella sativa*

Extrait	IC50 (mg/ml)
Huile totale	0.130 ± 0.0034

Le stress oxydant est impliqué dans la physiopathologie de nombreuses maladies chez l'homme y compris les atteintes hépatiques liées à l'alcool. Pour évaluer l'activité antioxydante de nos extraits, nous avons choisis des tests *in vitro* qui ont pour spécificité de produire les mêmes radicaux libres que ceux produits dans l'organisme ($O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} , H_2O_2).

Globalement, les résultats indiquent que l'huile totale est douée 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 phétolestérols, les vitamines liposolubles notamment, les α -tocophérols et les β -carotènes, les acides gras insaturés notamment les ω -3 et ω -6 (Ramadan et Morsel, 2002a; 2003). De plus, l'huile totale peut aussi contenir des composés phénoliques à caractères amphiphiles (Sultan *et al*, 2009).

Chapitre IV : Résultats Et Discussion

3.2-Test du pouvoir réducteur :

Le principe de ce test est basé sur la réduction Fe^{3+} en Fe^{2+} . Le changement de la couleur du milieu réactionnel contenant l'extrait de l'huile de *Nigella sativa* du jaune au bleu vert est déterminé la réduction de Fe^{3+} est un indicateur de la capacité de l'échantillon de donner un électron, qui reflète leur pouvoir réducteur (Gholivand *et al*, 2010). Nos résultats sont représentés (dans le figure 11).

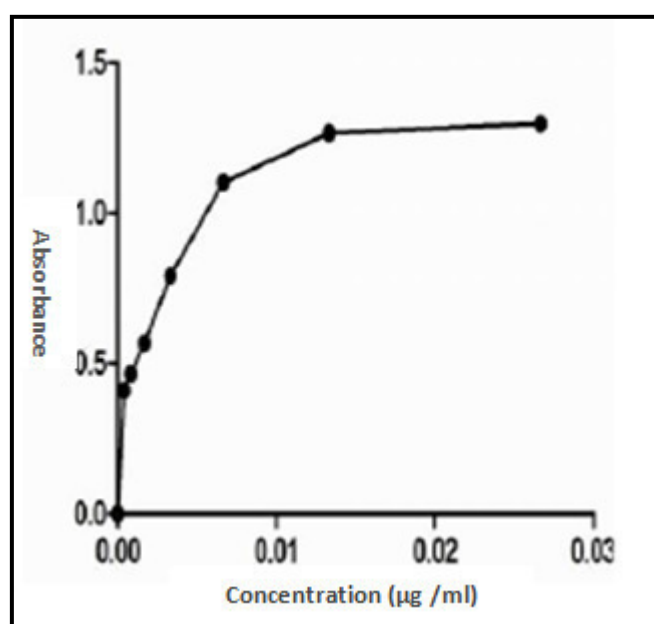


Figure 11 : Pouvoir réducteur de la quercétine.

Chapitre IV : Résultats Et Discussion

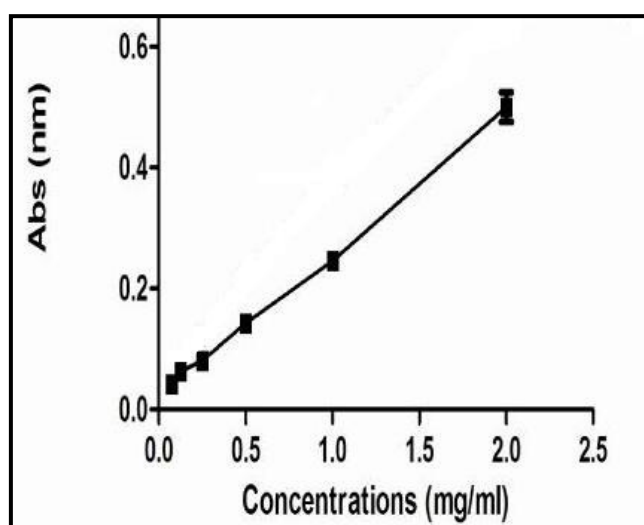


Figure 12: le pouvoir réducteur d'huile totale de *Nigella sativa*

Tableau 6: La concentration effective de l'huile totale de *Nigella sativa*.

