

AAR :	Activité antioxydante relative
Abs :	Absorbance
AGPI :	Acide gras polyinsaturé
ALT:	Alanine aminotransférase
ANOVA:	Analysis of variance
APR :	Pouvoir antiradicalaire
BHT:	Butylated hydroxytoluene
CAP:	Capacité antioxydante plasmatique
CAT:	Catalase
CCM :	Chromatographie sur couches minces
CPG:	Chromatographie en phase gazeuse
CTL:	Groupe control
DEN :	Diéthylnitrosamine
DPPH:	1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl
EAc :	Extrait d'acétate d'éthyle des graines de <i>Nigella sativa</i>
EAG :	Equivalent d'acide gallique
EAq :	Extrait aqueux des graines de <i>Nigella sativa</i>
EBr :	Extrait brut des graines de <i>Nigella sativa</i>
EC ₅₀ :	Concentration effective à 50%
ECh :	Extrait du chloroforme des graines de <i>Nigella sativa</i>
EAG:	Equivalents d'acide gallique
EDTA :	Ethylene diamine tetraacetic
EQ:	Equivalents de quercétine
E-EDTA :	Equivalent d'EDTA
EHx :	Extrait d'hexane des graines de <i>Nigella sativa</i>
EM :	Groupe traité par l'extrait méthanolique
EOR :	Espèces oxygénées réactives.
EQ :	Equivalent de quercétine
GC-MS:	Gas chromatography – Mass pectroscopy
GPx :	Glutathion peroxydase
GR :	Glutathion réductase

GSH :	Glutathion réduit
GSSG :	Glutathion oxydé
HF :	Groupe traité par l'huile fixe
HPLC:	High performance liquid chromatography
HT ₅₀ :	Half-hemolysis time
IC ₅₀ :	Concentration inhibitrice a 50%
INF:	Interféron
IL:	Interleukine
KDa :	Kilodalton
KRL:	Kit radicaux libres
LPS:	Lipopolysaccharide
LTh :	Lymphocyte T helper
M ^{nt} :	Métal de transition
MDA :	Malondialdehyde
NADH :	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NBT:	Nitroblue tetrazolium
NO :	Nitrite oxyde
NOS :	Nitrique oxyde synthase
NK:	Naturel killer
PL:	Phospholipides
PMS :	Phenazine methosulphate
Rf :	Rapport frontal
SD :	Standard deviation
SDS-PAGE :	Sodium dodecyl sulphate – Polyacrylamid Gel Electrophoresis
SEM:	Standard error of mean
SOD :	Superoxyde dismutase
<i>t</i> -BHP :	<i>tert</i> -butyl hydroperoxide
TBHQ :	<i>tert</i> -butyl hydroquinone
TNF :	Tumor necrosis factor
UV:	Ultra violet
XO:	Xanthine oxydase

SOMMAIRE

Introduction générale

1.REVUE BIBIOGRAPHIQUE	
I.1. STRESS OXYDANT CELLULAIRE.....	1
I.1.1. Les espèces oxygénées réactives (EOR)	1
I.1.2. Nature et sources cellulaires des EOR.....	2
I.1.2.1 Le radical anion superoxyde.....	2
I.1.2.2 Le peroxyde d'hydrogène.....	4
I.1.2.3. Le radical hydroxyle.....	4
I.1.2.4. Le monoxyde d'azote	5
I.1.2.5. L'oxygène singulier.....	5
I.1.3. Stress oxydant et ses conséquences biologiques	6
I.1.3.1. Les lipides	7
I.1.3.2. Les protéines	9
I.1.3.3. Les acides nucléiques	9
I.1.4.Implications pathologiques des ROS.....	9
I.1.5. Systèmes de défenses antioxydants	11
I.1.5.1. Systèmes enzymatiques	11
I.1.5.2. Systèmes non enzymatiques	13
I.2. LES FLAVONOIDES COMME ANTIOXYDANTS.....	14
I.2.1. Structure et classification des flavonoïdes.....	14
I.2.2. Localisation, distribution et biodisponibilité des flavonoïdes	16
I.2.3. Effets biologiques et pharmacologiques des flavonoïdes	16
I.2.4. Activité antioxydante des flavonoïdes.....	17
I.2.4.1. Piégeage direct des radicaux libres.....	17
I.2.4.2. Chélation des ions métalliques	18
I.2.4.3. Inhibition enzymatique.....	20
I.3. LA PLANTE <i>Nigella sativa</i> L.....	21
I.3.1. Généralités.....	21
I.3.2. Aspect botanique de <i>Nigella sativa</i> L.....	21
I.3.3. Composition chimique des graines de <i>Nigella sativa</i>	23
I.3.4. Propriétés pharmacologiques des graines de <i>Nigella sativa</i>	25
I.3.5. Activité antioxydante	30
I.3.5.1. Activité antioxydante <i>in vitro</i>	30
I.3.5.2. Activité antioxydante <i>in vivo</i>	32
II. MATÉRIEL ET METHODES.....	
II.1 MATERIEL	33
II.1.1.Matériel biologique.....	33
II.1.1.1.Choix des animaux.....	33
II.1.1.2. Les graines de <i>Nigella sativa</i> L.....	33
II.1.2. Réactifs chimiques.....	33

