



**République Algérienne Démocratique et Populaire**

**MINISTER DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE UNIVERSITE DE CONSTANTINE 1**

**Faculté de Science de la Nature et de la Vie  
Département de Biochimie-Biologie Cellulaire et Moléculaire  
Option : Biochimie Moléculaire et Santé**

## *Mémoire*

*Présente pour l'Obtention du Diplôme de Master en Biochimie  
Moléculaire et Santé*

Présenté par:

**ALIOUAT Assia**

**BOULKELIA Noussaiba**

## *Thème*

**Activité antioxydant des extraits des  
graines de la plante *Nigelle sativa L***

*Soutenu le: 02/07/2014*

**Devant le jury:**

**Président : Dr .BOUSEBA B.**

M.C.B. Université Constantine 1.

**Rapporteur : Melle . MOSBAH A.**

M.A.B.Université Constantine 1.

**Examineur :Mr.MOKRANI E.H**

M.A.B.Université Constantine 1.

**Année universitaire : 2013 - 2014**



**République Algérienne Démocratique et Populaire**

**MINISTER DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE UNIVERSITE DE CONSTANTINE 1**

**Faculté de Science de la Nature et de la Vie  
Département de Biochimie-Biologie Cellulaire et Moléculaire  
Option : Biochimie Moléculaire et Santé**

## *Mémoire*

*Présente pour l'Obtention du Diplôme de Master en Biochimie  
Moléculaire et Santé*

Présenté par:

**ALIOUAT Assia**

**BOULKELIA Noussaiba**

## *Thème*

**Activité antioxydant des extraits des  
graines de la plante *Nigelle sativa L***

*Soutenu le: 02/07/2014*

**Devant le jury:**

**Président : Dr .BOUSEBA B.**

M.C.B. Université Constantine 1.

**Rapporteur : Melle . MOSBAH A.**

M.A.B.Université Constantine 1.

**Examineur :Mr.MOKRANI E.H**

M.A.B.Université Constantine 1.

# *Remerciement*

*Au terme de cette recherche, nous sommes heureux de pouvoir remercier tous ceux et celles qui nous ont accompagné et setenu tout au long de cette aventure.*

*Nous voudrons tout d'abord remercier notre encadreur, mademoiselle MOSBAH ASMA maitre assistante à l'université de Constantine nous avoir donné la possibilité de réaliser ce travail, nous vous remercie pour ses conseils pratiques et scientifiques tout au long de ce travail, et son aide précieuse lors de la réalisation de la partie pratique.*

*Nous tenons à présenter notre sincère et vif remerciement à Les membre de jury Dr .BOUSBAË B et Mr. MOKRANI E.H, qui ont accepté de juger notre travail.*

## *Dédicace*

*J'ai l'honneur de dédie ce modeste travail à mes chers parents BACHIR et SABAH qui m'avez dirigé et suivi pondent toute mes années d'étude et surtout ma mère pour leurs sacrifices de tous les instants, sa patience sans limite et l'éducation qu'elle ma donnée, je lui dit merci mille fois.*

*Je ne pourrai jamais oublier d'exprimer ma profonde gratitude à:*

*Ma cher grande mère : DEBACHE YAMINA.*

*Mon cher frère : TAKIE EL DDINE.*

*Ma sœur: CHAHRAZED.*

*Ma sœur: SARAH.*

*Mes oncles et mes tantes : DJAMEL, MOURAD, SAMIR, IMEN, HANEN, SAMEH, MOUNA et SABRINA et à tous mes cousins et mes cousines surtout RANIA et SONIA.*

*Egalement je dédie ce travail à mes amies:, ASSIA, ABLA, AIDA, RADIA, MERIEM et à tous mes collègues.*

*Enfinement je dédie ce travail à mon cher grand père AMMAR et ma grande mère qui aime beaucoup NOUARA (Que Dieu ait pitié).*

*BOULKELIA Noussaiba*

# *Dédicace*

*J'ai l'honneur de dédie ce modeste travail à mes chers parents, qui m'avez dirigé et suivi pondent toute mes années d'étude et surtout ma mère pour leurs sacrifices de tous les instants, sa patience sans limite et l'éducation qu'elle ma donnée, je lui dit merci mille fois.*

*Je ne pourrai jamais oublier d'exprimer ma profonde gratitude à:*

*Ma sœur: NADJET, son mari IDRISSE et ses enfants: MANAR,  
BASMALA, LOULOU et AYOUB.*

*Ma sœur: ISMAHAN, son mari KAROUM.*

*Ma sœur: ALIA, son mari ZOUHIR,*

*Ma sœur: FAKIA, son mari AZDIN et ses enfants: ARIJ et  
INASSE.*

*Ma sœur: ABLA, son mari NASRO et ses enfants: TASNIM et  
TASDIH.*

*Mes sœurs: WARDA et son fiancé, IMAN et NADJWA.*

*Egalement je dédie ce travail à mon cher MOUNIR, Et mes  
amies: MOUNA, HOUDA, ABLA, NOUSSAIBA et à tous mes  
collèges.*

*.ALIOUAT Assia*

# REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

# SOMMAIRE

<b>Introduction générale</b> .....	1
<b>Revue bibliographique.</b>	
<b>Chapitre 1: <i>Nigella sativa L</i></b>	
1. Définition .....	2
2. Aspect morphologique et botanique de <i>Nigella sativa L</i> .....	2
3. Composition chimique .....	4
3.1. L'huile essentielle.....	4
3.2. Les huiles fixes .....	5
3.3. Les flavonoïdes.....	5
4. Activités biologiques et propriétés pharmacologiques de <i>Nigella sativa L</i> .....	5
4.1. Activité antioxydantes.....	5
4.1.1.Études <i>in vitro</i> .....	6
4.1.2.Études <i>in vivo</i> .....	6
4.2. Activité antimicrobiennes .....	7
4.3. L'activité antiparasitaire .....	7
4.4. Activité antidiabétique .....	8
4.5. Activité anti-inflammatoire et analgésique.....	8
4.6. Activité antiulcéreuse .....	8
<b>Chapitre 2: Le stress oxydatif</b>	
1. Définition de stress oxydatif .....	9

2. Les radicaux libres de la biologie.....	9
2.1. L'origine des radicaux libres .....	11
2.1.1. La production endogène .....	12
2.1.2. La production exogène .....	13
3. Les principales espèces réactives de l'oxygène .....	14
3.1. Le radical superoxyde .....	14
3.2. Le peroxyde d'hydrogène .....	15
3.3. Le radical hydroxyle .....	15
3.6. L'oxygène singlet .....	16
4. Les conséquences du stress oxydant.....	16
4.1. Les dommages oxydatifs à l'ADN.....	17
4.2. Les dommages oxydatifs aux lipides.....	17
4.3. Les dommages oxydatifs aux protéines.....	17
4.4. Les dommages oxydatifs aux sucres.....	17
5. Systèmes de défenses antioxydants .....	18
5.1. Systèmes antioxydants enzymatiques.....	18
5.1.1. Superoxyde dismutase (SOD) .....	19
5.1.2. Glutathion peroxydase (GPx) et réductase (GR) .....	20
5.1.3. Catalase (CAT).....	20
5.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques.....	21
5.2.1. Glutathion.....	21
5.2.2. Ubiquinones et cytochrome c.....	21



5.2.3. Vitamine E et vitamine C.....	22
6. Le stress oxydatant et les pathologies.....	23

### **Chapitre 3: Matériels Et Méthodes**

1. Matériels .....	25
1.1. Réactifs chimiques.....	25
2. Méthodes.....	25
2.1. Préparation de l'extrait brut .....	25
2.2. Tests, <i>in vitro</i> , de l'activité antioxydante.....	27
2.2.1. Effet scavenger du radical DPPH.....	27
2.2.2. Chélation du fer ferreux.....	28
2.2.3. Test du pouvoir réducteur.....	29
2.2.4. Effet scavenger du radical hydroxyl .....	29
3. Analyse statistique.....	30

### **Chapitre 4: Résultat Et Discussions**

1. Tests, <i>in vitro</i> , de l'activité antioxydant .....	31
I.1.Préparation des extraits à partir des graines de <i>nigella sativa L</i> .....	31
I.2.Effet scavenger du radical DPPH.....	32
I.3.Chélation du fer ferreux.....	34
I.4. Le pouvoir réducteur.....	36
I.5. Effet scavenger du radical hydroxyle.....	39

**Conclusion et perspectives** ..... 41

Références bibliographiques.....

## Liste des tableaux

**Tableau N°1:** Composition générale des graines de *Nigella sativa* L..... 3

**Tableau N°2:** Aspects, couleurs et rendements des divers extraits à partir des graines de *Nigella sativa* L en pourcentage par rapport au poids total des graines..... 31

## Liste des figures

<b>Figure N°1:</b> Aspect morphologique de la plante <i>Nigella sativa L.</i> .....	3
<b>Figure N°2:</b> Schéma des différentes formes de ROS.....	11
<b>Figure N°3:</b> L'Origine des radicaux libres.....	12
<b>Figure N°4 :</b> Pyramide des systèmes de défenses antioxydants.....	18
<b>Figure N°5:</b> Schéma des défenses antioxydantes enzymatiques.....	19
<b>Figure N°6:</b> Schéma des réactions d'élimination des radicaux lipidiques par les vitamines E et C. .....	22
<b>Figure N°7 :</b> Les effets du stress oxydant.....	24
<b>Figure N°8:</b> La méthode d'extraction des huiles essentielles des grains de <i>Nigella sativa L.</i> .....	26
<b>Figure N°9 :</b> Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.....	27
<b>Figure N°10:</b> Activité anti radicalaire des extraits des graines de <i>Nigella sativa L</i> et de la quercétine. .....	33
<b>Figure N°11:</b> Activité chélatrice des extraits des graines de <i>Nigella sativa L</i> et de l'EDTA. .....	35
<b>Figure N°12:</b> Pouvoir réducteur des extraits des graines de <i>Nigella sativa L</i> et de la quercétine. .....	37
<b>Figure N°13:</b> La transformation par le modèle logarithmique. ....	38
<b>Figure N°14:</b> Effet scavenger du radical hydroxyle des extraits des graines de <i>Nigella sativa L</i> et de l'acide ascorbique. ....	40

## Liste des abréviations

**Abs** : Absorbance

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique.

**ATP**: Adenosine-5'-Triphosphate.

**CCl<sub>4</sub>** : Tétrachlorure De Carbone.

**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde De Carbone.

**CPG**: Chromatographie en phase gazeuse.

**Cu/Zn-SOD**:Superoxyde Dismutase Aux Ions Cuivre Et Zinc.

**Cu** : Le Cuivre.

**DHLA** : Acide Dehydrolipoïque.

**DMSO**: Dimethylsulfoxyde.

**DPPH**: 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl.

**EBr** : Extrait brut des graines de *Nigella sativa*

**EC50**: Concentration effective à 50%

**EC-SOD**: Superoxyde Dismutase Extra Cellulaire.

**EDTA** : Ethylene diamine tetraacetic

**EMeOH** : Extrait Methanolique

**Fe** : Le Fer.

**Fe<sup>2+</sup>** : Le Fer Ferreux.

**Fe<sup>3+</sup>**: Le Fer Ferrique.

**GC-MS**: Gas chromatography – Mass pectroscopy.

**GPx** : Glutathion Peroxydase.

**GR** : Glutathion Reductase.

**GSH** : Glutathion Réduit.

**GSH/GSSG** : Glutathion Réduit/Oxydé.

**GSSG**: Gluthation Oxydé.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde D'hydrogène.

**IC50**: Concentration inhibitrice a 50%

**LA** : Acide Lipoïque.

**LOO•**: Radical Peroxyle Lipidique

**LOOH**: **Hydroperoxyle** Lipidique.

**MCMV** : Cytome Galovirus Murin

**Mn** : Le Manganèse

**Mn-SOD** : Superoxyde Dismutase Associée Au Manganèse

**NADPH, H<sup>+</sup> /NADP<sup>+</sup>**: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Réduit/Oxydé

**NO<sub>2</sub>**: Dioxyde D'azote

**O<sub>2</sub>**: Dioxygène

**O<sub>3</sub>** : Ozone

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** : Anion Superoxyde

**OH<sup>-</sup>** : Ion Hydroxyde

**OH•**: Radical Hydroxyle

**PHGPx**: La Phospholipide-Hydroperoxyde Glutathion Peroxydase

**ROS** : Espèces Reactives Oxygénées (Reactive Oxygen Species)

**Se** : Le Sélénium

**SO<sub>2</sub>** : Dioxyde De Sulfure

**SOD** : Superoxyde Dismutase

**SH** : Groupements Sulfhydryles

**TCA**:Trichloro-Acetic-Acid

**Vit. C** : Vitamine C

**Vit. E** : Vitamine E

**Zn** : Le Zinc

# INTRODUCTION GÉNÉRALE

## Introduction générale

Généralement les plantes médicinales sont utilisées pour traiter des différentes maladies pathologiques communes depuis anciens temps; plusieurs recherches pharmacologiques se font pour confirmer les propriétés thérapeutiques des différents métabolites de ces plantes médicinales et aussi pour identifier les principes actifs d'origine naturelle.

Un très grand nombre des plantes contiennent des milliers de substances actives trouvées dans leurs différents organes soit dans les feuilles, les fleurs ou dans les racines, pour l'isolement du principe actif, des techniques chimiques sont utilisées telles que l'extraction, distillation à la vapeur...etc. Ces principes actifs sont utilisés pour préparer des différents médicaments pharmaceutiques d'origine naturelle ont des effets thérapeutiques très efficaces mais avec des effets secondaires, par contre les médicaments d'origine chimique qui ont des effets secondaires dangereux [1].

Nombreuses recherches scientifiques ont affirmé soit *in vivo* ou *in vitro* l'étude de la capacité thérapeutique des compositions chimiques des graines de la *Nigelle* en comparant par rapport à leurs activités pharmacologiques; parmi lesquelles (l'activité anti-inflammatoire, antioxydante, antidiabétique, anticancéreuse et antimicrobienne...etc). Ces études ont été confirmées que les principes actifs qui assurent ces activités pharmacologiques se trouvent dans les huiles essentielles de ces graines [2].

L'objectif essentiel de notre étude consiste à étudier l'activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa L in vitro*. Dans une première étape on n'a procédé à l'extraction des extraits de l'huile totale et méthanolique de cette plante par une méthode de Bligh-Dyer modifiée (1992) [3].

En suite, on a testé l'activité antiradicalaire de ces extraits suivant quatre tests:

\*L'effet scavenger du radical DPPH.

\*Chélation du fer ferreux.

\*Test du pouvoir réducteur.

\*Effet scavenger du radical hydroxyl.



# Chapitre 1: la plante *Nigella sativa* L

## 1. Définition

*Nigella sativa L* est une plante développe sur les terres semis arides au sein de communautés naturelles prédominent les thérophytes [4,5].

En fait, cette plante est occupé une place spéciale pour son grand spectre d'application médicale dans la civilisation islamique, dû au proverbe du Prophète Mohamed (salut et merisécorde soit sur lui); « El habbah sauda est un médicament pour toutes les maladies sauf la mort », ces paroles sont restées pour longtemps un mystère pour la science jusqu'à l'arrivée des techniques modernes qui ont réussi à prouver les vertus thérapeutiques des graines de cette plante.

Elle ce trouve généralement dans la plupart pays de mande comme l'Europe centrale, de l'ouest de l'Asie et certain pays d'arabe. Traditionnellement utilisée comme des fins culinaires et médicinales. Elle est considérable comme un remède naturel pour plusieurs pathologies, sur tous les traitements de l'asthme, de l'inflammation, de la toux, de l'eczéma et des états grippaux. La graine ou l'huile de la nigelle est issue et employée comme diurétique, carminatif, cholagogue et vermifuge [6].

## 2. Aspect botanique de *Nigella sativa L*

*Nigella sativa L* est une plante annuelle herbacée originaire du moyen orient appartenant à la famille des Renonculacées [7], elle est atteignant 30 à 60 cm de hauteur. Les feuilles pennatiséquées, divisées en lobes étroits, elles sont lancéolées à linéaires et présentent des onglets nectarifères, les feuilles inférieures sont petites et pétaloïdes et les supérieures sont longues [8,6]. Les fleurs sont petites à pétales blanchâtres et sépales pétaloïdes et présentent de nombreuses étamines insérées sur le réceptacle [6]. Elles peuvent être de différentes couleurs du bleu sombre ou clair en passant par le rose jusqu'au blanc.