Extrait	EC50 (mg/ml)
Huile totale	85.93 ± 0.007

Dans le test de pouvoire reducteur de l'huile des graines de *Nigella sativa* se manifeste et s'exprimé par la concentration effective à 50 % (CE50). CE50 et la concentration qui permet d'obtenir une absorbance de 0,5 à 700 nm.

Les résultats montrent que l'huile totale présente une meilleure capacité avec une EC50 est de 85.93mg/ml , ces resultats indiquent que l'huile totale possede une bonne activite antiradicalaire.

Cette activité indique la richesse naturelle de l'huile végétale en lipides bioactifs tels que les phetosterols, les vitamines liposolubles notamment, les α - tocopherols et les s-carotenes, les acides gras insaturées notamment les ω -3 et ω -6 (Ramadan et Morsel, 2002a ; 2003). De plus, l'huile totale peut aussi contenir des composes phénoliques a caractères amphiphiles (Sultan *et al*, 2009).

Conclusion

Conclusion :

Nigella sativa est une plante utilisée depuis longtemps comme épice puis comme remède ans la culture orientale. Cette plante est caractérisée par un large spectre d'activité *vis-à-vis* les pathologies humaine, ceci est lié particulièrement à ses constituants principales ; parmi ces constituants l'huile totale qui représente un pourcentage important de ces constituants.

L'objectif de cette étude est d'extraire l'huile des graines de *Nigella sativa* en utilisant des solvants, puis on passé à la caractérisation de cette huile par le dosage des polyphénols et flavonoïdes. L'étape finale est consistée à l'étude de l'activité antioxydante de l'huile de *Nigella sativa* par le biais de deux mécanismes ; le test de DPPH et le pouvoir réducteur. Les résultats de test dosage des polyphénols montrent une teneur de 3,379 µg EAG/g d'extrait et les flavonoides représentent une teneur de 6,923 µg EQ/g d'extrait .De plus , l'huile totale est douée d'une bonne activité anti-radicalaire avec IC50 égale a 0.130 ± 0.0034 mg/ml et possède un pouvoir réducteur qui se caractérisé par une EC50 égale a 85.93 ± 0.007 mg /ml.

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

Références bibliographiques

References :

- Abdel-Aal E , Attia R (1993) . Characterization of Black cumin (*Nigella sativa*) seeds .
Alexandria Science Exchange Journal . 14: 497 – 482 .
- Abdel-Fattah A M , Matsumoto K , Watanabe H (2000) . Antinociceptive effects of *Nigella sativa* oil and its major component thymoquinone in mice . *European journal of pharmacology* . 400: 89-97 .
- Afonso V , Champy R , Mitrovic D , Collin P , Lomri A (2007) . Radicaux libre dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : role dans les maladies rhumatismales .
Revue du Rhumatisme . 74: 636 – 643 .
- Agrawal R , Kharya M D , Shrivastava R (1979) . Antimicrobial anthelmintic activities of the essential oil of *Nigella sativa* Linn . *Indian journal of experimental biology* . 17: 1264 – 1265 .
- Alami S (1989) . La phytothérapie ancestrale actuelle et d'avenir . Thèse de Médecine .
Casablanca .
- Alan C, Indu B J, and Michael N C (2009) . Dietary phenolics : chemistry, bioavailability and effects on health . *Nat Prod Rep*. 26 : 1001-1043.
- Al-Gaby A (1998) . Amino acid composition and biological effects of supplementing broad bean and corn proteins with *Nigella sativa* cake protein . *Die Nahrung* . 42: 290 – 294 .
- Algeciras-Schimnich A , Cook W J , Milz T C , Saenger A K , Karon B S (2007) . Evaluation of hemoglobin interference in capillary heel-Stick samples collected for determination of neonatal bilirubin . *Clinical Biochemistry* . 40: 1311 – 1316 .
- Aljabre S H M , Randhawa M A , Akhtar N , Alakloby O M , Alqurashi A M , Aldossary A (2005) . Antidermatophyte activity of ether extract of *Nigella sativa* and its active principle thymoquinone . *Journal of Ethnopharmacology* . 101: 116 – 119 .

Al-Jassir S (1992) . Chemical composition and microflora of black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds growing in Saudi Arabia . *Food Chemistry* . 45: 239 – 242 .