II.2. METHODES.....	33
II.2.1. Préparation de l'extrait brut	33
II.2.2. Fractionnement de l'extrait brut.....	34
II.2.3. Analyse des extraits des graines de <i>Nigella sativa</i>	35
II.2.3.1. Dosage des composés phénoliques	35
II.2.3.2. Dosage des flavonoïdes.....	35
II.2.3.3. Chromatographie sur couche mince (CCM)	35
II.2.4. Tests, <i>in vitro</i> , de l'activité antioxydante	36
III.2.4.1. Effet scavenger du radical DPPH	36
II.2.4.2. Effet scavenger de l'anion superoxyde (PMS-NADH-NBT).....	37
II.2.4.3. Chélation du fer ferreux.....	37
II.2.4.4. Test de blanchissement du β -carotène	38
II.2.4.5. Test, <i>in vitro</i> , de la résistance des globules rouges humains prétraités par les extraits des graines <i>Nigella sativa</i> à l'attaque radicalaire.....	38
II.2.5. Etude, <i>in vivo</i> , de l'activité antioxydante de l'extrait brut méthanolique et de l'huile fixe commerciale des graines de <i>Nigella sativa</i>	39
II.2.5.1. Evaluation de l'effet de l'extrait brut méthanolique et de l'huile fixe des graines <i>Nigella sativa</i> sur la capacité antioxydante totale du sang chez la souris	39
II.2.5.2. Evaluation de l'effet de l'extrait brut méthanolique et de l'huile fixe des graines de <i>Nigella sativa</i> sur la capacité antioxydante plasmatique vis-à-vis du radical DPPH.....	40
II.2.6. Analyses statistiques	40
III. RESULTATS ET DISCUSSION.....	
III.1. PREPARATION DES EXTRAITS A PARTIR DES GRAINES DE <i>Nigella sativa</i>	41
III.2. ANALYSE DES EXTRAITS DES GRAINES DE <i>Nigella sativa</i>	41
III.2.1. Dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes.	43
III.2.2. Chromatographie sur couches minces (CCM).....	46
III.3. TESTS, <i>IN VITRO</i> , DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE	49
III.3.1. Effet scavenger du radical DPPH	49
III.3.2. Effet scavenger de l'anion superoxyde (PMS-NADH-NBT).....	53
III.3.3. Chélation du fer ferreux	57
III.3.4. Test de blanchissement du β -carotène	61
III.3.5. Test, <i>in vitro</i> , de la résistance des globules rouges humaine prétraités par les extraits des graines de <i>Nigella sativa</i> à l'attaque radicalaire.....	64
III.4. ETUDE, <i>IN VIVO</i> , DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DE L'EXTRAIT BRUT METHANOLIQUE ET DE L'HUILE FIXE COMMERCIALE DES GRAINES DE <i>Nigella sativa</i>	67
III.4.1. Effet sur la capacité antioxydante totale du sang	67
III.4.2. Effet sur la capacité antioxydante plasmatique vis-à-vis du radical DPPH.....	71