La plante est hermaphrodite à reproduction autonome dans le fruit qui a une forme d'une capsule constituer de 3 à 6 carpelles soudés entre eux jusqu'à la base des styles persistants [8]. Chaque capsule contient plusieurs graines triangulaires blanchâtres et à maturité, elles s'ouvrent et l'exposition des graines à l'air les rend noire [6] (**Figure 1**).



Fleure



Capsule



Graines



**Sous règne :** Comophyte  
**Supra embranchement :** Rhizophyte  
**Embranchement :** Spermaphyte  
**Sous embranchement :** Angiosperme  
**Classe :** Eudicotylédone  
**Sous classe :** Audicots archaïques  
**Ordre :** Ranunculales  
**Famille :** Renonculacées  
**Sous famille :** Helloboroidées  
**Genre :** *Nigella*  
**Espèce :** *Nigella arvensis*

(Guignard, 2001)

**Figure N° 1:** Aspect morphologique de la plante *Nigella arvensis* L [7]

### 3. Composition chimique

La plus par des études phytochimiques exécuter pour déterminer la composition chimique et les principes actifs des graines de *Nigella sativa L.*, ont révélées qu'elle est riche par: des lipides, protéines, acides aminés, glucides et des métabolites secondaires en quantité bien moins grande : terpénoïdes, polyphénols, alcaloïdes, acides organiques (Ces métabolites secondaires jouent un rôle de protection contre les attaques d'herbivores ou de pathogènes et améliorent l'efficacité de la reproduction). Elles contiennent aussi des monosaccharides tels que le glucose, rahmnose, xylose, arabinose et des polysaccharides non amidonnés sous forme de fibres alimentaires [9]. Ces substances chimiques qui sont varie selon les conditions géographiques comme le climatiques, la nature de la terre...ect, ainsi que les méthodes d'extraction et de détection.

En plus de ces composés majoritaires, *Nigella sativa L* contient des huiles essentielles, des huiles fixes et des acides gras. Elle contient aussi plusieurs vitamines (A, B, B2, C et Niacine) et des sels minéraux (Ca, K, Fe, Zn, Mn et Se) [10].

**Tableau N°1** : Composition générale des graines de *Nigella sativa L.* [11]

Composition	Glucides	Protéines	Fibres	Lipides	Cendres	Eau
Teneur en %	37,4	20,2	6,6	32,0	4,0	6,4

#### 3.1. L'huile essentielle

L'huile essentielle de la nigelle s'obtient par distillation à la vapeur d'eau de l'huile végétale obtenue par première pression à froid. Sa composition peut varier énormément suivant les pratiques culturales de la plante et les conditions environnementales. On obtient entre 1,4 à 1,9 % du poids de l'huile fixe et 0,18 à 0,50 % du poids des graines [12]. L'analyse de cette huile par GC-MS réalisée par l'équipe de Bucar (2000) a permis d'identifier 32 composants, dont la majorité d'entre eux sont ;la thymoquinone (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 tanethol (0,25- 4,28 %) [13].

L'huile essentielle de *Nigella sativa L* cultivée au Sahara algérien (Timimoune et Adrar), extraite par deux méthodes différentes; l'hydro distillation et distillation par micro-onde a été analysée par CPG et GC-MS, 112 composés ont été identifiés et caractérisés, le p-cymène représente toujours le composé le plus abondant suivi de la thymoquinone [14].

### 3.2. Les huiles fixes

Généralement Les huiles fixes sont des sources d'énergies, l'extraction des ces huiles se fait par pression à froid sont majoritairement composées de triglycérides (57,50%). Ils contiennent aussi une faible fraction de lipides polaires (3,70%), des monoacyl-glycérol et diacyl-glycérol avec des proportions respectives de 4,80% et 5,10%. On y trouve aussi des stérols libres et estérifiés [15].

### 3.3. Les flavonoïdes

Comme beaucoup de renonculacées, la *Nigella sativa L* cultivée est riche en flavonols. Plusieurs flavonols triglycosylés ont été isolés à partir des grains de *Nigella sativa L*, la quercétine-3-glycosyl, (1-2), galactosyl, (1-2) glucoside, kœmpférol, 3-glycosyl, (1-2) galactosyl, (1-2) glucoside et quercétine-3-(6 feruloglucosyl), (1-2) galactosyl, (1-2) glucoside [16].

## 4. Activités biologiques et propriétés pharmacologiques de *Nigella sativa L*

Depuis un siècle, de nombreux travaux ont porté sur l'étude de *Nigella sativa L*, notamment sur les effets dus aux extraits et sur les principaux constituants de la graine, surtout la thymoquinone.

### 4.1. Activité antioxydantes

Parmi les différentes études *in vitro* et *in vivo* qui ont été effectuée pour évaluer l'effet et l'activité antioxydante des différents constituants des graines de *Nigella sativa L*.

#### 4.1.1. Études *in vitro*

Plusieurs études *in vitro* se sont intéressées à l'activité antioxydante de l'huile essentielle de nigelle. Ses monoterpènes (thymoquinone, carvacrol, t-anéthol et 4-terpinéol) possèdent une activité anti-radicalaire qui peut être mise en évidence par divers procédés. En effet, les extraits éthanolique et aqueux ont retardé l'oxydation des triglycérides de l'huile de maïs à 100°C, la capacité antioxydante des extraits éthanolique était supérieur aux extraits aqueux. L'activité antioxydante de l'extrait éthanolique est comparable à celle de la tert-butylhydroquinone (2 - (1,1-diméthyléthyl) -1,4-benzènediol), un

antioxydant utilisé dans les cosmétiques, et utilisé comme conservateur des acides gras insaturés dans l'alimentation [17].

En 2000, Burits et Bucar se sont intéressés à l'activité antioxydante de l'huile volatile. Ils ont mis en évidence une activité anti-radicalaire de la thymoquinone, du carvacrol, du t-anéthol et du 4-terpinéol. Ils ont neutralisé les radicaux hydroxyles dans la peroxydation lipidique non enzymatique [18].

Les fragments de l'huile fixe (lipides neutres, glycolipides et phospholipides) ont proposé une activité antioxydante vis-à-vis des deux radicaux libres stables: le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) et le glavinoxyl. Cette activité antioxydante est insérée à la teneur en acides gras polyinsaturés, en composés insaponifiables et en phospholipides, de même que la valeur peroxyde initiale de l'huile [19].

#### **4.1.2. Études *in vivo***

Les études *in vivo* de l'huile de *Nigella sativa L* ont montré son rôle protecteur contre l'hépatotoxicité induit par le tétrachlorométhane (CCl<sub>4</sub>) et a rétablir le profil lipidique sérique. [20,21]. Les taux anormalement élevés de potassium et calcium et la numération de la formule sanguine abaissée par le CCl<sub>4</sub> ont été restaurés par l'huile de nigelle [22,23]. Elle a diminué les enzymes hépatiques élevées et augmenté les enzymes antioxydantes diminuées ; *Nigella sativa L* a lutté contre la fibrose hépatique par le CCl<sub>4</sub> [24].

Dans une autre étude, l'huile de *Nigella sativa L* augmente la concentration en glutathion et le système de défense antioxydant au niveau du cortex rénal, de façon dose-dépendante du point de vue biochimique et histologique, ce qui implique une protection contre la néphrotoxicité [25].

D'autres recherches se sont bénéficié particulièrement à la thymoquinone. Un prétraitement avec de la thymoquinone a présentée une action hépatoprotectrice chez les rats après une injection de CCl<sub>4</sub>, contrairement au p-cymène et à l' $\alpha$ -pinène qui n'ont eu aucun effet protecteur antioxydan [26,27].

L'administration de l'huile de *Nigella sativa L* et de la thymoquinone chez des rats protège contre l'hyperhomocystéinémie induite par la méthionine en bloquant l'accumulation de L'homocystéine, l'une des causes de l'état du stress oxydant, conduisant à la protection contre la peroxydation lipidique et les changements du statut oxydatif [25].

#### **4.2. Activité antimicrobiennes**

Les différents extraits des graines de *Nigella sativa L* présentent un large spectre d'inhibition vis-à-vis de nombreuses souches bactériennes. Les extrais de la nigelle possède également un

pouvoir inhibiteur supérieur à celui de la gentamicine sur une vingtaine de souches de *Listeria monocytogenes*. Ces extraits brut possède aussi un effet antiviral vis-à-vis du virus de l'herpès : cytomégalovirus murin (MCMV) [28, 29].

L'huile fixe de cette graine présente aussi une excellente activité antifongique, notamment sur *Aspergillus Niger* [30]. Par ailleurs, la thymoquinone exerce une activité inhibitrice sur de huit espèces de dermatophytes [31].

#### **4.3. Activité antiparasitaire**

De nombreuses études ont montré l'efficacité des extraits de la nigelle. L'huile fixe de graine de *Nigella sativa L* présente des propriétés anticestodales et anti-nématodiques comparables à celles de la pipérazine [30]. D'autres travaux montrent que ce l'huile fixe administrée par voie orale à raison de 2,5 à 5 ml/kg pendant deux semaines, est responsable de la réduction du nombre de *Schistosoma mansoni* dans le foie et diminue le nombre des œufs déposés dans le foie et les intestins [32].

#### **4.4. Activité antidiabétique**

Certaines recherches orienté les propriétés antidabitique de graine de *Nigella sativa L*. Les effets des extrais de cette graine sur certaines complications du diabète expérimental induit chez le lapin ont fait l'objet de nombreux travaux. L'insulinémie n'ayant pas été affectée par les traitements, l'effet hypoglycémiant observé se manifeste selon un mécanisme, non encore identifié, n'impliquant pas l'insuline [33].

#### **4.5. Activité anti-inflammatoire et analgésique**

Plusieurs travaux proposés que L'huile fixe de la nigelle soit responsable d'une importante activité analgésique, cette action ayant été antagonisée par la naxolone [35]. Cette huile présente en outre un effet réducteur significatif sur le SNC. Ces propriétés ont été confirmées par les travaux d'Abdel Fatah et al, qui ont mis en évidence un effet antinociceptif d□ aussi bien à l'huile fixe qu'à la thymoquinone par activation indirecte des récepteurs superspinaux  $\alpha 1$  et kappa [35]. Le mécanisme par lequel l'huile fixe de *Nigella sativa* et la thymoquinone exercent leurs effets anti-inflammatoires a été étudié et s'est affirmé être un puissant inhibiteur du thromboxane B2 et des leucotriènes B4 par inhibition respective des cyclo-oxygénase et lipo-oxygénase [36,37 ,38].

#### **4.6. Activité antiulcéreuse**

L'huile fixe qui retiré a partir des graines de *Nigella sativa L* a été administrée à raison de 0,88 g/kg par jour pendant deux semaines, augmente la mucine gastrique et le contenu en glutathion et diminue le taux d'histamine, sans affecter l'acidité libre ni le suc gastrique [39,40]. Les études complémentaires sont nécessaires pour démontrer les mécanismes d'action des différents extraire des graines de la nigelle. En effet, cette plante présente déjà des applications en phytothérapie, notamment sous forme de gélules à base d'huile fixe revendiquant l'allégation « complément alimentaire à activité immunomodulatrice ».



# Chapitre 2: stress oxydatif

# 1. Le stress oxydant

## 1.1 Définition

Le stress oxydatif, parfois appelé stress oxydant, dans les systèmes biologiques, le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre entre la production des radicaux libres et la destruction par des systèmes de défenses anti-oxydantes donc c'est un déséquilibre de la balance antioxydants/pro-oxydant en faveur des pro-oxydants. Se définit aussi comme un état dans lequel le niveau de l'oxygène réactif toxique intermédiaires surmonte les défenses antioxydantes endogènes de l'hôte; Il se développe lorsque il y a une surproduction des radicaux libres et un déficit en antioxydantes, c'est-à-dire les molécules oxydants sont produits plus rapidement qu'ils ne peuvent être neutralisés par l'organisme, donc l'origine du stress oxydatif sont les radicaux libres principalement [41, 42, 43].

## 2. Les radicaux libres de la biologie

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule très réactive contenant un ou plusieurs électrons non paires dans ses orbitales. Ce déséquilibre n'est que transitoire et il est comblé soit par l'acceptation d'un autre électron soit par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule. Ces espèces radicalaires très instables et très réactives sont produites d'une manière continue, dans de nombreux phénomènes biologiques [44].

Les radicaux libres sont indispensables à la vie parce qu'ils participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, au cycle cellulaire, à la différenciation cellulaire, à la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones.

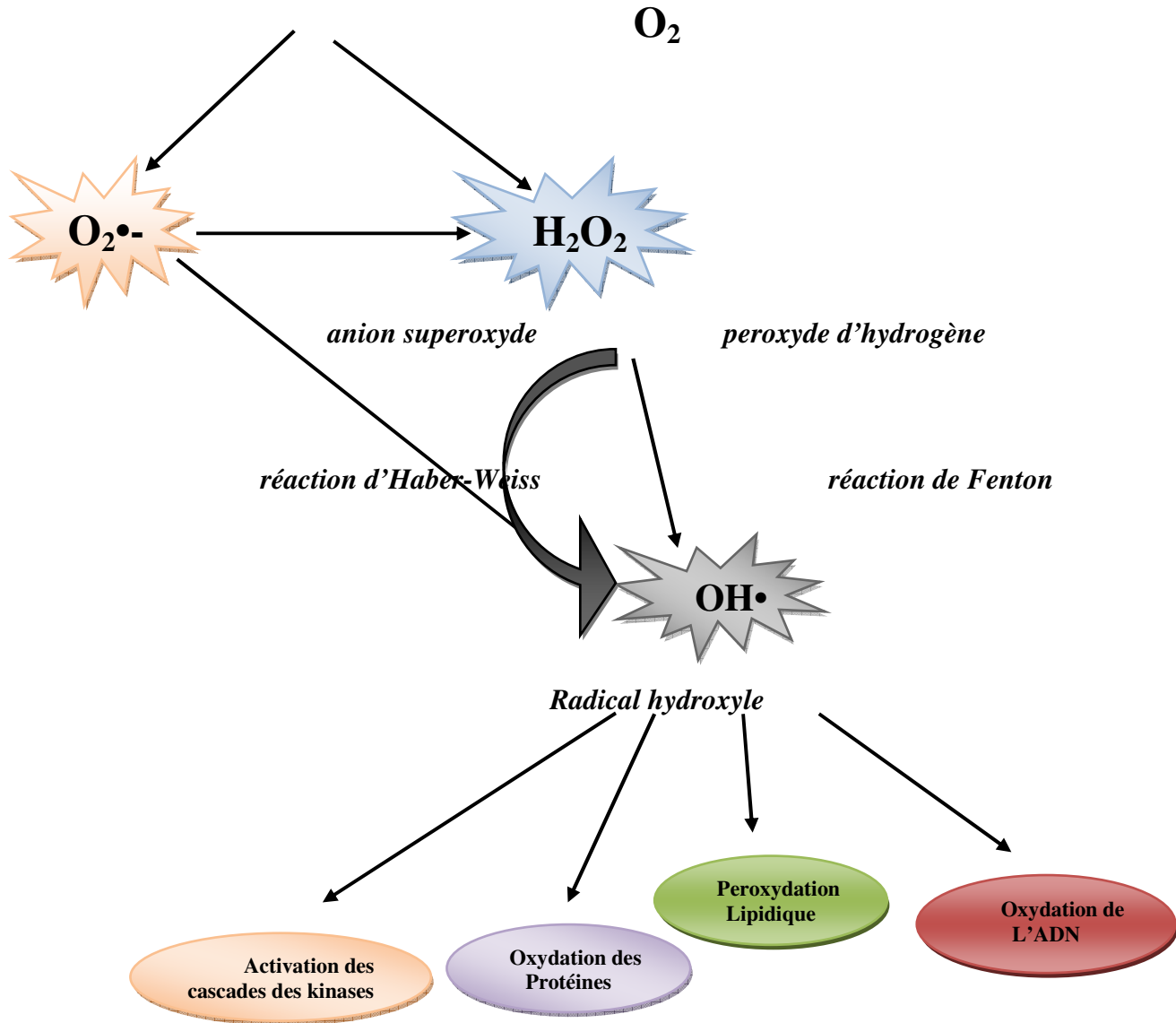
Mais de façon générale, les radicaux libres contribuent au stress oxydatif par une série de réactions en chaîne. Leur durée de vie est très courte ( $10^{-4}$ s) et leur réactivité réside dans la recherche d'un électron afin de ré-apparier leur électron célibataire [45]. Et notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule, à la régulation des gènes, phénomène appelé contrôle redox des gènes.