El-Kadi A , Kandil O (1987) . The Black Seed (*Nigella Sativa*) and Immunity: Its Effect on Human T Cell Subset . *Federation Proceedings* . 46: 1222 .

AL-NASSIMI M (1984) . *La médecine moderne et la science du prophète* (éd. 3e édition) . Damas: Acharika .

Al-saleh I , Billedo G , El-Doush I (2006) . Levels of selenium, DL- α - tocopherol, DL- γ -tocopherol, all-trans-retinol, thymoquinone and thymol in different brands of *Nigella sativa* seeds . *Journal of Food Composition and Analysis* . 19: 167 – 175 .

Ames B N , Shigenaga M K , Hagen T M (1993) . Oxidants, antioxidants, and the Degenerative diseases of aging . *Proc Natl Acad Sci U S A* . 90: 7915 – 7922 .

Anderson J W , Johnstone B M , Cook-Newell M E . Meta-Analysis of the Effects of Soy Protein Intake on Serum Lipids. *N. Engl. J. Med* . 333: 276 – 282, 1995 .

Ansari A , Osman S , Subbaram R (1975) . Component acids of minor seed oils . *J Oil Technol Assoc India* . 7: 26 – 27 .

Atta MB (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 , Cun-heng H , Clardy J (1985a) . Isolation and structure determination of nigellicine, a novel alkaloid from the seeds of *Nigella sativa* . *Tetrahedron letters* . 23: 2759 – 2762 .

Atta-ur-rahman M , Ahmed S , Choudhary M and Habib-ur-rahman I (1985b) . Nigellimine-N-oxide a new isoquinoline alkaloid from the seeds of *Nigella sativa* . *Heterocycles* . 23: 953 – 955 .

Atta-ur-rahman M , Hassan S , Coudhary M , Clardy J (1995) . Nigellidine: a new indazole alkaloid from the seeds of *Nigella sativa* . *Tetrahedron letters* . 36: 1993 – 1996 .

Atta-ur-rahman M , Zaman K (1992) . Nigellimine : a new isoquinoline alkaloid from *Nigella sativa* . *Journal of Natural Products* . 55: 676 – 678 .

Backman K B , Ames B N (1998) . Mitochondrial aging : open questions . *Am NY Acad Sci* . 854: 118 – 127 .

Badary O A , Al-Shabanah O A , Nagi M N , Al-Rikabi A C , Elmazar M M (1999) . Inhibition of benzo(a)pyrene-induced forestomach carcinogenesis in mice by thymoquinone . *European journal of cancer prevention* . 8: 435 – 440 .

Badary O A , Gamal A M (2001) . Inhibitory effects of thymoquinone against 20-methylcholanthrene-induced fibrosarcoma tumorigenesis . *Cancer detection and prevention* . 25: 362 – 368 .

Bahorun T , Gressier B , Trotin F , Brunete C , Dine T , Vasseur J , Gazin JC , Pinkas M , Luycky M and Gazin M (1996) . Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations . *Arzneimittel-Forschung* . 46: 1086 – 1089 .

Barros L , Ferreira M J , Queiros B , Ferreira I C F R , Baptista P(2007) . Total phenols, ascorbic acid, beta-carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities . *Food Chemistry* . 103: 413 – 419 .

Benkaci-Ali F , Baaliouamer A , Meklati B Y (2006) . Kinetic study of microwave extraction of essential oil of *Nigella sativa* L. seeds . *Chromatographia* . 64: 227 – 231 .

Benkaci–Ali F , Baaliouamer A , Meklati B Y , Chemat F (2007) . Chemical composition of seed essential oils from Algerian *Nigella sativa* extracted by microwave and hydrodistillation . *Flavour and fragrance journal* . 22: 148 – 153 .

Bhupendra K M , Prabha M , Gupta M (2009) . A new naturally acetylated triterpene saponin from *Nigella sativa* . *Carbohydrate Research* . 344: 149 – 151 .

Bittkau C , Comes H P (2005) . Evolutionary processes in a continental

island system: molecular phylogeography of the Aegean *Nigella arvensis* alliance (Ranunculaceae) inferred from chloroplast DNA . *Molecular Ecology* . 14: 4065-4083 .

Bonnier G (1990) . La grande flore en couleur . *Ed Belin, Paris* . Tome . 1: 17 .