Conclusion et perspectives

Références bibliographiques

Liste des figures

Figure 1. Les principales sources cellulaires des EOR.....	6
Figure 2. Cibles biologiques et endommagements oxydatifs induits par les EOR.....	7
Figure 3. Les trois étapes de la peroxydation lipidique.....	8
Figure 4. Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants.....	11
Figure 5. Structure générale du noyau des flavonoïdes.....	15
Figure 6. Réaction des flavonoïdes avec les EOR.....	17
Figure 7. Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques.....	19
Figure 8. Aspect morphologique de la plante <i>Nigella sativa</i>	22
Figure 9. Les étapes du fractionnement de l'extrait brut des graines de <i>Nigella sativa</i>	34
Figure 10. Droite d'étalonnage de l'acide gallique.....	44
Figure 11. Droite d'étalonnage de la quercétine.....	44
Figure 12. Chromatographie sur couches minces des extraits des graines de <i>Nigella sativa</i>	46
Figure 13. Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.....	55
Figure 14. Activité antiradicalaire des extraits des graines de <i>Nigella sativa</i> , de la quercétine et du TBHQ.....	50
Figure 15. Effet piègeur du radical superoxyde produit dans le système (PMS-NADH-NBT) par les extraits des graines de <i>Nigella sativa</i> , la quercétine et le BHT.....	54
Figure 16. Activité chélatrice des extraits des graines de <i>Nigella sativa</i> , de l'EDTA et de la quercétine.....	58
Figure 17. Cinétique de blanchissement du β -carotène à 490 nm en absence et en présence des extraits de <i>Nigella sativa</i> , du BHT, α -Tocophérol.....	62
Figure 18. Activité antioxydante relative des extraits des graines de <i>Nigella sativa</i> , du BHT et de l' α -tocophérol dans le système β -carotène/acide linoléique.....	62
Figure 19. Structure des saponosides à hédéragénine isolés à partir des graines de <i>Nigella sativa</i>	65
Figure 20. Effet des saponosides sur la membrane érythrocytaire.....	66
Figure 21. Cinétique de la lyse érythrocytaire en présence de t-BHP pour les différents groupes étudiés.....	68
Figure 22. Temps de demis hémolyse (HT_{50}) pour les différents groupes étudiés.....	67
Figure 23. La capacité antioxydante plasmatique vis-à-vis du radical DPPH pour les différents groupes étudiés.....	72
Figure 24. Relation entre la capacité antioxydante plasmatique et la capacité antioxydante totale du sang (HT_{50}).....	73

Liste des tableaux

Tableau 1. Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques..	1
Tableau 2. Les principales affections liées à la production des EOR.....	10
Tableau 3. Structure chimique de certains flavonoïdes représentatifs de chaque classe.....	15
Tableau 4. Aspects, couleurs et rendements des diverses fractions extraites à partir des graines de <i>Nigella sativa</i> en pourcentage par rapport au poids total des graines et à l'extrait brut.....	41
Tableau 5. Dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes dans les extraits des graines de <i>Nigella sativa</i>	43
Tableau 6. Rapports frontaux des spots issus de la séparation des extraits des graines de <i>Nigella sativa</i> ainsi que ceux des témoins utilisés.....	47
Tableau 7. Activité antiradicalaire des extraits des graines de <i>Nigella sativa</i>	59
Tableau 8. Effet scavenger des extraits des graines de <i>Nigella sativa</i> vis-à-vis du superoxyde produit dans le système PMS-NADH-NBT.....	53
Tableau 9. Activité chélatrice des ions ferreux par les extraits des graines de <i>Nigella sativa</i>	57

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Introduction générale

L'oxygène moléculaire est un élément crucial pour la vie des organismes aérobiques, toutefois il peut former des espèces partiellement réduites et fortement toxiques appelées les radicaux libres ou encore les espèces oxygénées réactives (EOR). Aux doses faibles, les EOR sont très utiles pour l'organisme et jouent des rôles importants dans divers mécanismes physiologiques tel que la transduction du signal. Aux doses excessives, les EOR deviennent néfastes et toxiques pour l'organisme. La surproduction des EOR au delà des capacités antioxydantes des systèmes biologiques donne lieu au stress oxydant qui est impliqué dans l'apparition de plusieurs maladies allant de l'artériosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, les ischémies et le processus du vieillissement.

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 risques et les effets néfastes des antioxydants synthétiques utilisés comme additifs alimentaires ont été questionnés au cours des dernière années et la nécessité de les substituer par des antioxydants naturels, issus de plantes médicinales, est apparente. Les plantes médicinales constituent une source inépuisable de substances ayant des activités biologiques et pharmacologiques très variées.