Parmi toutes les espèces radicalaires probablement qui se forment dans les cellules, on a distingué deux types d'espèces radicalaires sont les radicaux primaires et secondaires.

Les radicaux primaires sont un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie. Les radicaux secondaires sont les autres radicaux libres qui se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule.

Ces radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) et le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ), ou de l'azote tel le monoxyde d'azote ( $NO^{\cdot}$ ) [46]. D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet  $^1O_2$ , le

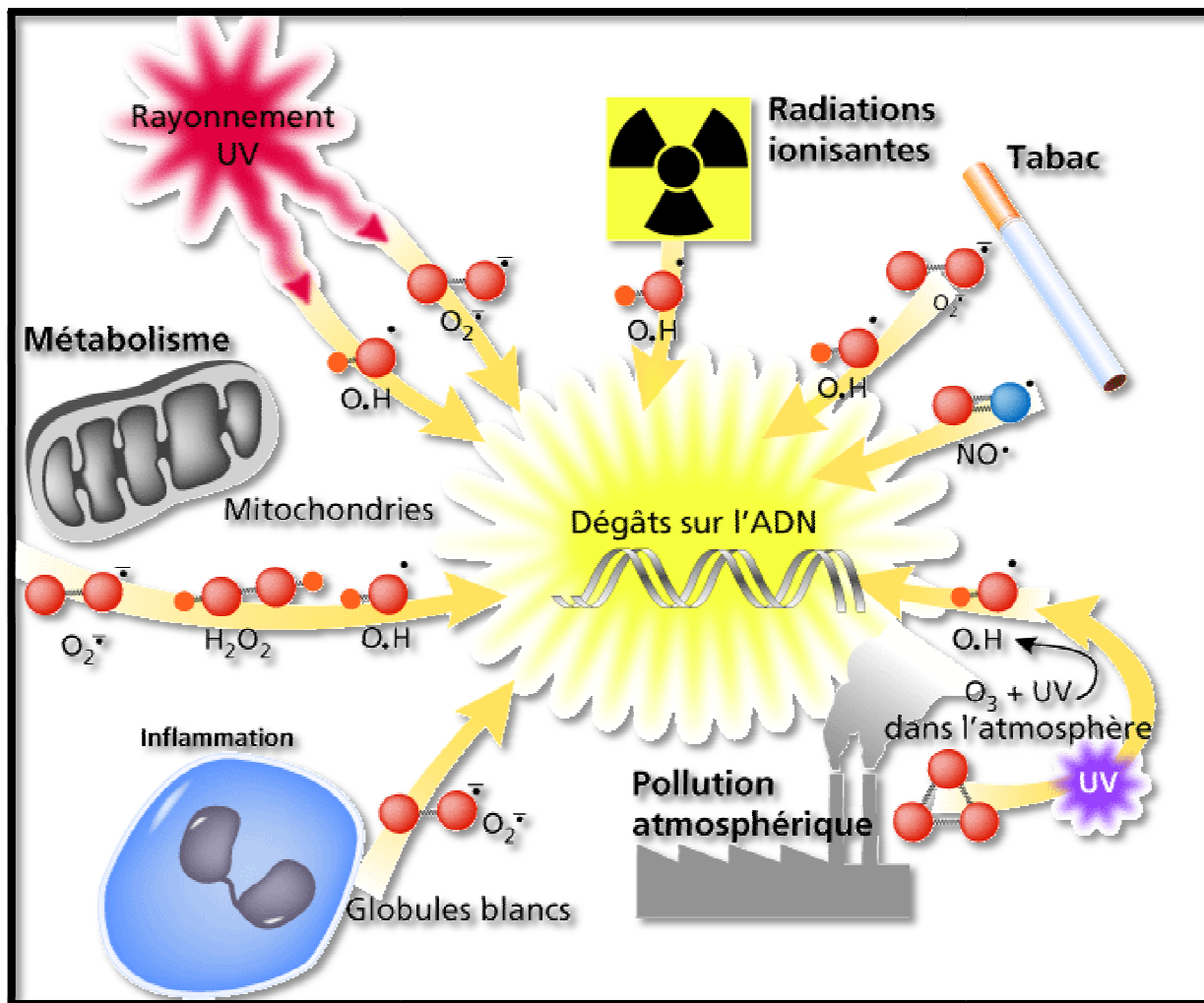
peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou le nitroperoxyde ( $ONOOH$ ), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (figure N°2).



**Figure N°2:** Schéma des différentes formes de ROS

### 2.1. L'Origine des radicaux libres

Les facteurs responsables de l'augmentation de la production de radicaux libres par l'organisme sont appelés facteurs oxydants. Ils se divisent en deux facteurs endogènes et exogènes (figure N°3).

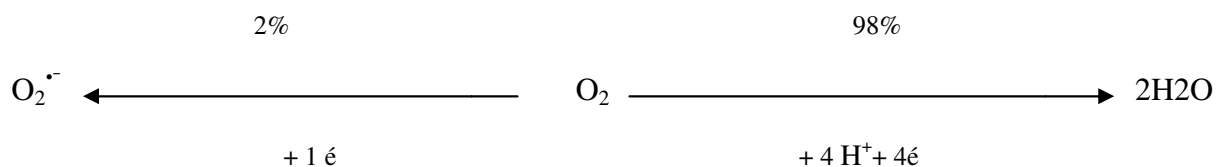


**Figure N°3:** L'Origine des radicaux libres [47].

### 2.1.1. La production endogène

La formation endogène de radicaux libres s'effectue au niveau de divers organites cellulaires :

- ❖ **Les mitochondries** : Une des plus grandes sources endogènes de production de radicaux libres, organite utilisant de l'oxygène pour produire de l'ATP. Au cours de la respiration cellulaire, 95 à 99 % de l'oxygène consommé est réduit en eau. La réduction de l'oxygène moléculaire par les cytochromes respiratoires cellulaires s'accompagne d'une formation parallèle d'environ 2% d'ions superoxyde, d'eau oxygénée et éventuellement de radicaux (OH) [48].



## \* Production de l'anion radicalaire superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) par respiration\*

- ❖ **Les microsomes :** La production des radicaux libres ensuivre parallèlement une activation de l'oxygène par le cytochrome P-450 pour assurer les biotransformations.
- ❖ **Le cytosol:** C'est localisation des différentes réactions enzymatiques responsables à la production du ( $O_2^{\cdot-}$ ). La réduction de l'oxygène par un électron pour devenir un anion superoxyde nécessite d'un cofacteur c'est le NADPH et des différentes enzymes. Parmi ces enzymes qui ont permettant cette réaction les plus important sont: La xanthine oxydase (responsable de la transformation de l'hypoxanthine en xanthine), la NADPH oxydase (présente dans les neutrophiles où elle intervient dans leur propriété bactéricide) et aussi les enzymes du réticulum endoplasmique lisse (cytrocrome P450) et celles de la chaîne respiratoire mitochondriale [49].

### 2.1.2. La production exogène

Les agents exogènes générateurs des ROS continue d'attaquer toujours l'organisme humain est obéissante à leur agression [50].

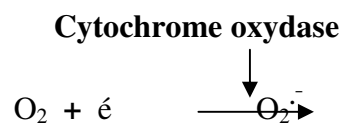
- ❖ **Les rayonnements UV:** les radiations UV provoquent particulièrement des démâtés au niveau de l'ADN [51]. les radiations ionisantes induisent la synthèse de radicaux libres dérivés de l'oxygène tels que : ( $O_2^{\cdot-}$ ), ( $OH^{\cdot}$ ), ( $O_2$ ) et les molécules génératrices des radicaux libres par l'intermédiaire d'agents photosensibilisants.
- ❖ **Le monoxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>):** Sont formés par les Nitric Oxyde Synthases (NOS). Ils sont des toxiques présents dans notre environnement comme par exemple: suie, goudron, tabac, polluants industriels. En plus, sont également responsables de la synthèse des radicaux libres.
- ❖ **L'alimentation:** comme l'alcool, café, les aliments riches en protéines et en lipides pouvant être à l'origine de la production des radicaux libres, donc ils ont une faible consommation des antioxydants [52, 53].
- ❖ **Certains médicaments:** les médicaments qui sont utilisés comme un traitement contre le cancer (anticancéreux comme les anthracyclines) peuvent provoquer aussi la production des radicaux libres [53].

### 3. Les principales espèces réactives de l'oxygène

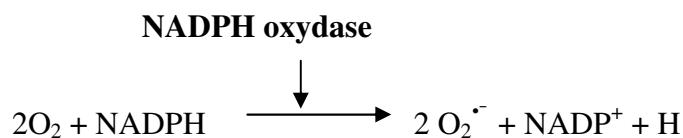
Il ne faut pas penser que tous les radicaux de l'oxygène sont extrêmement réactifs, cette réactivité étant très variable selon la nature du radical, l'appellation (ROS) n'est pas restrictive [54]. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène, ainsi parmi les radicaux formés chez les êtres vivants l'anion radicalaire superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hydroxyle (OH.), monoxyde d'azote ( $NO^{\bullet}$ ), et aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le peroxyde nitrite ( $ONOO^-$ ).

#### 3.1. Le radical superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ )

L'oxygène moléculaire possède deux électrons non appariés; les spins de ses deux électrons sont parallèles lui attribuant une stabilité relativement grande. Dans l'organisme, une partie de l'oxygène moléculaire peut capter d'une manière univalente un électron conduisant à la formation du radical superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) [55]. Le cytochrome oxydase qui se trouve dans la mitochondrie peut également catalyser une telle réaction selon l'équation suivante :



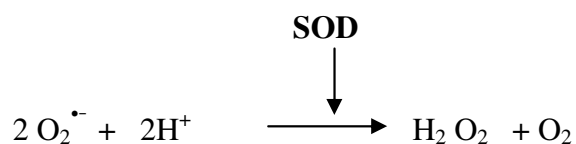
L'anion supéroxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) peut se former aussi lors de la phagocytose grâce à la NADPH oxydase qui se trouve à la surface des membranes plasmiques des phagocytes.



La chaîne de transport d'électrons mitochondrial c'est la source principale de radical superoxyde au niveau du complexe I (NADH /ubiquinone oxydoréductase). Les mitochondries utilisent Environ de 0 à 5 % de l'oxygène moléculaire est partiellement réduit par des électrons qui s'échappent des transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire [56].ils ya d'autre chaînes de transport d'électrons (microsomes) contribuent pareillement à la production du ( $O_2^{\bullet-}$ ) dans les cellules en aérobiose.

### 3.2. Le peroxyde d'hydrogène

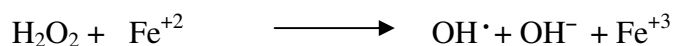
Le peroxyde d'hydrogène se forme par la dismutation du radical superoxyde, catalysée par le superoxyde dismutase (SOD) selon la réaction suivante [57] :



Il existe d'autres enzymes responsables à la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comme par exemple les oxydases qui se présentent spécifiquement dans les peroxysomes [58]. Mais certaines de ces enzymes peuvent catalyser franchement la réduction de l'oxygène moléculaire produisant ainsi le peroxyde d'hydrogène sans formation du radical superoxyde comme par exemple la glycoxylate oxydase [59].

### 3.3. Le radical hydroxyle

Est le radical le plus dangereux dans l'organisme. Il est très réactif vis-à-vis des structures organiques et joue un rôle initiateur dans l'auto-oxydation lipidique. Il est formé par la dégradation du (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en présence de métaux de transition sous leur forme réduite. Ainsi, (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) associé au fer ferreux conduit à la réaction de Fenton suivante :



Le (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) peut également réagir avec O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, aboutissant là encore à la production du (OH<sup>•</sup>). Ce mécanisme réactionnel se nomme la réaction d'Haber-Weiss [60].



Ils ya d'autres voies pour la formation du OH<sup>•</sup> sont : la décomposition de l'acide peroxonitrique et la réaction de l'acide hypochloreux avec (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) [61]. En dehors des réactions biochimiques aboutissant au OH<sup>•</sup>, celui-ci peut être aussi obtenu directement à partir d'eau ou du milieu aqueux soumis aux rayonnements ionisants.

### **3.4. L'oxygène singlet**

La forme excitée ( $O_2$ ) est souvent assimilée à un radical libre en raison de sa forte réactivité.

L'oxygène moléculaire peut être produit par plusieurs réactions biochimiques d'oxydation incluant la peroxydase et la lipooxygénase, par la réaction entre divers EOR ou en présence de la lumière, d'oxygène et de photosensibilisateur [60].

## **4. les conséquences du stress oxydant**

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides. L'organisme peut aussi réagir contre ces composés anormaux par production d'anticorps, qui malheureusement peuvent aussi être des auto-anticorps créant une troisième vague d'attaque chimique

### **4.1. Les dommages oxydatifs à l'ADN**

La plus part des dommages médiés par le stress au niveau de l'ADN concernant les espèces réactives de l'oxygène, sont la plus importante source endogène. Elles peuvent lui induire de nombreuses modifications covalentes telles que des lésions aux bases nucléotidiques (purines et pyrimidines), des cassures de brins, des pontages (*cross-links*) inter et intra brin [62].

### **4.2. Les dommages oxydatifs aux lipides**

Les cibles des ROS sont principalement les acides gras polyinsaturés, en raison de la présence des doubles liaisons, comme par exemple l'acide linoléique. L'origine des réactions radicalaires sont assurées par peroxydation lipidique qui se traduit par le rancissement *in vitro*. Il se trouve trois différentes étapes pour le mécanisme de la réaction radicalaire sera complet se sont: l'initiation, la propagation et finalement la terminaison [63].

### **4.3. Les dommages oxydants oxydatifs aux protéines**

Au cours du stress oxydant, les protéines subissent des modifications soit en présence de métaux de transition, soit se l'action des radicaux libres [64]. La formation de groupement carbonyles résulte lorsque les radicaux libres réagissent avec le groupement radical des acides aminés. Le dosage



plasmatique des protéines carbonylées est actuellement le marqueur d'oxydation avancée des protéines le plus utilisé, aussi bien *in vivo* que *in vitro*, pour mesurer les dommages oxydatifs effectués aux protéines [65, 66].

#### 4.4. Les dommages oxydants oxydatifs aux sucres

L'oxydation du glucose peut libérer des céto-aldéhydes, du peroxyde d'hydrogène et des anions superoxydes en présence des métaux, et entraîner également la coupure de protéine et leurs glycation par attachement du céto- aldehyde [67]. Il formant aussi un dérivé de produit de glycation avancé.