Bonnefont-Rousselot D , Théron P , Delattre J (2003) . Radicaux libre et antioxydant en : Delattre J , Durand G , Jardillier J C . Biochimie pathologique . *Flammarion, Paris* . 317 .

Bourgou S , Ksouri R , Bellila A , Skandrani I , Falleh H , Marzouk B (2008) . Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots . *Comptes Rendus Biologies* . 331: 48 – 55 .

Burits M . Bucar F (2000) . Antioxydant activity of *Nigella sativa* L. essential oil . *Phytotherapy Research* . 14: 323 – 328 .

Calixto J B (2005) . Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view . *Journal of Ethnopharmacology* . 100: 131 – 134 .

Cann R L , Wilson AC (1983) . Length mutations in human mitochondrial DNA . *Genetics* 104: 699-711 .

Chamseddine A (2006) . *La curation par la graine noire d'après la sunna prophetique et la médecine antique et moderne* (3e éd.) ,(A. ABBOUD, Trad.) . Beyrouth: Dar-Al-Kotob Al-Ilmiyah .

Cortopassi G A , Shibata D , Soong N W , Arnheim N (1992) . A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues . *Proc Natl Acad Sci U S A* . 89: 7370 – 7374 .

Dai J , Mumper R J (2010) . Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties . *Molecules* . 15: 7313 – 7352 .

Davide G W (2015) . Encyclopedia of Mind Enhancing, Foods, Drugs and Nutritional

Substances . Second edition . *Edition Mcfarland & Company, Inc, Publishers Jefferson, North Carolina* . 166 .

Defraigne J O , Pincemail J (2008) . Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités . *Rev Medn Liège* . 63: 10 – 19 .

Delattre J , Beaudoux J L , Bonnefont-Rousselot (2005) . Radicaux libres et stress oxydant:aspects biologiques et pathologiques . Edition *Lavoisier TEC & DOC éditions Médicales Internationales, Paris* . 14: 93 – 94 .

Droge W (2002) . free radicals in the physiological control of cell function . *Physiological Reviews* . 82: 47 – 95 .

Ece A , Gurkan F , Celik F , Boşnak M, Yel S , Balik H , Erel O (2007) . Paraoxonase, total antioxidant activity and peroxide levels in marasmic children: relationships with leptin . *Clin Biochem* . 40(9-10) : 634-9.

Echtay K S , Esteves T C , Pakay J I , Jekabsons M B , Lambert A J , Portero- Otin M , Pamplona R , Vidal- Puig A J , Wong S , Roebuck S J (2003) . Brand M D A signaling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling . *Embo J* . 22: 4103 – 4110 .

Essig D A , Nosek T M (1997) . Muscle fatigue and induction of stress protein genes: a dual function of reactive oxygen species . *Can J Appl Physiol* . 22: 409 – 428 .

Favier A (2003) . Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique . *L'actualité Chimique* . 108 – 115 .

Ferdous et al (1992) . In vitro antibacterial activity of the volatile oil of *Nigella Sativa* activity seeds a gainst multiple drug-resistant isolate of *Shigella* ssp ;and isolates of *vibrio cholerae* and *E.coli* . *Phytother . Res* 1992 .6: 137 – 40 .

Gardès-Albert M , Jore D (2005) . Aspects physicochimiques des radicaux libres centrés sur l'oxygène . Radicaux libres et stress oxydant . Edition *Lavoisier*, Paris . 1 – 23 .

George S , Brat P , Alter P , Amiot M J (2005) . Rapid determination of polyphenols and 13 vitamin C in plant-derived products . *Journal of agricultural and food chemistry* . 53: 1370-1373 .

Ghedira K (2006) . La nigelle cultivée: *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae) . *Phytothérapie* 4: 1 – 7 .

Gholivand B M , Rahimi-Nasrabadi M , Batooli H , Ebrahimabadi A H (2010) . Chemical composition and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of *Psammogeton canescens* . *Food and Chemical Toxicology* . 48: 24 – 28 .

Guignard J L (2001) . In Botanique systématique moléculaire . 12ème Edition *Masson Paris* . 304 .

Green D R , Reed J C (1998) . Mitochondria and apoptosis . *Science* . 281: 1309 – 1312 .