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 antidiabétique, anti-hypertenseur et anti-inflammatoire. Les études récentes soulignent des propriétés curatives extraordinaires et prometteuses (anti-tumorales, hypoglycémiantes immunostimulantes anti-inflammatoires et antioxydantes).

Les substances naturelles douées d'activité antioxydante présentent un intérêt socioéconomique peut être sans équivoque dans le domaine de la recherche bio pharmacologique. Plusieurs laboratoires à travers le monde se sont orientés vers ce type de recherche des substances bioactives et leur valorisation. Dans ce contexte s'inscrit ce présent

travail dont l'objectif essentiel consiste à chercher dans les extraits des graines de *Nigella sativa* les fractions susceptibles de bloquer l'action des EOR et de protéger l'organisme contre les endommagements oxydatifs qu'elles peuvent induire en utilisant des systèmes chimiques et biologiques *in vitro*. Nous avons tenté également d'évaluer, *in vivo*, l'effet de l'extrait brut méthanolique et de l'huile fixe commerciale sur le potentiel globale de défense antioxydante de l'organisme.

Dans ce présent travail, nous avons fixé les objectifs suivants

- Analyse quantitative et qualitative du contenu en polyphénols et en flavonoïdes des différents extraits aqueux et organiques des graines de *Nigella sativa*.
- Evaluation du pouvoir piègeur (scavenger) des différents extraits des graines de *Nigella sativa* vis-à-vis d'un radical libre relativement stable (DPPH) et vis-à-vis du radical superoxyde généré par un système chimique (PMS-NADH).
- Etude de l'activité chélatrice des métaux de transition par les différents extraits des graines de *Nigella sativa*.
- Evaluation de l'effet anti-lipoperoxydant des extraits des graines de *Nigella sativa* en utilisant le système acide linoléique/ β -carotène.
- Etude *in vitro* de l'effet protecteur des extraits des graines de *Nigella sativa* contre l'hémolyse oxydative des érythrocytes.
- Etude *in vivo* de l'effet de l'huile fixe et de l'extrait brut méthanolique des graines de *Nigella sativa* sur l'amélioration du potentiel globale de défenses antioxydantes chez la souris.

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. STRESS OXYDANT CELLULAIRE

I.1.1. Les espèces oxygénées réactives (EOR)

L'appellation espèces oxygénées réactives (EOR) inclut les radicaux libres de l'oxygène (radical superoxyde, radical hydroxyle, monoxyde d'azote, etc...) mais aussi certains dérivés réactives non radicalaires dont la toxicité est plus importante tels que le peroxyde d'hydrogène et le peroxydinitrite (Bartosz, 2003. Halliwell et Whiteman 2004) (**Tableau 1**).

Tableau 1. Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques (D'après Bartosz, 2003)

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

Les radicaux libres sont des espèces chimiques, atomiques ou moléculaires, contenant un ou plusieurs électron(s) libre(s) non apparié(s) sur leurs couches externes (Lehucher-Michel *et al.*, 2001). Cet état leur confère une instabilité énergétique et cinétique. Ils apparaissent soit au cours de la rupture symétrique d'une liaison covalente (fission homolytique) pendant laquelle chaque atome conserve son électron soit au cours d'une réaction redox avec perte ou gain d'un électron à partir d'un composé non radical (Kocchilin-Ramonatxo, 2006).

Du fait de leur caractère très électrophile, les espèces radicalaires vont tenter de rattraper leurs électrons célibataires en agressant toute molécule susceptible de se faire arracher un électron (Lehucher-Michel *et al.*, 2001). L'espèce agressée devient à son tour radicalaire initiant de cette façon un processus de réaction en chaîne (Kocchilin-Ramonatxo, 2006) qui se caractérise par trois étapes ; **(i)** initiation, **(ii)** propagation et **(iii)** terminaison provoquant enfin une perturbation de la cellule vivante.

L'instabilité des EOR rend difficile leur mise en évidence au niveau des différents milieux biologiques. Leurs constantes de vitesse réactionnelle varient selon leurs natures, elles sont très élevées et peuvent aller de 10^5 à 10^{10} mol⁻¹ S⁻¹ (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2003). La durée de vie des EOR est extrêmement très courte de la nano à la milli seconde (Lehucher-Michel *et al.*, 2001).