### 5. Les systèmes de défenses antioxydants

L'organisme est déterminé d'un ensemble de systèmes de défenses antioxydants très efficaces afin de diminuer la concentration des espèces oxydants dans l'organisme. Les antioxydants sont des systèmes enzymatiques ou non-enzymatiques (figure N°4) [68, 69, 70, 71]

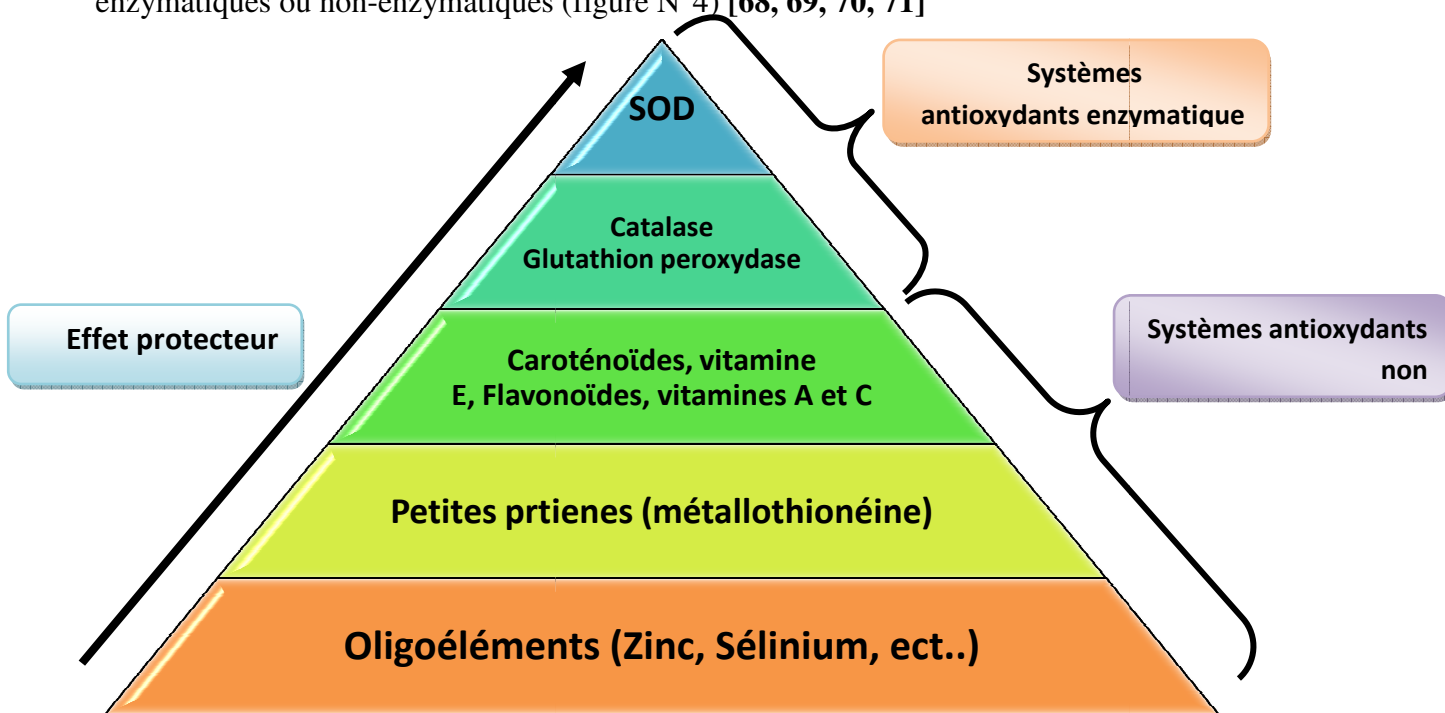


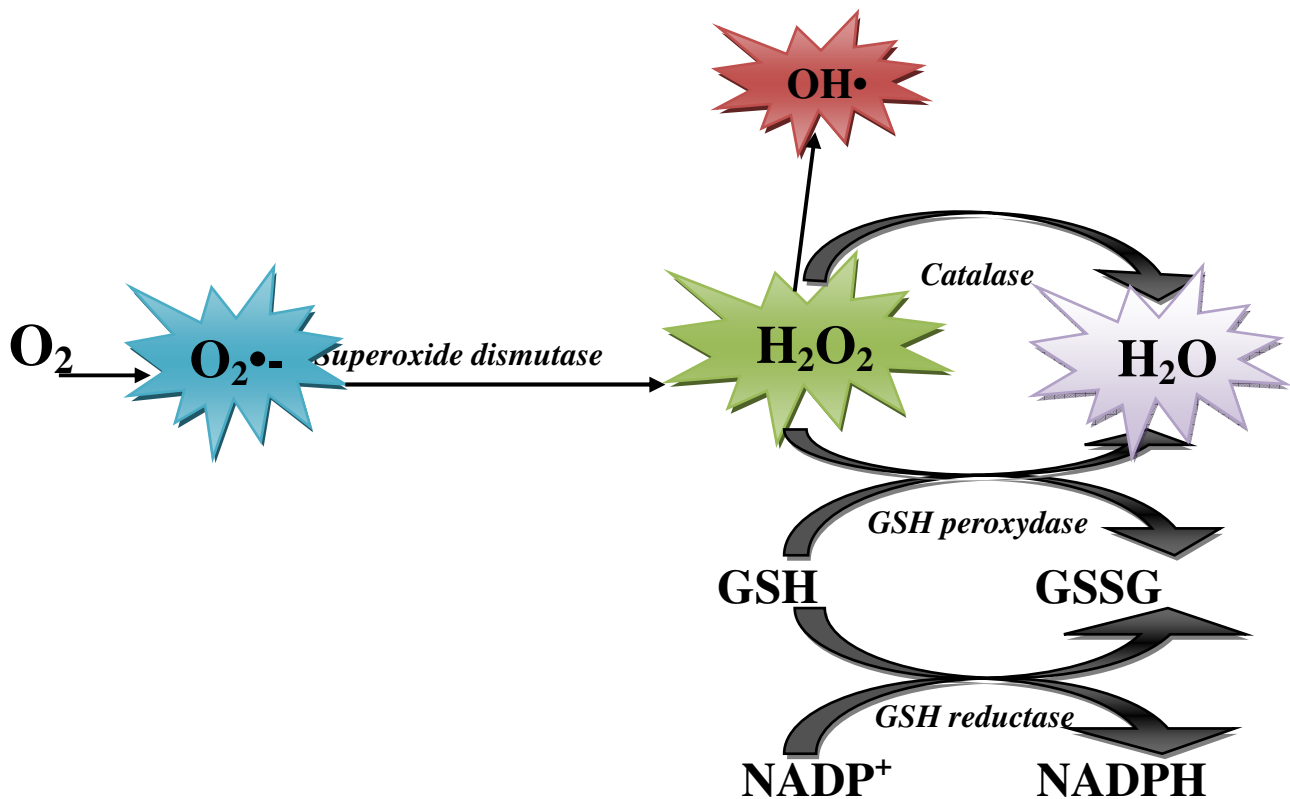
Figure N°4 : Pyramide des systèmes de défenses antioxydants

#### 5.1. Systèmes antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques (le superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion réductase) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les différents espèces oxydants. Leur rôle principal est de diminuer la quantité des ROS dans la cellule. Parfois, ces enzymes nécessitent des cofacteurs comme les oligoéléments (Zn, Cu, Mn, Se, Fe) pour exercer leur activité enzymatique.

### 5.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)

Les SOD sont le premier enzyme à intervenir dans la cascade des ROS. Ce sont des métalloprotéines qui catalysent la dismutation des ions superoxydes ( $O_2^{\bullet-}$ ) en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et oxygène ( $O_2$ ). Ils existent trois isoformes chez les mammifères [72]. Les SOD se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique : SOD à Manganèse (Mn-SOD) dans les mitochondries, à ions cuivre ou à zinc (Cu/Zn-SOD) dans le cytoplasme et les mitochondries, et des formes extracellulaire (EC-SOD) dans les vaisseaux sanguins. Il a été nouvellement montré que la (Cu/Zn-SOD) était également présente dans l'espace inter membranaire (figure N°5) [73, 74, 75, 76].

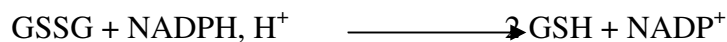


**Figure N°5:** Schéma des défenses antioxydantes enzymatiques.

### 5.1.2. Glutathion peroxydase (GPx) et réductase (GR)

La (GPx) est présente dans les liquides extracellulaires (sang), dans les cellules au niveau du cytoplasme et dans les membranes. Leur rôle principal est d'assurer la réduction du ( $H_2O_2$ ) en  $H_2O$  et  $O_2$ .

Lors de sa réaction deux molécules de glutathion (GSH) réduites sont oxydées en glutathion-Disulfure (GSSG) [69, 71]. Dans chacune de ces réactions, une molécule de glutathion oxydée est obtenue, pour perdurer cette réaction, il doit y avoir un taux constant de GSH, ce qui est rendu possible par la glutathion réductase (GR), qui catalyse la réduction du (GSSG) en (GSH), à l'aide d'un cofacteur qui est le NADPH sous forme réduite ( $NADPH, H^+$ ), l'équation suivante explique sa :



### 5.1.3. Catalase (CAT)

Le peroxyde d'hydrogène généré notamment lors de la dismutation de l'anion superoxyde est dégradé par la CAT qui est donc le responsable à leur détoxification. Cette enzyme est abondante dans le foie et les globules rouges, elle se retrouve préférentiellement dans les peroxysomes et en plus faible quantité dans le cytosol. La CAT est formée de quatre chaînes polypeptidiques, chacune porte un groupe hème (Fe), qui constituent les sites actifs de la catalase qui a une très grande affinité pour l' $H_2O_2$  par rapport aux globules rouges qui ont une faible affinité pour l' $H_2O_2$ , seulement lorsque les teneurs en peroxyde d'hydrogène sont accrues [69, 71]. Pour catalyser la réaction, l'atome de fer du groupement hème réalise une coupure hétérolytique de la liaison (O-O) du peroxyde d'hydrogène, ce qui crée une molécule d'eau et un groupement intermédiaire très oxydant qui peut oxyder une autre molécule de ( $H_2O_2$ ).

## 5.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques

Ce sont des nutriments naturellement amenés par des composés endogènes ou par l'alimentation, ils ont la capacité de piéger les espèces oxydantes en captant leur électron libre et en formant ainsi des espèces plus stables qui pourront être éliminées par d'autres systèmes antioxydants. Dans cette catégorie d'antioxydant les principales molécules sont les oligoéléments, le glutathion réduit (GSH), l'ubiquinone, le cytochrome c et les vitamines E et C.

### 5.2.1. Glutathion (GSH)

Le glutathion est un tripeptide, formé par la condensation du glutamate, de cystéine et glycine est donné une formule semi-développé :  $\gamma$ -L-Glutamyl cystéinyl glycine et le plus abondant est le thiol intracellulaire. Il permet la conversion des ponts disulfures (R-S-S-R) des protéines oxydées en deux fonctions thiols (R-SH) [77]. Les formes GSH (réduite) et GSSG (oxydée) forment un couple d'oxydoréduction très important dans la cellule car il permet les échanges des électrons à l'intérieur de la cellule [79]. Des études ont montré son importance dans plusieurs pathogènes comme le cancer ou une protéine exercerait son effet anti-carcinogène en augmentant les concentrations de GSH [79].

### 5.2.2. Ubiquinones et cytochrome c

L'ubiquinone y a une forme semi-radicalaire, il joue un rôle principal dans la production de ROS. Contrairement, Il peut être également impliqué dans la régénération de la vitamine E ce qui amplifie son rôle protecteur contre les ROS [70, 71].

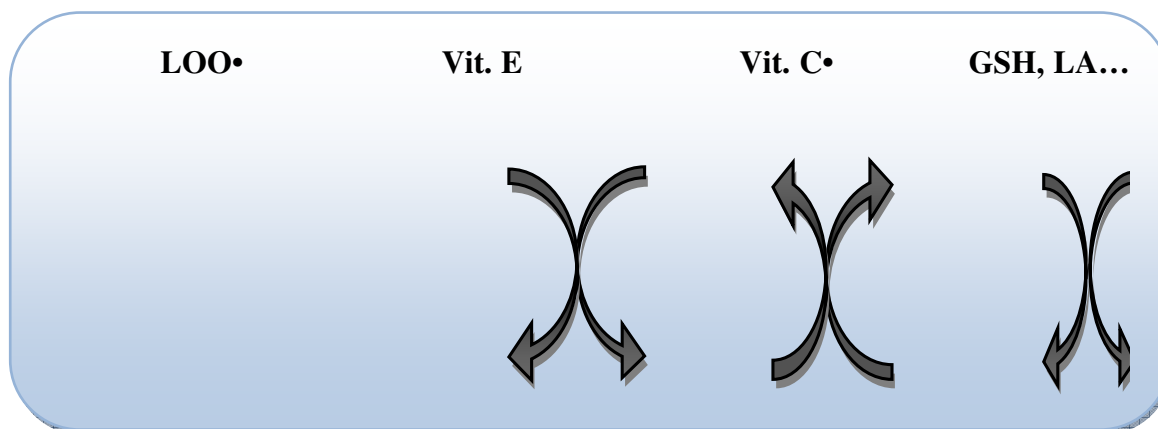
Le cytochrome c se trouve dans l'espace intermembranaire, il participe à la détoxification par saisir l'électron libre de  $O_2^{\bullet-}$  qui se produit au niveau de la chaîne respiratoire. Aussi bien que, il donne cet électron au complexe IV pour former le cytochrome c oxydé et l' $H_2O$  [80].

### 5.2.3. Vitamine E et vitamine C

Ce sont les plus importants dans la défense contre le stress oxydant. La vitamine E est un antioxydant membranaire liposoluble. La forme  $\alpha$ -tocophérol est la plus active parmi les autres formes de cette vitamine [81]. Elle se fixe les radicaux libres organiques qui peuvent provenir de l'oxydation des lipides et participe à diminuer la propagation des réactions de peroxydation lipidique [70, 82]. La vitamine E peut mettre fin à une réaction radicalaire en chargeant du radical.

La vitamine C est un antioxydant hydrosoluble, qui se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire. Elle peut piéger directement l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ), l'oxygène singulier et réduit peroxyde d'hydrogène en eau via l'ascorbate peroxydase [83]. En plus, Elle

permet la régénération de la forme non radicalaire de la vitamine E. La vitamine C réduire le radical  $\alpha$ -tocophérol qui permet une bonne efficacité de la vitamine E (figure N°6) [70, 83].



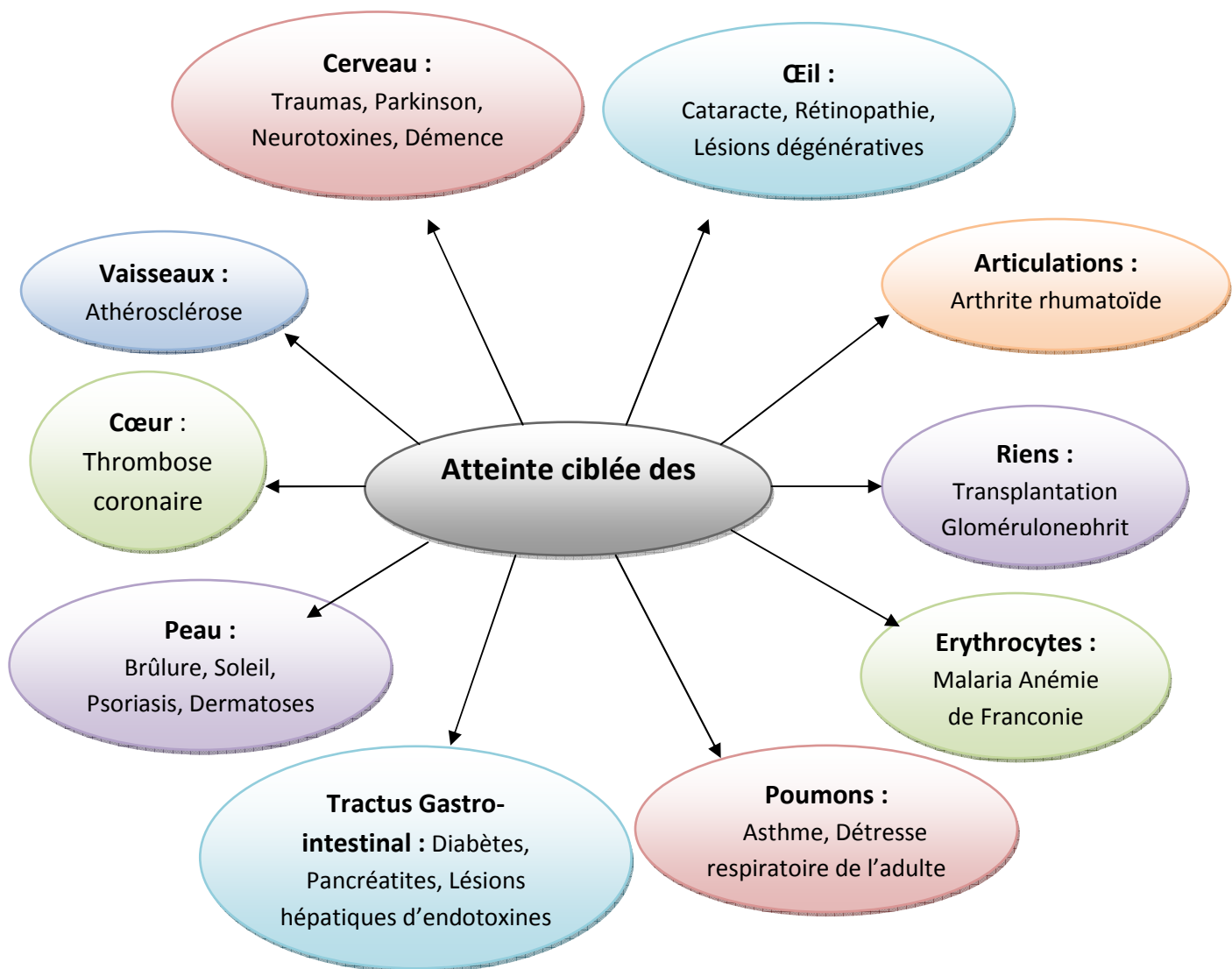
**Figure N°6** : Schéma des réactions d'élimination des radicaux lipidiques par les vitamines E et C.