Greenish HG (1880) . Contribution to the Chemistry of *Nigella sativa*. *Journal of Pharmacy* . 10: 909 – 911 .

Haleng J , Pincemail J , Defraigne J O , Harlier C , CaPelle J P (2007) . Le stress oxydant . *Rev Med Liege* . 62 – 10: 628 – 638 .

Halliwell B , Gutteridge J M (1988) . Free radicals and antioxidant protection: mechanisms and significance in toxicology and disease . *Hum Toxicol* . 7: 7 – 13 .

Halliwell B (1989) . Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis . *Br J Exp Pathol* . 70: 737 – 757.

Halliwell B , Gutteridge J M C (1996) . Mechanisms involved in the generation of free radicals . *Pathologie Biologie* . 44: 6 – 13 .

Halliwell B , Gutteridge J M C (2007) . Free Radicals in biology and medicine . Fourth Edition *New York , Oxford University Press* . 851 .

Haq A , Lobo P I , Al-Tufail M, Rama NR and Al-Sedairy ST (1999) . Immunomodulatory effect of *Nigella sativa* proteins fractionated by ion exchange chromatography . *International Journal of Immunopharmacology* . 21: 283 – 295 .

Haq A , Abdullatif M , Lobo P I , Khabar K S , Sheth K V , al-Sedairy S T (1995) . *Nigella sativa*: effect on human lymphocytes and polymorphonuclear leukocyte phagocytic activity . *Immunopharmacology* . 30: 147 – 155 .

Hong J H , Kim M J , Park M R , Kwag O G , Lee I S , Byun B H , Lee S C , Lee K B , Rhee S J (2004) . Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats . *Clin Chim Acta* . 340: 107 – 115 .

Hulbert A J (2005) . On the importance of fatty acid composition of membranes for aging . *J Theor Biol* . 234: 277 – 288 .

Ibn-sina (1972) . *La loi de la médecine, le livre des médicaments et des plantes* .
Beyrouth: Maktab Attollab .

Kim LL (1992) . Extraction of lipids . In: Laboratory manual of analytical methods and procedures for fish and fish products, ed.Katsutoshi Miwa and Low Su Ji (eds) C-2.
Singapore: Marine Fisheries Research Department, Southeast Asian Fisheries
Development Center .

Koehlin-Ramonatxo C (2006) . Oxygène, stress oxydant et supplémentation antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans la maladie respiratoire . *Nutrition Clinique & Métabolisme* . 20 :165 – 177 .

KO T Z , Safo M K , Musayev F N , Di Salvo M L , Wang c , WU S H , Abraham D J (2000).
Structure of human erythrocyte catalase . *Acta cryst* . 56: 241 – 246 .

Kowaltowski A J , Castilho R F , Vercesi A E (2001) . Mitochondrial permeability transition and oxidative stress . *FEBS Lett* . 495: 12 – 15 .

Lacolley P , Babuty D , Boulanger C , Ghaleh B , Loirand G , Pinet F , Samuel J L (2007). *Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux*. Edition *John Libbey Eurotext, Paris* . 312: 316 – 317 .

Levine R L (2002) . Carbonyl modified protein in cellular regulation aging and disease, Free radic . *Biol Med* . 32: 790 – 796 .

Li H B , Cheng K W , Wong C C , Fan K W , Chen F , Jiang Y (2007) . Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae . *Food chemistry* . 102: 771 – 776 .

Lopez G V , Batthyany C , Blanco F , Botti H , Trostchansky A , Migliaro E , Radi R , Gonzalez M , Cerecetto H , Rubbo H (2005) . Design, synthesis, and biological characterization of potential antiatherogenic nitric oxide releasing tocopherol analogs . *Bioorganic & Medicinal Chemistry* . 13: 5787 – 5796 .

Mansouri A , Embarek G , Kokkalou E , Kefalas P (2005) . Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*) . *Food Chemist* . 89: 411 – 420 .

Marnett L J (1999) . Lipid peroxidation –DNA damage by malon dialdehyde . *Mutat Res* . 424: 83 – 95 .

Marusawa H , Ichikawa K , Narita N , Murakami H , Ito K , Tezuka T (2002) . Hydroxyle radical as a strong electrophilic spiecies . *Bioorganic & Medicinal Chemistry* .10: 2283 – 2290 .