En effet, la toxicité des EOR n'est pas nécessairement corrélée avec leur réactivité, dans plusieurs cas des espèces peu réactives peuvent être à l'origine d'une grande toxicité en raison de leur demie vie longue qui leur permet de se diffuser et gagner des locations sensibles où elles peuvent interagir et causer des dommages à longue distance de leurs sites de production (Kohen et nyska., 2002).

I.1.2. Nature et sources cellulaires des EOR

Les EOR se forment de façon parasitaire dans toutes les réactions biochimiques comportant le transfert d'électrons ou la participation de l'oxygène. Divers types cellulaires et tissus donnent naissance aux EOR par des réactions enzymatiques ou par auto-oxydation au cours de leur métabolisme normale et parfois en réponse à un stimuli spécifique. Dans ce contexte, plusieurs exemples peuvent être cités. (**Figure 1**).

I.1.2.1. Le radical anion superoxyde

Par sa configuration électronique l'oxygène moléculaire est un radical, il possède en effet deux électrons non appariés, heureusement un blocage cinétique limite sa réactivité ; les spins de ses deux électrons son parallèles lui attribuant une stabilité relativement grande. Cependant, dans l'organisme, une partie de cet oxygène moléculaire peut capter d'une manière univalente un électron conduisant à la formation du radical superoxyde (O₂^{•-}); chef de fil des EOR (Kocchilin-Ramonatxo, 2006).

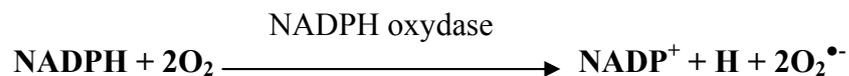


La source principale de ce radical est la chaîne de transport d'électrons mitochondrial (Bartosz, 2003) au niveau du complexe I (NADH /ubiquinone oxydoréductase) et du complexe III (ubiquinol /cytochrome c oxydoréduction) (Chiarugi et Fiaschi, 2007). Environ 0 à 5 % de

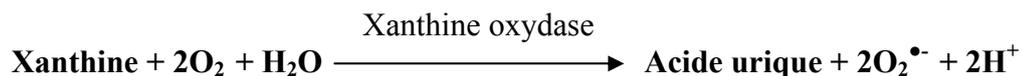
l'oxygène moléculaire utilisé par les mitochondries est partiellement réduit par des électrons qui s'échappent des transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire (Bartosz, 2003).

D'autres chaînes de transport d'électrons (péroxyosomes et microsomes) contribuent pareillement à la production du $O_2^{\bullet-}$ dans les cellules en aérobiose. Les cytochromes P_{450} et b_5 de la chaîne de transport d'électrons des microsomes peuvent produire des EOR quand ils interrompent le cycle redox normal et détournent le flux d'électrons vers l' O_2 (Sevanian *et al.*, 1990).

La poussée respiratoire (respiratory burst) des polynucléaires neutrophiles constitue une source cellulaire importante de l'anion superoxyde qui est produit au niveau de la NADPH oxydase, un complexe enzymatique formé de plusieurs sous unités. Cette enzyme normalement dormante est activée lorsque la cellule phagocytaire est stimulée pour produire le $O_2^{\bullet-}$. Cette production est à l'origine de la synthèse de molécules comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'hypochlorite ($ClO^{\bullet-}$) indispensables à la digestion du matériel phagocyté (Babior *et al.*, 2002).



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

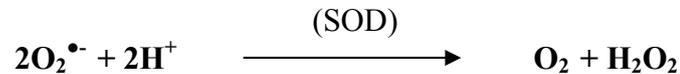


De nombreuses molécules peuvent être substrats de réactions d'auto-oxydations (non enzymatique), comme le glucose, les monoamines (dopamine, noradrénaline, adrénaline) l'hémoglobine, conduisant également à la formation du superoxyde (Bartosz, 2003).

Ce radical est peu réactif mais représente le précurseur d'espèces plus agressives. Avec l'apport d'un autre électron il devient un ion peroxyde $O_2^{\bullet-2}$ qui à son tour avec l'ajout de deux ions hydrogène ($2 H^+$) produit le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

I.1.2.2. Le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) se forme par la dismutation spontanée ou enzymatique du radical superoxyde (Pal Yu, 1994), La dismutation enzymatique est catalysée principalement par la superoxyde dismutase (SOD).