(LOO•) : radical peroxyde lipidique, (LOOH) : hydroperoxyde lipidique, (Vit. E) vitamine E, (Vit. C) : vitamine C, (GSH) : glutathion réduit, (GSSG) : glutathion oxydé, (LA) : acide lipoïque, (DHLA) : acide dehydrolipoïque.

## 6. Le stress oxydant et les pathologies

Le stress oxydant est résultant lorsque se trouve un excès de radicaux libres qui peut s'accumuler, en raison de différentes situations environnementales et pathologiques ainsi que certaines habitudes de vie [84]. Mais généralement la conséquence majeure des radicaux libres est le dommage qu'il cause aux bases des acides nucléiques, aux lipides et aux protéines, lequel peut fortement compromettre la santé et la viabilité d'une cellule ou induire une variété de réponses cellulaires par la génération d'espèces réactives secondaires et ultimement, mener à la mort cellulaire par nécrose ou par apoptose [65].

Une production importante de ROS joue un rôle dans la pathogénèse de nombreuses maladies comme par exemple d'Alzheimer, l'épilepsie, l'ischémie cérébrale, la commotion cérébrale, la maladie de Parkinson, la sclérose amyotrophique latérale et dans le processus de vieillissement du cerveau en soi (figure N°7) [84, 85].



**Figure N°7:** Les effets du stress oxydant.

# Chapitre 3: Matériels et méthodes

# 1. Matériels

## 1.1. Réactifs chimiques

Les solvants utilisés (chloroforme, méthanol, et DMSO) au cours de différentes étapes d'extraction ont été fournis par le laboratoire pédagogique faculté de l'université de Constantine 1.

La Ferrozine (3-(2-pyridyl)-5,6-bis (4-phenyl-sulfonicacid)-1,2,4-triazine), FeCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>, DPPH (1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl), TCA, potassium ferricyanide [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] provient du laboratoire pédagogique faculté appliquée, Université Ferhat Abbas de Setif.

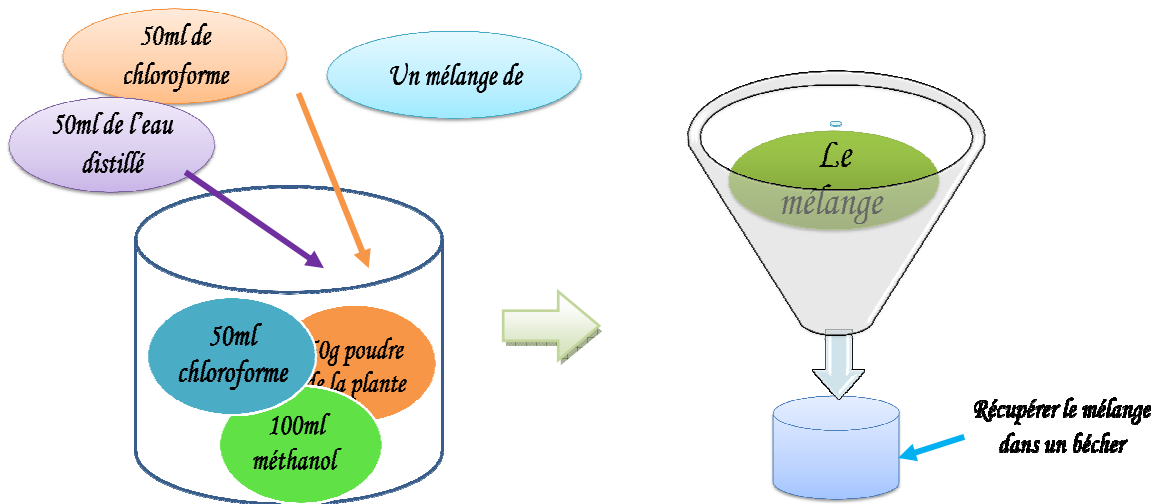
# 2. Méthodes

## 2.1. Préparation de l'extrait brut

La préparation des extraits à partir des graines *Nigella sativa L* a été effectuée selon la méthode de Blich-Dyer modifiée qui est très recommandée pour l'extraction de l'huile totale [3]. Dans une première étape, 50g des graines de *Nigella sativa L* préalablement nettoyées et broyées sont homogénéisées avec un mélange de 50 ml de chloroforme et 100 ml de méthanol sous agitation douce pendant 2 minutes à température ambiante, puis un volume (50ml) de chloroforme est ajouté au mélange avec une agitation douce pendant 30 secondes, finalement un volume (50ml) de l'eau distillée est ajouté au mélange avec une agitation douce pendant 30 secondes. Le mélange est récupéré après une filtration sur un papier filtre suivi par une décantation dans une ampoule à décanté, cette étape finale permet d'obtenir deux phases (phase chloroformique c'est l'huile totale et au dessous et une phase méthanolique au dessus).

Le méthanol et le chloroforme sont éliminés du filtrat par évaporation sous pression dans un rota vapeur, permettant ainsi d'obtenir un extrait méthanolique caractérisé par une couleur brune foncée et un autre extrait chloroformique avec une couleur vert foncée (figure N°8).





**\*Préparation de l'extrait totale.**



**\*Récupération des deux phases.**

**\*Elimination du filtrat.**

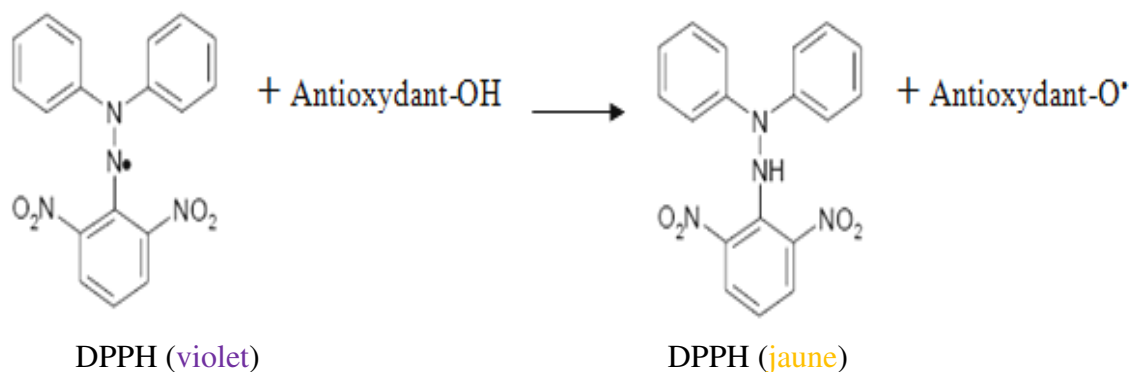
**Figure N°8:** La méthode d'extraction de l'huile essentielle des grains de *Nigella sativa L.*

## 2.2. Tests, *in vitro*, de l'activité antioxydante

### 2.2.1. Effet scavenger du radical DPPH

L'activité antioxydant des extraits de la plante *Nigella Sativa L* est évaluée par le test de DPPH, c'est un test qui utilise le radical DPPH (diphényl picryl-hydrayl) comme un radical libre relativement stable. Le principe de ce test est basé sur la réduction de ce radical qui se caractérise par une couleur mauve et en présence des extraits qui ont la capacité de réduire ce radical, la couleur va changer vers une

couleur jaune, l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des extraits présents dans le milieu (figure N°9) [86].



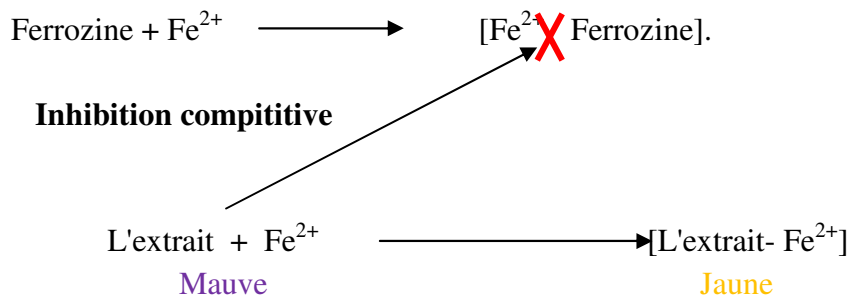
**Figure N°9** : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH

Pour étudier cette activité on a suivi le protocole de Mansouri et ses collaborateurs [3], qui consiste à l'adhésion de 2,4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol, 50 µL des solutions d'extraits ou standard (quercétine) sont ajoutés à 950 µL DPPH, puis on va mettre ce mélange à l'obscurité pendant 30 min, Les concentrations des extraits dans le milieu réactionnel sont comprises entre 0.312-20 mg/ml, le contrôle négatif contient uniquement la solution de DPPH, l'absorbance est mesurée à 517 nm. L'activité anti-radicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

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

### 2.2.2. Chélation du fer ferreux

Le principe de ce test est basé sur la chélation des ions ferreux par la ferrozine selon la méthode de Le et al (2007) [87], cette méthode se manifeste par la formation d'un complexe de ferrozine et Fe<sup>2+</sup> qui se caractérise par une couleur mauve mesurable à 562nm. En présence d'agents chélateurs, la formation de ce complexe est diminuée aboutissant à une diminution de la couleur mauve. On explique cette méthode par la réaction suivante:



Ce test est réalisé selon la méthode de Le et al (2007) [87]. Le milieu réactionnel contient (250 µl) de la solution d'extrait avec des concentrations entre 0,312-20 mg/ml mélangées avec 50 µl FeCl<sub>2</sub> (0.6 mM dans l'eau distillée) et 450 µl de méthanol. Après 5 min, 50 µl de Ferrozine (5 mM) sont ajoutées au mélange sous agitation, puis laissé pour réagir pendant 10 min à température ambiante. L'EDTA est utilisé comme un standard avec des intervalles de concentration respectives de (0-24 µg /ml). Le contrôle négatif contient tous les réactifs à l'exception de l'extrait à tester qui est remplacé par un volume de méthanol et l'absorbance va mesurer à 562 nm.

Les résultats de ce test sont exprimés en pourcentage de chélation selon l'équation suivante :

$$\% \text{Chélation} = [(\text{Abs}_{562} \text{ contrôle} - \text{Abs}_{562} \text{ échantillon}) / \text{Abs}_{562} \text{ contrôle}] \times 100$$

### 2.2.3. Test du pouvoir réducteur

Ce test est basé principalement sur la capacité de l'extrait à donner un électron tout en convertissant le fer de la forme Fe<sup>3+</sup> à la forme Fe<sup>2+</sup>, cette réaction se manifeste par l'apparition de la couleur bleu mesurable à 700 nm. Donc une absorbance élevée indique que l'extrait possède un grand pouvoir réducteur [88]. Ce test a été effectué selon la méthode de Prasad et al [89]; dans une première étape, 1,25 ml d'une solution de phosphate buffer (0,2M- pH= 6,6) et 1,25 ml de 1% de potassium ferricyanide sont ajoutés à 50µl des différentes concentrations des extraits. Après incubation de 20 minutes dans un bain marie à 50C°; on a ajouté 1,25 ml d'une solution aqueuse de TCA à 10% au milieu réactionnel. Après une agitation pendant 10 min, on a ajouté 1,25 ml de l'eau et 250µl de 0,1% FeCl<sub>3</sub> à 1,25 ml du surnageant. Le blanc contient tous les réactifs sauf l'extrait à tester. Les résultats sont exprimés en concentration effective à 50% (CE<sub>50</sub>) qui se traduit par la concentration d'antioxydant utilisé pour obtenir une absorbance de 0,5. L'absorbance est déterminée à 700nm.

#### 2.2.4. Effet scavenger du radical hydroxyl

L'effet scavenger du radical hydroxyl est testé par la technique de Philips (2010) [90]. Le principe de cette technique consiste à produire le radical hydroxyl dans le milieu réactionnel à travers la réaction de Fenton, pour détecter ce radical le sodium salicylate est ajouté au milieu et la couleur apparaît c'est la couleur rose mais en présence des extraits cette couleur va changer vers la couleur jaune et pour suivre ce changement on va mesurer l'absorbance 562 nm, le mélange réactionnel contient 1ml de 1,5 mM de FeSO<sub>4</sub>, 0,7ml de 6 Mm de peroxyde d'hydrogene, 0,3ml de 20 Mm de sodium salicylate et 1ml des différentes concentrations des extraits à tester , après incubation une heure à 37C° la lecture est effectuée à une longueur d'onde de 562 nm. L'effet scavenger du radical hydroxyl est calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ D'activité antiradicalaire} = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100$$

A<sub>0</sub> absorbance du control

A<sub>1</sub> absorbance en présence de l'extrait

A<sub>2</sub> absorbance en absence de sodium salicylate

### 3. Analyse statistique

Les études statistiques sont effectuées par l'exel 2007, Les valeurs d'IC<sub>50</sub> (concentration inhibitrice à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentration)] et les valeurs de EC<sub>50</sub> est calculé à partir de la courbe [logY=f (logX) ] .

# Chapitre 4: Résultat et discussions

## 1. Tests, *In Vitro*, de L'activité antioxydante

### 1.1. Préparation des extraits à partir des graines de *Nigella Sativa L*

La préparation des extraits à partir des graines de *Nigella sativa L* a été réalisée selon la méthode de Bligh–Dyer modifiée (1992). Cette extraction permet d'obtenir un extrait méthanolique et un extrait chloroformique (huile totale). L'huile totale avec une couleur verte représente un rendement de 33,24% (P/P) du poids de la graine. En comparaison avec d'autre méthode d'extraction la méthode qui utilise l'hexane a un rendement de 31% et la méthode de soxhlet présente un rendement de 37% donc cette méthode d'extraction est recommandé pour l'extraction de l'huile total [3].