Merfort I , Wray V , Barakat H , Hussein S , Nawwar M , Willuhn G (1997) . Flavonoid triglycerides from seeds of *Nigella sativa* . *Phytochemistry* . 46: 359 – 363 .

Morikawa T , Xu F , Kashima Y , Matsuda H , Ninomiya K , Yoshikawa M (2004a) . Novel dollabellane-type diterpene alkaloids with lipid metabolism promoting activities from the seeds of *Nigella sativa* . *Organic Letters*. 6: 8698 – 72 .

Morikawa T , Xu F , Ninomiya K , Matsuda H , Yoshikawa M (2004b) . Nigellamines A3,A4, A5 and C, new dolabellane-type diterpene alkaloids, with lipid metabolism promoting activities from the Egyptian medicinal food black cumin . *Chemical & pharmaceutical bulletin* . 52: 494 – 497 .

Morsi N M (2000) . Antimicrobial effect of crude extracts of *Nigella sativa* on multiple antibioticsresistant bacteria . *Acta microbiologica Polonica* . 49: 63 – 74 .

Moon J K , Shibamoto T (2009) . Antioxidant assays for plant and food components . *J Agr Food Chem* . 57: 1655 – 1666 .

Newman D J , Cragg G M , Snader K M (2000) . The influence of natural products upon drug discovery . *Natural Product Report* . 17: 215 – 234 .

Nergiz C , Otlis S (1993) . Chemical composition of *Nigella sativa* seeds . *Food Chemistry* . 48: 259 – 261 .

Nergiz C , Otlis S (2003) . Some characteristics of nigella (*Nigella sativa* L.) seed cultivated in Egypt and its lipid profile . *Food Chemistry* . 83: 63 –68 .

Orsi-Llinares F (2005) . La nigelle, une epice d'interet medicinal. Thèse de doctorat en pharmacie . Universite Joseph Fourier. Faculte de Pharmacie De Grenoble. 18 ,25 .

Packer L , Kraemer K , Rimbach G (2001) . Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications . *Nutrition* . 17: 888 – 895 .

Pamplona R , Portero-Otin M , Requena J , Gredilla R , Barja G (2002) . Oxidative, glycoxidative and lipoxidative damage to rat heart mitochondrial proteins is lower after 4 months of caloric restriction than in agematched controls . *Mech Ageing Dev* . 123: 1437 – 1446 .

Peng J , Jones G L , Watson K (2000) . Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements, *Free Radic . Biol Med* . 28: 1598 – 1606 .

Poortmans J R , Boisseau N (2009) . Biochimie des activités physiques et sportives .
Edition de *Boeck université* . 503 .

Ramadan M F , Mörsel T J (2002a) . Direct isocratic normal-phase HPLC assay of fat-soluble vitamins and β -carotene in oilseeds. *European Food Research and Technology* . 214: 5215 – 27 .

Ramadan M F , Mörsel J T (2002b) . Direct isocratic normal-phase HPLC assay for fat soluble vitamins and β -carotene in oil seeds . *European food research and technology* . 214: 521 – 527 .

Ratnam D V , Ancola D D , Bhardwaj V , Sahana D K , Kumar N M V R (2006) , Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective . *Control Release* . 113: 189 – 207 .

Rezaire A (2012) . Activité anti-oxydant et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa) . Thèse de Doctorat université des Antilles et de la Guyane .

Richter C , Park J W , Ames B N (1988) . Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive . *Proc Natl Acad Sci U S A* . 85: 6465 – 6467 .

SAIDI B (2010) . *La graine de Nigelle : remède sacré ou sacré remède* . Paris: Iqra et Les Quatres Sources .

Sanchez-Moreno C (2002) . Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems . *International Journal of Food Science and Technology* . 8: 121 – 137 .

Scheibmeir H D , Christensen K , Whitaker S H , Jegaethesan J , Clancy R , Pierce J D (2005) . A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses . *Intensive Crit Care Nurs* . 21: 8 – 24 .

Sorg O (2004) . Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality . *Comptes Rendus A Biologies* . 327: 649 – 662 .

Sultan M T , Butt M S , Anjumi F M , Jamil A , Akhtar S , Nasir M (2009) . Nutritional profile of indigenous cultivar of black cumin seeds and antioxidant potential of its fixed and essential oil . *Pakistan Journal of Botany* . 41: 1321 – 1330 .