À côté de la SOD, il existe d'autres enzymes produisant H_2O_2 , comme les oxydases présentes particulièrement dans les peroxysomes (Kohen et Nyska *et al.*, 2002). Cependant, certaines de ces oxydases comme la glycoxylate oxydase, la D-aminoacide oxydase peuvent catalyser directement la réduction divalente de l'oxygène moléculaire produisant ainsi le peroxyde d'hydrogène sans formation du radical superoxyde (Del Rio *et al.*, 1996), le foie est l'organe central de cette production. Les microsomes sont responsables dans 80% de la concentration d' H_2O_2 généré *in vivo* dans les sites hyperoxiques (Valko *et al.*, 2006)

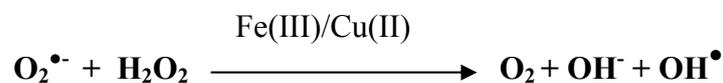
L'absence de charge à sa surface rend cette EOR très lipophile et peu réactif en milieu aqueux, le peroxyde d'hydrogène peu néanmoins être considéré comme un dérivé réactif de l'oxygène potentiellement toxique car sa faible réactivité associée à sa capacité de traverser les membranes biologiques fait qu'il peu se retrouver à une grande distance de son lieu de synthèse, il peut alors participer à la biosynthèse du radical hydroxyle (Pal Yu, 1994 ; Cash *et al.*, 2007).

I.1.2.3. Le radical hydroxyle

Le radical hydroxyle (OH^\bullet) est formé principalement par la dégradation du H_2O_2 en présence de métaux de transition sous leur forme réduite, ainsi H_2O_2 associé à du fer ferreux conduit à la réaction de Fenton.



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

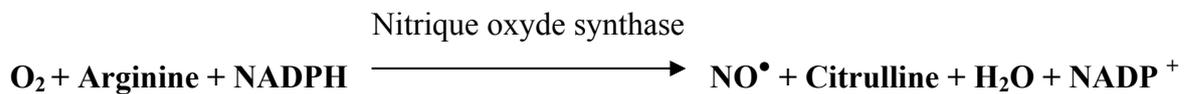


D'autres voies de formation du OH^\bullet sont : la décomposition de l'acide peroxonitrique et la réaction de l'acide hypochloreux avec $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Bartosz, 2003).

Avec une demi vie de l'ordre de la nanoseconde, le radical hydroxyle est le plus réactif de toutes les espèces dérivées de l'oxygène, il réagit avec de nombreuses espèces moléculaires se trouvant dans son voisinage (protéine, lipide, ADN) entraînant ainsi de multiples dommages, il apparaît comme l'espèce réactive ayant une responsabilité majeure dans la cytotoxicité des radicaux libres (Guetteridge, 1993).

I.1.2.4. Le monoxyde d'azote

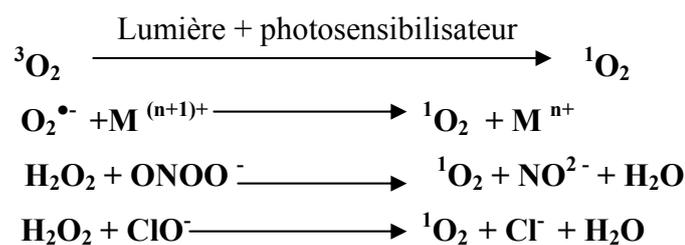
Le monoxyde d'azote (NO^\bullet) est produit chez les organismes supérieurs par l'oxydation de l'un des atomes N terminaux de la L-arginine, cette réaction est catalysée par la nitrique oxyde synthase (NOS) (Sorg, 2004) selon la réaction suivante :