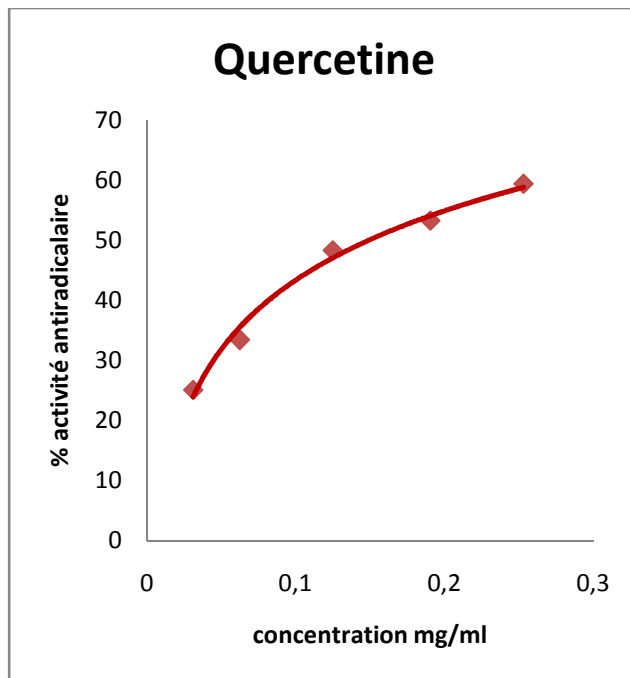
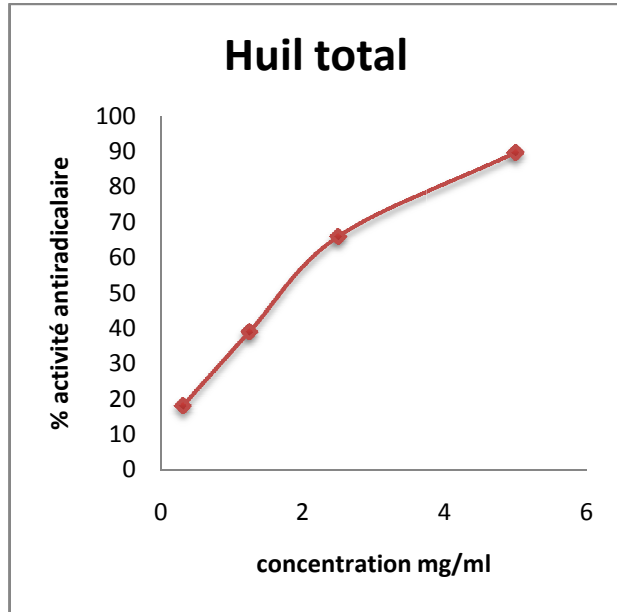
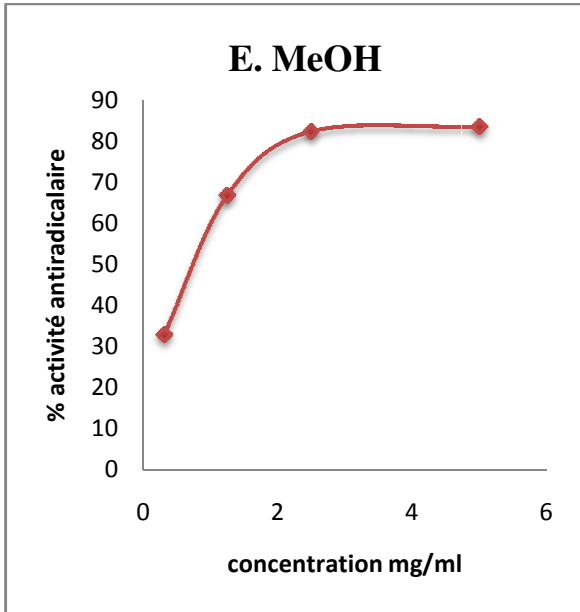
**Tableau N°2:** Aspects, couleurs et rendements des diverses extraits à partir des graines de *Nigella sativa L* en pourcentage par rapport au poids total des graines.

Extrait	Aspect	Couleur	<u>Rendement %</u> (par rapport à l'extrait brut)
Ech (huile totale)	huileux	verte	33,24 %
EMeOH	pâteux	Marron foncé	66,76 %

### 1.2.Effet scavenger du radical DPPH

Les résultats obtenus montrent que l'huile total et l'extrait méthanolique de *Nigella sativa L* possèdent une activité antioxydante dose dépendante. Pour évaluer le pouvoir de ces extraits de piéger le radical DPPH nous avons déterminé la concentration inhibitrice à 50% (IC<sub>50</sub>) (figure N°10) . En effet, l'huile total représente l'extrait le plus actif avec une IC<sub>50</sub> de l'ordre de 2,06 mg/ml par rapport a l'extrait méthanolique 4,3 mg/ml. A des fin comparatives un antioxydant standard est utilisé (la quercetine), il est montré une activité antioxydante importante avec une IC<sub>50</sub> de l'ordre de 0,172 mg/ml, en comparaison avec ce standard ces extraits sont mois actifs.

Ces résultats concordent positivement avec les résultats de Ramadan et ses collaborateurs qui ont montré une certaine activité antioxydante moins de l'huile de cette plante [15]



**Figure N°10:** Activité anti radicalaire des extraits des graines de *Nigella sativa L* et de la quercetine.

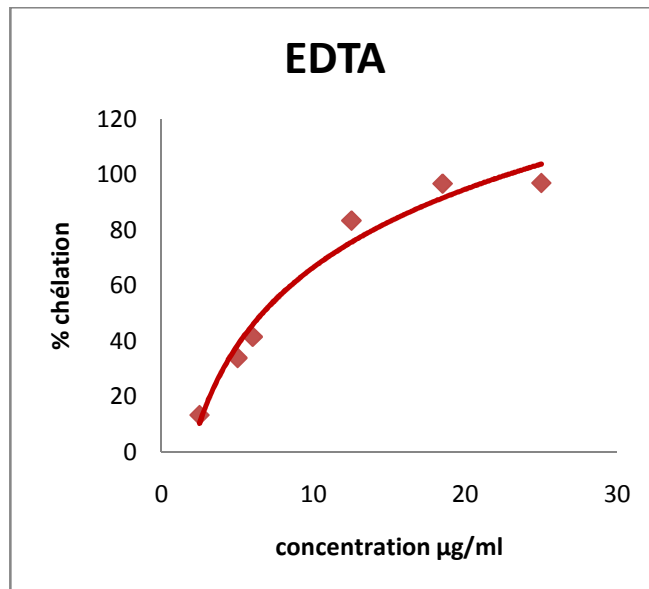
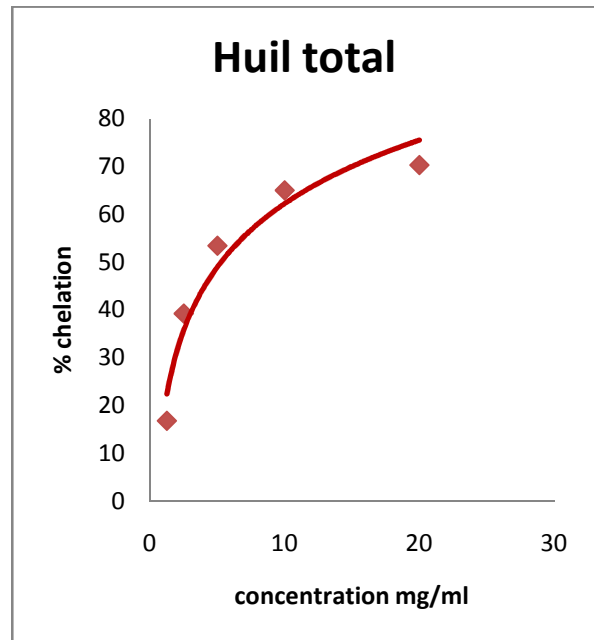
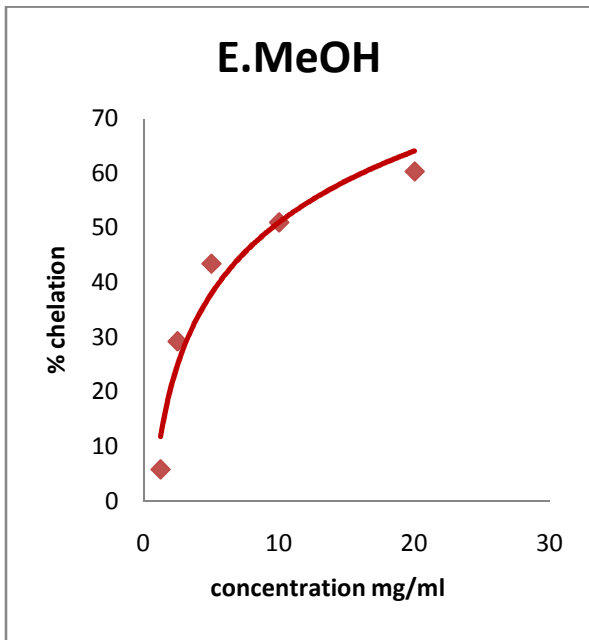
### I.3.Chélation du fer ferreux

Les résultats obtenus montrent que les différents extraits de *Nigella sativa L* ainsi que les standards interfèrent d'une manière dose dépendante avec la formation du complexe (Fe<sup>2+</sup> - Ferrozine), donc ces extraits possèdent une activité chélatrice de fer ferreux avant sa complexation avec la Ferrozine (figure N°11).

La valeur d'IC<sub>50</sub> obtenue avec l'EDTA est très faible ( $6,87 \pm 0,13 \mu\text{g/ml}$ ), reflétant son puissant effet chélateur, cette valeur est très proche à l'IC<sub>50</sub> de  $5,6 \mu\text{g/ml}$  rapportée par Le et ses collaborateurs (2007) [87]. Alors que, les valeurs d'IC<sub>50</sub> de l'huile total et l'extrait méthanolique montrent des valeurs allant de  $5,27 \text{ mg/ml}$  à  $7,73 \text{ mg/ml}$  respectivement.

Une étude comparative entre l'extrait méthanolique et l'extrait brut a été effectuée par Bourgou et son équipe [91]. Cette étude a été rapportée sur les tiges et les racines de cette plante, les résultats indiquent que l'activité chélatrice de l'extrait brut est plus active par rapport à l'extrait méthanolique, les valeurs d'IC<sub>50</sub> obtenues sont de  $7,5 \text{ mg/ml}$  et  $3,8 \text{ mg/ml}$  pour les racines et les tiges respectivement.





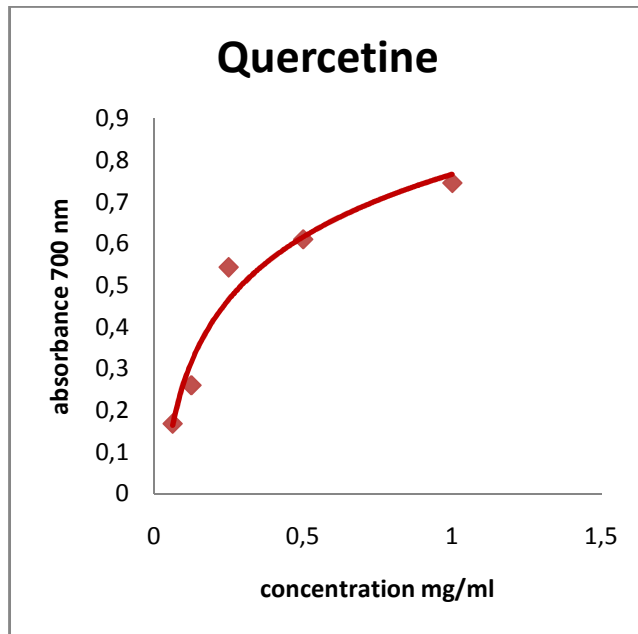
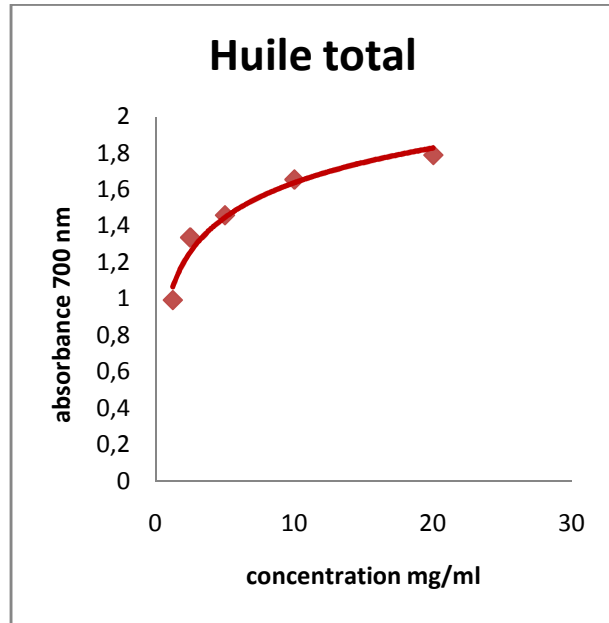
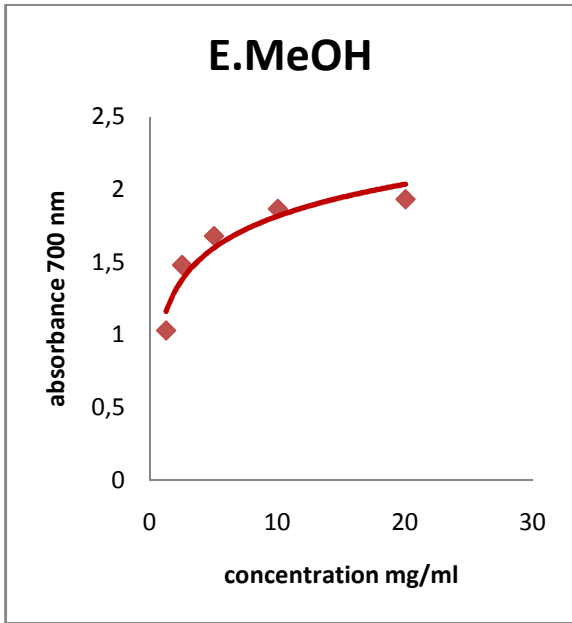
**Figure N°11:** Activité chélatrice des extraits des graines de *Nigella sativa L* et de l'EDTA.

#### I.4. Le pouvoir réducteur

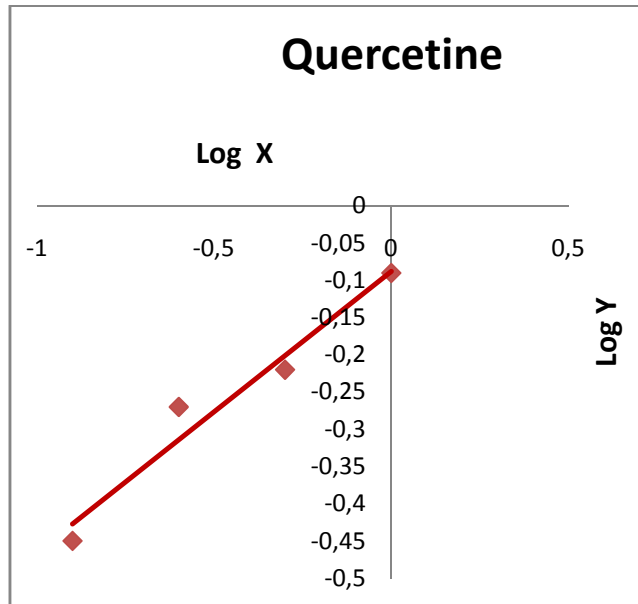
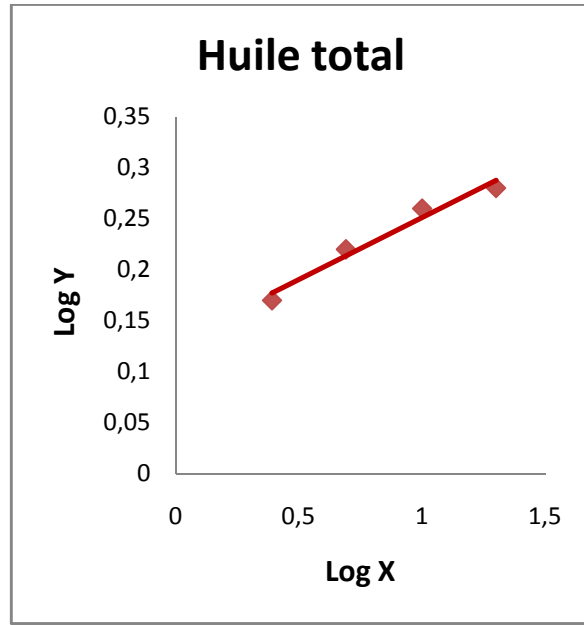
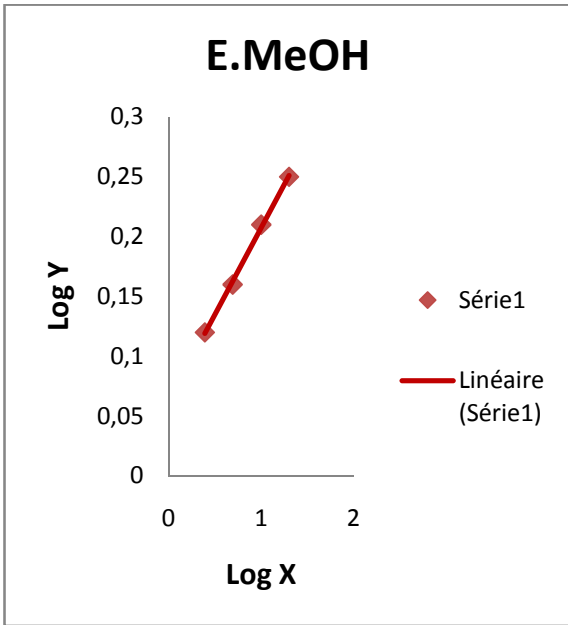
Pour évaluer le pouvoir réducteur de ces extraits, on a suivi la réduction de  $Fe^{3+}$  par un électron provient de ces extraits [91]. Le pouvoir antioxydant des extraits de la nigelle se manifeste par le changement de la couleur du milieu réactionnel de jaune au bleu, un changement qui est due à la réduction de ( $Fe^{3+}$ ) à la forme ( $Fe^{2+}$ ) qui est évaluée par une technique spectrophotométrique (figure N°12).