Takruri H R H , Dameh M A F (1998) . Study of the nutritional value of black cumin seeds (*Nigella sativa* L.). *J.Sci.Food Agric* . 76: 404 – 410 .

Toparslan C (2012) . À propos de *Nigella sativa* L . Thèse d'Etat de Doctorat en Pharmacie . Université de Lorraine .55 .

Vacaresse N , Vieira O , Robbesyn F , Jürgens G , Salvayre R , Negre-Salvayre A (2001) . Phenolic antioxidants trolox and caffeic acid modulate the oxidized LDL-induced EGF-receptor activation . *Br J Pharmacol* . 132: 1777 – 1788 .

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 .

Vercesi A E , Kowaltowski A J , Grijalba M T , Meinicke A R , Castilho R F (1997) . The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition . *Biosci.Rep* . 17: 43 – 52 .

Vertuani S , Angusti A , Manfredini S (2004) . The Antioxidants and Pro-Antioxidants Network: An Overview . *Curr. Pharm* . 10: 1677 – 1694 .

Vincent J L , Martin C (2008) . Le syndrome de détresse respiratoire aigue . Edition *Springer Berlin Heidelberg New York* . 172 .

Wardman P , Candeias L P (1996) . Fenton chemistry: an introduction . *Radiat Res* . 145: 523 – 531 .

Welch W J (1992) . Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease . *Physiol Rev* . 72: 1063 – 1081 .

Wolin M S (2009) . Reactive oxygen species and the control of vascularfunction . *Am J Physiol Heart Circ Physiol* . 296: 539 – 549 .

Wong C G , Bonakdar M , Mautz W J , Kleinman M T (1996) . Chronic inhalation exposure to ozone and nitric acid elevates stress-inducible heat shock protein 70 in the rat lung . *Toxicology* . 107: 111 – 119 .

Wu J M , Hsieh T C (2011) . Resveratrol: a cardioprotective substance . *Ann. N.Y. Acad. Sci* . 1215: 16 – 21 .

Abstract :

The present study is based on the knowledge of biological activity of the total oil of the seeds of the *Nigella sativa* plant.

In this context we attempted to evaluate the antioxidant activity of this oil. We started work by extracting the total oil from *Nigella sativa* seeds. The yield obtained of total oil (HT) is 9.65% of the seeds. Then the polyphenols and flavonoids were assayed, the results of the polyphenol assay by the Folin-Ciocalteu method are shown that HT consists of an amount of the polyphenols, of 3.379 μg EAG / mg extract and for the determination of flavonoids by aluminium trichloride, the results showed that the HT had a content of 6.923 EQ μg / g of extract. Finally, the trapping power of this extract was evaluated *vis-a-vis* the DPPH radical, the results showed that the HT is active with an IC 50 of 0.130 ± 0.0034 mg / ml. Similarly, the reducing power test showed that the HT exhibited a capacity which was characterized with an EC50 of 85.93 ± 0.007 mg / ml.

From the results obtained in this work, it can be said that oil seeds of *Nigella sativa* has considerable antioxidant activity.

Key words: total oil, *Nigella Sativa*, antioxidant activity, polyphenols, flavonoids.

الملخص

تهدف الدراسة الحالية إلى معرفة النشاطات البيولوجية للزيت الكلي لبذور نبات الحبة السوداء ,في هذا السياق حاولنا تقدير النشاطية المضادة للأكسدة ،بدأنا العمل باستخراج الزيت الكلي من بذور حبة السوداء .المردود الذي تم الحصول عليه للزيت الكلي 9,65 هو % من البذور , وبعدها انتقلنا إلى تحديد محتوى البوليفينول والفلونوي في الزيت المستخرج .

أظهرت نتائج فحص البوليفينول بواسطة طريقة فولين - سيوكالتيو أن الزيت الكلي يتكون من كمية من البوليفينول، حيث المحتوى هو 3.379 ميكروغرام / غ مكافئ حمض الغاليك من المستخلص. ولتحديد الفلافونويدات بواسطة طريقة ثلاثي كلوريد الألومنيوم، أظهرت النتائج أن الزيت الكلي يحتوي على 6,923 ميكروغرام / غ مكافئ الكارستين من المستخلص. و في الأخير قمنا بتقييم النشاطية المضادة لجذر DPPH للزيت الكلي حيث أظهرت النتائج أن الزيت الكلي أظهر نشاطية بقيمة IC 50 هي 0.130 ± 0.0034 ملغ/ مل. وبالمثل، أظهر اختبار القدرة الارجاعية حيث أن الزيت الكلي أظهر قدرة بقيمة EC50 هي 85.93 ± 0.007 ملغ/ مل.