Le pouvoir réducteur de ces extraits est exprimé par la concentration effective à 50% ( $CE_{50}$ ), une concentration permet d'obtenir une absorbance de 0,5, cette absorbance est calculée par le modèle logarithmique selon cette formule  $\text{Log } Y=F(\text{Log}X)$  (figure N°13).

Les résultats obtenus et les analyses statistiques montrent que la quercétine exerce une activité réductrice importante et dose dépendante avec un  $CE_{50}$  de 0,27 mg/ml, pour les extraits cette activité est plus faible. Les  $CE_{50}$  sont de l'ordre de 3,09 et 2,88 mg/ml pour l'huile totale et l'extrait méthanolique respectivement. Aussi bien, une seule étude a été réalisée pour évaluer le pouvoir réducteur des huiles essentielles de la nigelle, cette étude a révélé que ces huiles possèdent un pouvoir réducteur considérable (figure N°13) [92].



**Figure N°12:** Pouvoir réducteur des extraits des graines de *Nigella sativa L.*



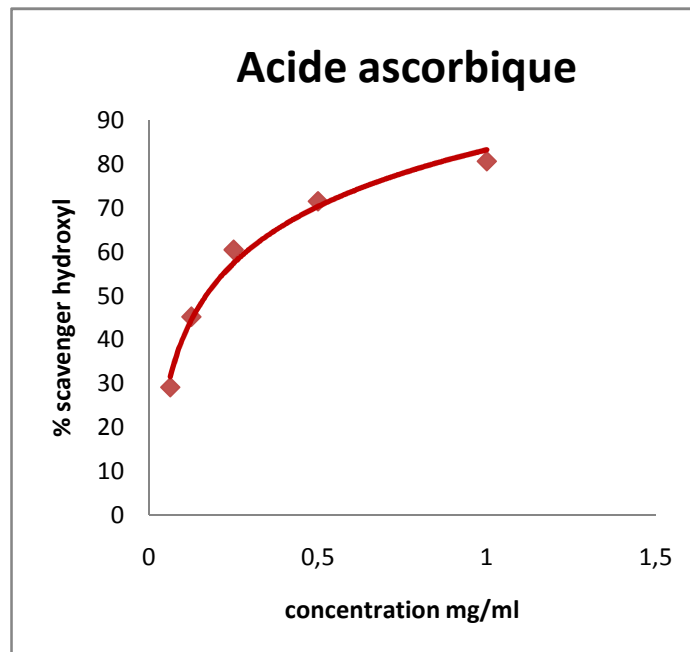
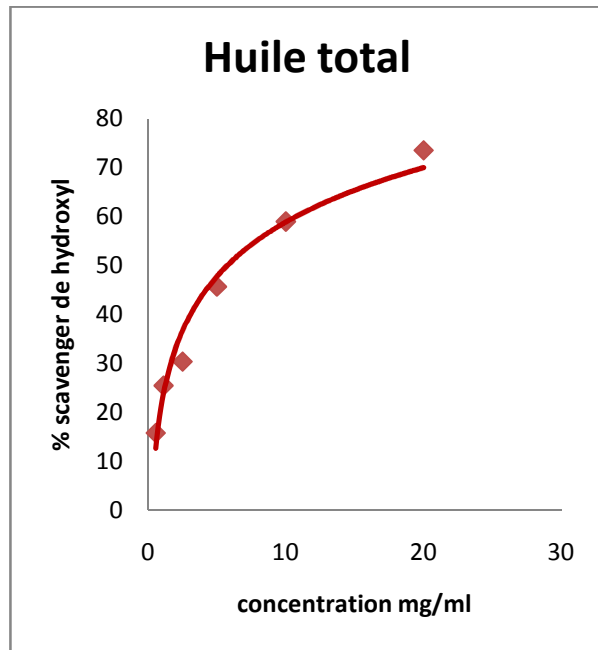
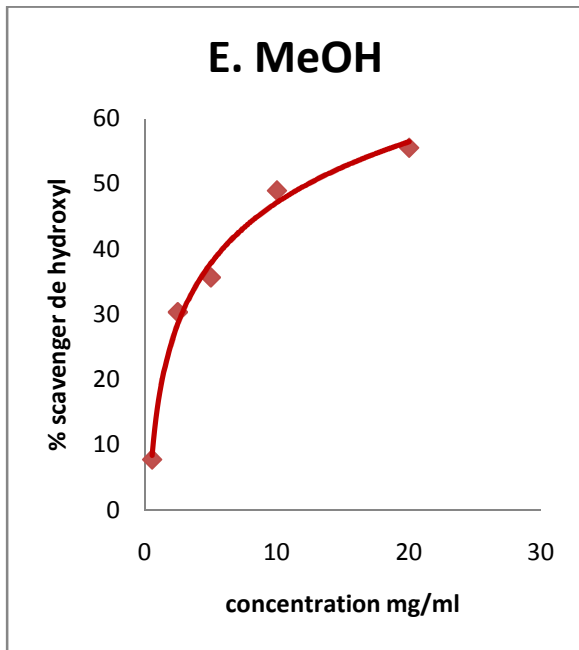
**Figure N°13:** La transformation par le modèle logarithmique.  
 X (la concentration  $\mu\text{g/ml}$ ) Y (L'absorbance à 700nm)

## **I.5. Effet scavenger du radical hydroxyl**

Le test de chélation de radical hydroxyl a été estimée selon la méthode de Philips et ses collaborateurs (2010) dont laquelle le sodium salicylate peut quantitativement piéger le radical hydroxyl qui est produit dans le milieu grâce à la réaction du Fenton et former un complexe rouge ayant un maximum d'absorption à 562nm. En présence d'agents chélateurs, la formation de ce complexe est perturbée aboutissant à une diminution de la couleur rose qui est suivie spectrophotométriquement [90].

Les résultats obtenus sont exprimés en terme d'IC<sub>50</sub>, les valeurs IC<sub>50</sub> obtenus montrent que tous les extraits piègent le radical hydroxyl d'une manière dose dépendante, dont l'huile total et l'extrait méthanolique ont des IC<sub>50</sub> de 5,65 mg/ml et 10,48 mg/ml respectivement. Une autre étude effectuée sur l'extrait éthanolique a été montré un effet scavenger qui se caractérise par une IC<sub>50</sub> de 2,5 mg /ml (figure N° 14) [94].

A fin de comparer ces résultats avec un standard, on a utilisé l'acide ascorbique qui présente un IC<sub>50</sub> de 1,20 mg/ml.



**Figure N°14:** Effet scavenger du radical hydroxyl des extraits des graines de *Nigella sativa L*

Conclusion

## Conclusion et perspectives

A fin de mettre en évidence l'effet antioxydant des extraits de la plante *nigella sativa L*, nous avons préparé l'huile totale et l'extrait méthanolique par la méthode de Bligh–Dyer modifiée (1992) à partir des graines de cette plante [3].

La teneur des extraits obtenue à partir des graines la nigelle est de L'huile totale (extrait chloroformique) avec un rendement de 33,24 % (P/P) du poids de la graine et l'extrait méthanolique) avec un rendement de 66.76 % (P/P) du poids de la graine.

La valorisation de la capacité antioxydant de ces extraits est effectuée par un test du DPPH permis d' établir que ces extraits possèdent un grand pouvoir de piéger ce radical avec des  $CI_{50}$  de l'ordre de 2,06 mg/ml de l'huile totale et 4,3 mg/ml de l'extrait méthanolique. Et le test de pouvoir réducteur de ces huiles a permis de révéler une capacité antioxydante appréciable avec des  $CE_{50}$  de l'ordre de 3,09 et 2,88 mg/ml pour l'huile totale et l'extrait méthanolique respectivement. Le test Chélation du fer ferreux a révélé que les deux extraits méthanolique et chloroformique à une activité antioxydante appréciable avec des  $CI_{50}$  de l'ordre de 5,27 mg/ml de l'huile total à 7,73 mg/ml de l'extrait méthanolique. Et enfin le test scavenger du radical hydroxyl **montré** que l'huile total et l'extrait méthanolique possèdent une activité antioxydante appréciable avec des  $CI_{50}$  de l'ordre de 5,65 mg/ml et 10,48 mg/ml respectivement.

Aussi bien, les huiles essentielles de la nigelle possèdent des propriétés antioxydantes remarquables et cette activité n'est pas attribuée seulement aux composés phénoliques, mais aussi à l'effet synergique des composés non phénoliques.

Enfin ces résultats restent préliminaires et nécessitent des études complémentaires profondes à différents niveaux de l'approche à travers une caractérisation fine et poussée de ces huiles essentielles par d'autres techniques telles que la CPG/SM ou l'HPLC/SM.



# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Duraffourd C., Lapraz J. C., Chemli R. La plante médicinale de la tradition à la science. 1er congrès Intercontinental. Tunis. Ed. Granche. Paris. 1997. 222 p.
- [2] Tariq M. *Nigella Sativa* seeds: Folklore treatment in modern day medicine. *The Saudi Journal of Gastroenterology*. 2008; **14(3)**:105-106.
- [3] Khoddami A., Hasanah M. G., Yassoralipour A., Ramakrishnan Y., Ganjloo A. Physicochemical Characteristics of *Nigella Seed (Nigella sativa L)*. Oil as Affected by Different Extraction Methods. *J Am Oil Chem Soc*. 2011; **88**: 533–540.
- [4] Antuono F., Hamaza K. Composition of *Nigella sativa* and *Nigella damascene* from Egypt. *Planta medica*. 2002; **27**: 142 -149.
- [5] Badary O. A., Taha R. A., Gamal El-Din A. M., Abdel-Wahab M. H. Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug and chemical toxicology*. 2003; **26**: 87-98.
- [6] Ghedira K. La nigelle cultivée : *Nigella sativa L* (Ranunculaceae). *Phytothérapie*. 2006; **4**: 1-7.
- [7] Guignard J. L. In: Botanique systématique moléculaire. 12ème Edition Masson. Paris. 2001.304.
- [8] Bonnier G. La grande flore en couleur. Thèse de magister d'université : Belin, Paris. Tome 1. 1990. 17 p.
- [9] Zahoor A., Ghafoor A., Aslam M. *Nigella sativa*: A potential commodity in crop diversification traditionally used in healthcare. In introduction of medicinal herbs and spices as crops. *Ministry of Food, Agricultur and Livestock, Pakistan*. 2004; 5-31.
- [10] Salem M. L. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa L*. Seed. *International Immunopharmacology*. 2005; **5**: 1749-1770.
- [11] Nergiz C., Ünal K. Effect of the method of extraction on the total polyphenol and 1, 2-diphenol content and stability of virgin olive oil. *J. Sci. Food Agric*. 1991; **56**: 79-84
- [12] Benkaci-Ali F., Baaliouamer A., Meklati B. Y. Kinetic Study of Microwave Extraction of Essential Oil of *Nigella sativa L*. *Seeds. Chromatographia*. 2006; **64**: 227-231.
- [13] Burits M., Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*. 2000; **14**: 323-328.
- [14] Benkaci–Ali F., Baaliouamer A., Meklati B. Y., Chemat F. Chemical composition of seed essential oils from Algerian *Nigella sativa* extracted by microwave and hydrodistillation. 2007.

- [15] Ramadan M. F., Mörsel J. T. Direct isocratic normal-phase HPLC assay for fat soluble vitamins and  $\beta$ -carotene in oil seeds. *European Food Research and Technology*. 2002; **214**: 521-527.
- [16] Merfort I., Wray V., Barakat H., Hussein S. A. M., Nawwar M. A. M., Willuhn G. Flavonol triglycosides from seeds of *Nigella sativa*. *Phytochemistry*. 1997; **46**: 359-363.
- [17] Atta M., Imaizumi K. Antioxidant Activity of *Nigella sativa* L. Seeds Extracts. *J Jap Oil Chem Soc*. 1998; **47** (5): 475-480.
- [18] Burits M., Bucar F. Antioxydant activity of *Nigella sativa* L. essential oil. *Phytother Res*. 2000; **14** (5): 323-328.
- [19] Ramadan M., Kroh L., Mörsel J. Radical scavenging activity of black cummin (*Nigella sativa* L), coriander (*Coriandrum sativum* L), and niger (*Guizotia abyssinica* Cass) crude seed oils and oil fractions. *J Agric Food Chem*. 2003; **51**: 6961-6969.
- [20] El-Dakhakhny M., Mady N., Halim M. *Nigella sativa* L. oil protects against induced hepatotoxicity and improves serum lipid profile in rats. *Arzneimittelforschung*. 2000; **50**: 832-836.
- [21] Nagi M., Alam K., Badary O., Al-Shabanah O., Al-Sawaf H., Albekairi A. Thymoquinone protects against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice via an antioxidant mechanism. *Int J Biochem Mol Biol*. 1999; **47**: 153-159.
- [22] Meral I., Kanter M. Effects of *Nigella sativa* L. and *Urtica dioica* L. on selected mineral status and hematological values in CCl<sub>4</sub>-treated rats. *Biol Trace Elem Res*. 2003; **96**: 263-270.
- [23] Meral I., Yener Z., Kahraman T., Mert N. Effect of *Nigella sativa* 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*. 2001; **48**: 593-599.
- [24] Turkdogan M., Agaoglu Z., Yener Z., Sekeroglu R., Akkan H., Avci M. The role of antioxidant vitamins (C and E), selenium and *Nigella sativa* in the prevention of liver fibrosis and cirrhosis in rabbits: newhopes. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*. 2001; **108**: 71-73.
- [25] Salem M. Immunomodulatory and therapeutic properties of *Nigella sativa* L. seed. *Int Immunopharm*. 2005; **5**: 1749-1770.
- [26] Burits M., Bucar F. Antioxydant activity of *Nigella sativa* L. Essential oil. *Phytother Res*. 2000; **14** (5): 323-328.

- [27] Enomoto S., Asano R., Iwahori Y., Narui T., Okada Y., Singab A., et al. Hematological studies on black cumin oil from the seeds of *Nigella sativa* L. *Biol Pharm Bull.* 2001; **24**: 307-310.
- [28] Nair M. K. M., Vasudevan P., Venkitanarayanan K. Antibacterial effect of black seed oil on *Listeria monocytogenes*. *Food Control.* 2005; **16**: 395-8.
- [29] Salem M. L. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *Int Immunopharmacol.* 2005; **5**: 1749-70.
- [30] Agrawal R., Kharya M. D., Shrivastava R. Antimicrobial and anthelmintic activities of the essential oil of *Nigella sativa* Linn. *Indian J Exp Biol.* 1979; **17**: 1264-5.
- [31] Aljabre S. H. M., Randhawa M. A., Akhtar N., et al. Antidermatophyte activity of ether extract of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. *J Ethnopharmacol.* 2005; **101**:116-9.
- [32] Mahmoud M. R., El-Abhar H. S., Saleh S. The effects of *Nigella sativa* oil against the liver damage induced by *Schistosoma mansoni* mice. *J Ethnopharmacol.* 2002; **79**: 1-11.
- [33] El-Dakhakhny M., Mady N. I., Lember N., et al. The hypoglycemic effect of *Nigella sativa* oil is mediated by extrapancreatic actions. *Planta Med.* 2002; **65**: 465-6.
- [34] Khanna T., Zaidi F. A., Dandiya P. C. CNS and analgesic studies on *Nigella sativa*. *Fitoterapia.* 1993; **5**: 407-10.
- [35] Abdel Fatah M., Matsumoto K., Watanabe H. Antinociceptive effects of *Nigella sativa* oil and its major components in mice. *Eur J Pharmacol.* 2000; **400**: 89-97.
- [36] El-Dakhakhny M., Mady N. I., Lember N., et al. *Nigella sativa* oil, nigellone and derived thymoquinone inhibit synthesis of 5-lipoxygenase products in polymorphonuclear leukocytes from rats. *J Ethnopharmacol.* 2002; **81(2)**: 161-4.
- [37] Hajhashemi V., Ghannadi A., Jafarabadi H. Black cumin seed essential oil, as a potent analgesic and anti-inflammatory drug. *Phytother Res.* 2004; **18(3)**: 19-59.
- [38] Houghton P. J., Zarka R., de las Heras B., et al. Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Med.* 1995; **61**: 33-6.
- [39] El-Dakhakhny M., Barakat M., Abd El-Halim., et al. Effect of *Nigella sativa* oil on gastric secretion and ethanol induced ulcer in rats. *J Ethnopharmacol.* 2000; **72**: 299-304.

- [40] Kanter M., Demir H., Karakaya C., Ozbek H. Gastroprotective activity of *Nigella sativa* L. oil and its constituent, thymoquinone against acute alcohol-induced gastric mucosal injury in rats. *World J Gastroenterol.* 2005; **11(42)**: 6662-6.
- [41] Rolfe D. F., Brown G. C. Cellular energy utilization and molecular origin of standar metabolic rate in mammals. *Physiol. Rev.* 1997; **77(3)** : 731-58.
- [42] Koppenol W. H. 100 years of peroxyxynitrite chemistry and 11 years of peroxyxynitrite biochemistry. *Redox Rep.* 2001 ; **6(6)** : 339-41.
- [43] Atamer A., Bilici A., Yenice N., Selek S., Ilhan N., Atamer Y. The importance of paraoxonase 1 activity, nitric oxide and lipid peroxidation in hepatosteatosi. *J Int Med Res.* 2008; **36**: 771-776.
- [44] Tremellen K. Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. *Hum Reprod Update.* 2008; **14**: 243-258.
- [45] Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human diseases: curiosity, cause, or consequence?. *Lancet.* 1994; **344**: 721-724.
- [46] Yoshikawa T., Yamamoto Y., Naito Y., Free radicals in chemistry, Biolog and Medicine, Ed. Oica International, Londres. 200p.
- [47] <https://www.la-famille-des-radicaux-libres.html>.
- [48] Sturtz L. A., Diekert K., Jensen L. T., Lill R., Culotta V. C. 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.* 2001; **276**: 38084-38089.
- [49] Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxydant stress. *Circ Res.* 2000; **87(10)**:840-4.
- [50] Favier A. Le stress oxydant. *L'actualité chimique.* 2003; **08**: 115.
- [51] Sutherland B. M, Harber LC, Kochevar IE. Pyrimidin dimer formation and repair in human skin. *Cancer Res.* 1980; **40**:3181-5.
- [52] Hu Y., Block G., Norkus E. P., Morrow J. D., Dietrich M., Hudes M. Relations of glycemc index and glycemc load with plasma oxidative stress markers. *Am J Clin Nutr.* 2006; **84**: 70-76., quiz 266-267.
- [53] Moller P., Wallin H., Knudsen L. E. Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chem Biollnteraet.* 1996; **102**: 17-36.
- [54] Gutteridge J. M. Free radicals in disease processes: a complication of cause and consequence. *Free Radic. Res. Commun.* 1993; **19**: 141-158.

- [55] Koechlin-Ramonatxo, C. (2006) Oxygen , oxidative stress and antioxidant supplementation ,or another way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition clinique et métabolique*. 20:165-177.
- [56] Bartosz, G. (2003) Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*. 9: 5-21.
- [57] Pal Yu, B. (1994) Cellular defences against damage from reactive oxygen species. *Physiopathological Reviews*. 74: 139-155.
- [58] 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.
- [59] Del Rio, L.A., Corpos, F.J., Sandalio, L.M., Corpos, F.J., Pastori, G.M., Bueno, P., Lopez-Huertas, E. (1996) Peroxisoms as a source of superoxide and hydrogen peroxide in stressed plants. *Biochemical Society Transactions*. 24: 434-438.
- [60] Sorg, O.(2004) Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus aaaBiologies*. 327: 649-662.
- [61] Bartosz, G. (2003) Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*. 9: 5-21.
- [62] Sorg, O.(2004) Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus aaaBiologies*. 327: 649-662.
- [63] Wang Y. Bulky DNA lesions induced by reactive oxygen species. *Chem Res Toxicol*. 2008; **21**: 276-281.
- [64] Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.*, 1990, 186:1-85.
- [65] Stadtman ER. Oxydation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu. Rev. Biochem.*, 1993, 62:797-821
- [66] Dalle-Donne I., Rossi R., Colombo R., Giustarini D., Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem*. 2006; **52**: 601-623.
- [67] Chevion M., Berenshtein E., Stadtman E. R. Human studies related to protein oxidation: prote in carbonyl content as a marker of damage. *Free Radie Res*. 2000; **33**: 99 -108.
- [68] Wolff SP. Is hyperglycemia risky enough to justify the increased risk of hypoglycemia linked with tight diabetes control? *Biochem. Med. Metab. Biol.*, 1991, 46(2):129-39.
- [69] Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002; **82**: 47-95.

- [70] Mates J. M., Perez-Gomez C., Nunez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 1999; **32**: 595-603.
- [71] Packer L., Tritschler H. J., Wessel K. Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med.* 1997; **22**: 359-378.
- [72] Powers S. K., Lennon S. L. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc.* 1999; **58**: 1025-1033.
- [73] Faridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.*, 1995, 64:97-112.
- [74] Okado-Matsumoto A., Fridovich I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem.* 2001; **276**: 38388-38393.
- [75] Sturtz L. A., Diekert K., Jensen L. T., Lill R., Culotta V. C. () 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.* 2001; **276**: 38084-38089.
- [76] Huang T. T., Carlson E. J., Kozy H. M., Mantha S., Goodman S. I., Ursell P. C., et al. Genetic modification of prenatal lethality and dilated cardiomyopathy in Mn superoxide dismutase mutant mice. *Free Radic Biol Med.* 2001; **31**: 1101-1110.
- [77] Sentman M.L., Granstrom M., Jakobson H., Reaume A., Basu S., Marklund S. L. Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 2006; **281**: 6904-6909.
- [78] Lardon R A ; The antioxydants of higher plants. *Phytochemistry*, 1988, 27 : 969-978
- [79] Ji L. L., Fu R., Mitchell E. W. Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *J Appl Physiol.* 1992; 73: 1854-1859.
- [80] Bounous G. Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. *Anticancer Res.*, 2000, 20(6C) : 4785-92.
- [81] Skulachev V. P. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett.* 1998; **423**: 275-280.
- [82] Kamal-Eldin A., Appelqvist LA. The chemistry and antioxydant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 1996, 31(7) : 671-701.

- [83] Evans W. J. Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am J Clin Nutr.* 2000; **72**: 647S-652S.
- [84] Noctor G, Foyer CH. Ascorbate and glutathion : keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, 1998, 49 : 249-279.
- [85] Willcox I. K., Ash S. L., Catignani G. L. Antioxidants and prevention of chronic disease. *CrU Rev Food Sei Nutr.* 2004; **44**: 275-295.
- [86] Sohal R.S., Mockett R.J., Orr W.C., Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis, *Free Rad. Biol. Med.* 2002. 33(5), 575p.
- [87] Sanchez-Moreno C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *International Journal of Food Science and Technology.* 2002; **8**: 121-137.
- [88] Le K., Chiu F. N. G. K. Identification and quantification of antioxidants in Fructus lycii . *Food vvv Chemistry.* 2007; **105**: 353-363.
- [89] Barros L., Ferreira M. J., Queiros B., Ferreira I. C. F. R., Baptista P. Total phenols, ascorbic acid, b-carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry.* 2007; **103**: 413–419.
- [90] Prasad K. N., Yang B., Dong X., Jiang G., Zhang H., Xie H., et al. Flavonoid contents and antioxidant activities from Cinnamomum species. *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* 2009; **10**: 627–632.
- [91] Philips A., Philips S., Arul V., Padmakeerthiga B., Renju V., Santha S., et al. Free radical scavenging activity of leaf extracts of Indigofera aspalathoides – An in vitro analysis. *J Pharm Sci Res.* 2010; **2**: 322-328.
- [92] Bourgou, S., Ksouri, R., Bellila, A., Skandrani, I., Falleh, H., Marzouk, B. Phenolic composition and biological activities of Tunisian Nigella sativa L. shoots and roots. *Comptes Rendus Biologies.* 2008; **331**: 48-55.
- [93] Gholivand B. M., Rahimi-Nasrabadi M., Batooli H., Ebrahimabadi A. H. Chemical composition and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of Psammogeton canescens. *Food and Chemical Toxicology.* 2010; **48**: 24–28.
- [94] Singh G., Marimuthu P., de Heluani C. S., Catalan C. Chemical constituents and antimicrobial and antioxidant potentials of essential oil and acetone extract of Nigella sativa seeds. *J Sci Food Agric.* 2005; **85**: 2297–2306.



[95] Rajamanikandan S., Sindhu T., Durgapriya D., Sophia D , Ragavendran P., Gopalakrishnan V. K. Radical Scavenging and Antioxidant Activity of Ethanolic Extract of *Mollugo nudicaulis* by *In vitro* Assays. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. 2011; **45**: 310 – 314.

Résumé

## Résumé

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

L'objectif de cette étude est l'évaluation des pouvoirs antioxydant des extraits obtenus des graines de la nigelle Algérienne. Le pouvoir antioxydant de ces extraits a été évalué *in vitro* par le teste de DPPH, les résultats obtenus montrent une  $IC_{50}$  de 2,06 mg/ml pour l'huile total et 4,3 mg/ml pour l'extrait méthanolique, par ailleurs ces extraits sont des piègeurs du radical hydroxyl avec des  $IC_{50}$  de 5,65 mg/ml et 10,48 mg/ml pour l'huile total et l'extrait méthanolique respectivement.

Cette capacité antioxydant est confirmée par les tests du pouvoir réducteur et le test du fer ferreux ; Le pouvoir réducteur résulte une  $CE_{50}$  de 3,09 mg/ml pour l'huile total et une  $CE_{50}$  de 2,88 mg/ml pour l'extrait méthanolique. Le teste du fer ferreux indique un pouvoir antioxydant qui se caractérise par un  $IC_{50}$  de 5,27 mg/ml pour l'huile total et 7,73 mg/ml pour l'extrait méthanolique.

**Mots clé :** Capacité antioxydant, Chélation de métaux, Espèces oxygénées réactives (ROS), *Nigella sativa L.* Piégeur.

## **Abstract**

Reactive oxygen species (ROS) are compounds with high potential to damage almost all types of cellular constituents, which explains their involvement in the induction and/or amplification of a number of human pathologies. The supplementation of the body by exogenous antioxidants seems to be very helpful to fight these harmful species.

The antioxidant capacity of these extracts was evaluated in vitro by DPPH• free radical scavenging assay, hydroxyl radical. The extracts demonstrated a great capacity to trap the DPPH• radical with an IC<sub>50</sub> equal to 2,06 mg/ml for total oil and 4,3 mg/ml methanolic extract, and for the second test the result indicate an IC<sub>50</sub> equal to 5,65 mg/ml for total oil and 10,48 mg/ml for methanolic extract.

This antioxidant capacity is confirmed by the the reducin and ferrous ion chelating capacity assay, the reducing power showed that the total oil and ethanolic extract hqve qn EC<sub>50</sub> equal to 3,09 and 2,88 mg/ml respectively, the last test showed results zith an IC<sub>50</sub> of 5, 27 mg/ml for total oil and 7,73 mg/ml for methanolic extract.

**Key words:** Antioxidant capacity. Metal chelating, Reactive Oxygen Species (ROS), *Nigella sativa* L.Scavenger.

## ملخص

تمتلك الأنواع الاكسجينية النشطة قدرة عالية على إلحاق أضرار تفسد تقريبا كافة المكونات الخلوية مما يفسر دورها في إحداث أو تضخيم الكثير من الأمراض . ولهذا فان تزويد الجسم بمواد خارجية مضادة للأكسدة يبدو مهما جدا للدفاع ضد هذه الأنواع الاكسجينية المضرة.

في هذا السياق حاولنا تقدير النشاطية المضادة للأكسدة لمختلف مستخلصات بذور الحبة السوداء المزروعة في الجزائر (*Nigella sativa L*). النشاطية المضادة للأكسدة لمستخلصات هذه النبتة تم تقديرها بإستعمال إختبارات DPPH , حيث أن النتائج أظهرت أن هذه المستخلصات تملك قدرة عالية على إلتقاط الجذر الحر DPPH تقدر ب  $IC_{50}$  2,06 مغ/مل بالنسبة للزيت و 4,3 مغ/مل بالنسبة للمستخلص الميثانولي وبالنسبة للقدرة على التقاط الجذر الهيدروكسيلي أظهرت النتائج  $IC_{50}$  5,65 مغ/مل بالنسبة للزيت و 7,73 مغ/مل بالنسبة للمستخلص الميثانولي.

هذه النشاطية المضادة للأكسدة تم تأكيدها بإختبارات القدرة الإرجاعية وطريقة التقاط ايونات الحديد الثنائي ، إذ أن هذه الزيوت قادرة على الإرجاع بمقدار  $CE_{50}$  3,09 مغ/مل بالنسبة للزيت و 2,88 مغ/مل بالنسبة للمستخلص الميثانولي و من جهة أخرى هذه الزيوت تملك قدرة على إلتقاط ايونات الحديد الثنائي تظهر بمقدار  $CE_{50}$  5,27 مغ/مل بالنسبة للزيت و 7,73 مغ/مل بالنسبة للمستخلص الميثانولي .

**الكلمات المفاتيح :** القدرة المضادة للأأسدة ، ملتقطات المعادن ، الأنواع الآسجينية النشطة ، الفعل الإزاحي.

**ALIOUAT Assia**

*Soutenu le : 02/07/2014*

**BOULKELIA Noussaiba**

---

***Thème: L'activité Antioxydant Des Extraits Des Graines De La Plante Nigelle sativa L***

---

**Résumé**

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

L'objectif de cette étude est l'évaluation des pouvoirs antioxydant des extraits obtenus des graines de la nigelle Algérienne. Le pouvoir antioxydant de ces extraits a été évalué *in vitro* par le teste de DPPH, les résultats obtenus montrent une IC<sub>50</sub> de 2,06 mg/ml pour l'huile total et 4,3 mg/ml pour l'extrait méthanolique, par ailleurs ces extraits sont des piègeur du radical hydroxyl avec des IC<sub>50</sub> de 5,65 mg/ml et 10,48 mg/ml pour l'huile total et l'extrait méthanolique respectivement.

Cette capacité antioxydant est confirmée par les tests du pouvoir réducteur et le test du fer ferreux ; Le pouvoir réducteur résulte une CE<sub>50</sub> de 3,09 mg/ml pour l'huile total et une CE<sub>50</sub> de 2,88 mg/ml pour l'extrait méthanolique. Le teste du fer ferreux indique un pouvoir antioxydant qui se caractérise par un IC<sub>50</sub> de 5,27 mg/ml pour l'huile total et 7,73 mg/ml pour l'extrait méthanolique.

**Mots clé :** Capacité antioxydant, Chélation de métaux, Espèces oxygénées réactives (ROS), *Nigella sativa L.* Piégeur.

---

**Président : Dr .BOUSEBA B.**

M.C.B. Univercite Constantine 1.

**Rappporteur : Melle . MOSBAH A**

M.A.B.Univercite Constantine 1.

**Examineur :Mr.MOKRANI E.H**

M.A.B.Univercite Constantine 1.