بالنظر إلى النتائج التي تم الحصول عليها في هذا العمل، يمكننا أن نقول أن بذور الحبة السوداء لها نشاط مضاد للأكسدة معتبر وهذا النشاط يتركز في الزيت الكلي المستخلص من بذور هذه النبتة.

الكلمات المفاتيح: الزيت الكلي ، حبة السوداء ، النشاطية المضادة للاكسدة، البوليفينول ،الفلونويد.

Résumé :

La présente étude s'articule autour de la connaissance des activités biologiques et de la de l'huile totale des graines de la plante *Nigella sativa*.

Dans ce contexte nous avons tenté d'évaluer l'activité antioxydante de cette huile. Nous avons commencé le travail par l'extraction de l'huile totale de graines de *Nigella sativa*, le rendement obtenu de l'huile totale (HT) est de 9,65 % des graines, ensuite nous avons effectué le dosage des polyphénols et des flavonoïdes, les résultats du dosage des polyphenols par la méthode de Folin-Ciocalteu est montré que HT est constitué d'une quantité des polyphénols , où la teneur est 3.379 μg EAG/mg d'extrait et pour le dosage des flavonoides par trichlorure d'aluminium , les résultats ont montré que l'HT a une teneur 6,923 EQ μg /g d'extrait. Finalement on a procédé à l'évaluation du pouvoir piégeur de ce extrait *vis -a -vis* le radical DPPH , les résultats ont montré que l' HT est active avec une IC50 de 0.130 ± 0.0034 mg/ml. De même, le test du pouvoir réducteur a montré que l' HT présente une capacité qui se caractérise avec une EC50 de 85.93 ± 0.007 mg/ml.

D'après les résultats obtenus dans ce travail, on peut dire que l'huile les graines de *Nigella sativa* possède une activité antioxydante considérable.

Mots clés : huile totale , *Nigella Sativa* , activité antioxydante , polyphenols , flavonoides .

Dernoune Ouissal

Hamma Rayene

**Thème : Evaluation de l'activité antioxydante de l'huile des
graines de *Nigella sativa***

Résumé :

La présente étude s'articule autour de la connaissance des activités biologiques et de la de l'huile totale des graines de la plante *Nigella sativa*.

Dans ce contexte nous avons tenté d'évaluer l'activité antioxydante de cette huile. Nous avons commencé le travail par l'extraction de l'huile totale de graines de *Nigella sativa*, le rendement obtenu de l'huile totale (HT) est de 9,65 % des graines, ensuite nous avons effectué le dosage des polyphénols et des flavonoïdes, les résultats du dosage des polyphenols par la méthode de Folin-Ciocalteu est montré que HT est constitué d'une quantité des polyphénols , où la teneur est 3.379 μg EAG/mg d'extrait et pour le dosage des flavonoïdes par trichlorure d'aluminium , les résultats ont montré que l'HT a une teneur 6,923 EQ μg /g d'extrait. Finalement on a procédé à l'évaluation du pouvoir piégeur de ce extrait *vis -a -vis* le radical DPPH , les résultats ont montré que l' HT est active avec une IC50 de 0.130 ± 0.0034 mg/ml. De même, le test du pouvoir réducteur a montré que l' HT présente une capacité qui se caractérise avec une EC50 de 85.93 ± 0.007 mg/ml.

D'après les résultats obtenus dans ce travail, on peut dire que l'huile les graines de *Nigella sativa* possède une activité antioxydante considérable.

Mots clés : huile totale , *Nigella Sativa* , activité antioxydante , polyphenols , flavonoïdes .

Présidente du jury : MAAMMERI –HABIBATNI Zineb (MCA-UFM Constantine).

Rapporteur : MOSBAH Asma (MCB –UFM Constantine).

Examinatrice : HALMI Sihem (MCB –UFM Constantine).