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

I.1.2.5. L'oxygène singulier

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



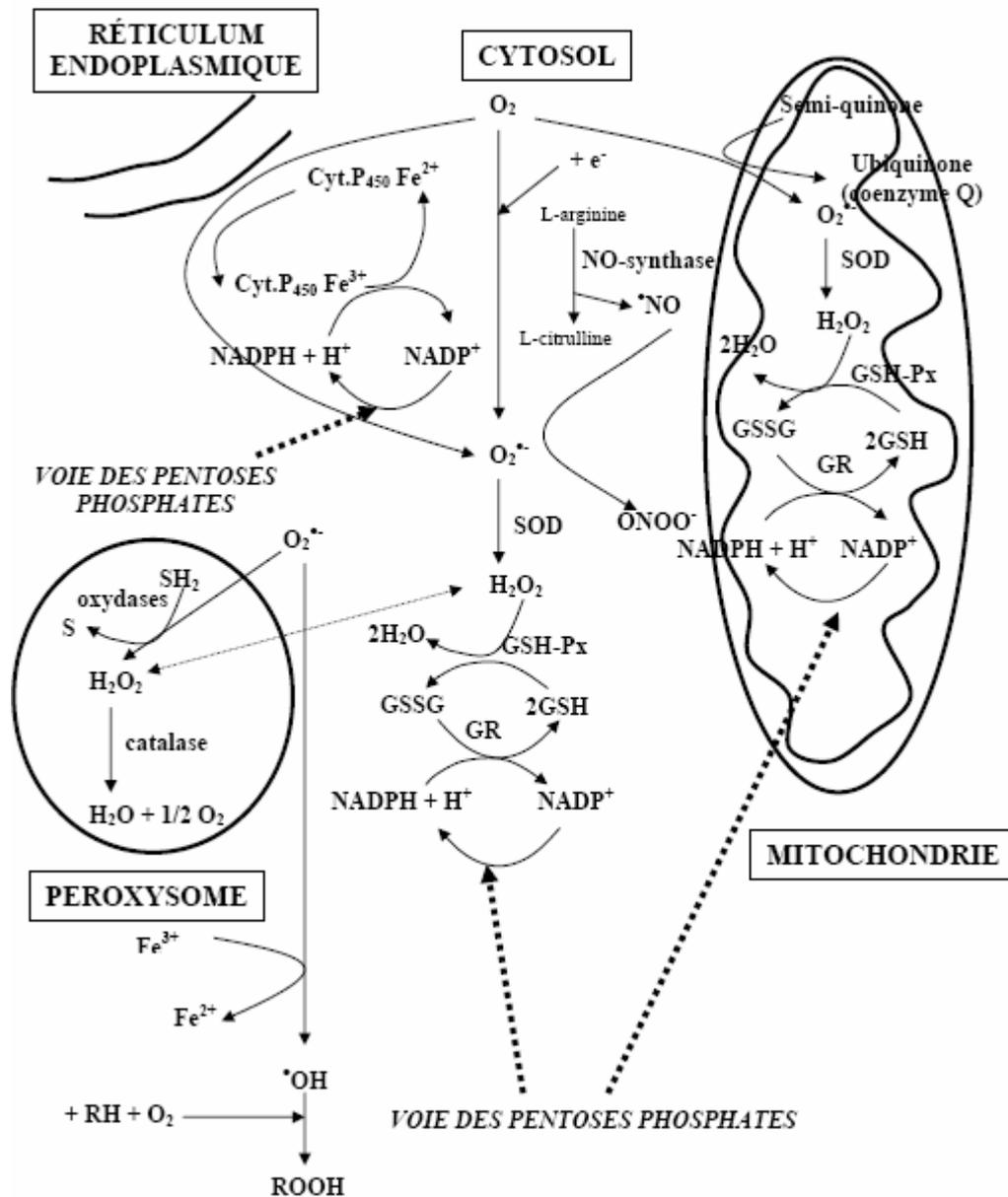


Figure 1. Les principales sources cellulaires des EOR

(D'après Bonnefont-Rouseelot., 2003).

Les EOR apparaissent donc comme des molécules produites par divers mécanismes physiologiques. À certaines doses, elles sont utiles à l'organisme, mais leurs productions peut devenir excessives ou résulter de mécanismes toxiques exogènes à l'organisme.

I.1.3. Stress oxydatif et ses conséquences biologiques

Le stress oxydatif réfère à une perturbation dans la balance métabolique cellulaire durant laquelle, la génération d'oxydants accable le système de défenses antioxydantes, que ce soit

par une augmentation de la production d'oxydants et/ou par une diminution des défenses antioxydantes (Sorg, 2004). Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, citons la surproduction endogène d'agents prooxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, herbicides, ozone, amiante, métaux toxiques) (Pincemail et al, 2002 ; Sorg, 2004 ; Kocchilin-Ramonatxo, 2006). L'accumulation des EOR a pour conséquence l'apparition de dégâts cellulaires et tissulaires souvent irréversibles dont les cibles biologiques les plus vulnérables sont les protéines les lipides et l'acide désoxyribonucléique (Halliwell et Whiteman 2004; Valko *et al.*, 2006) (**Figure 2**)

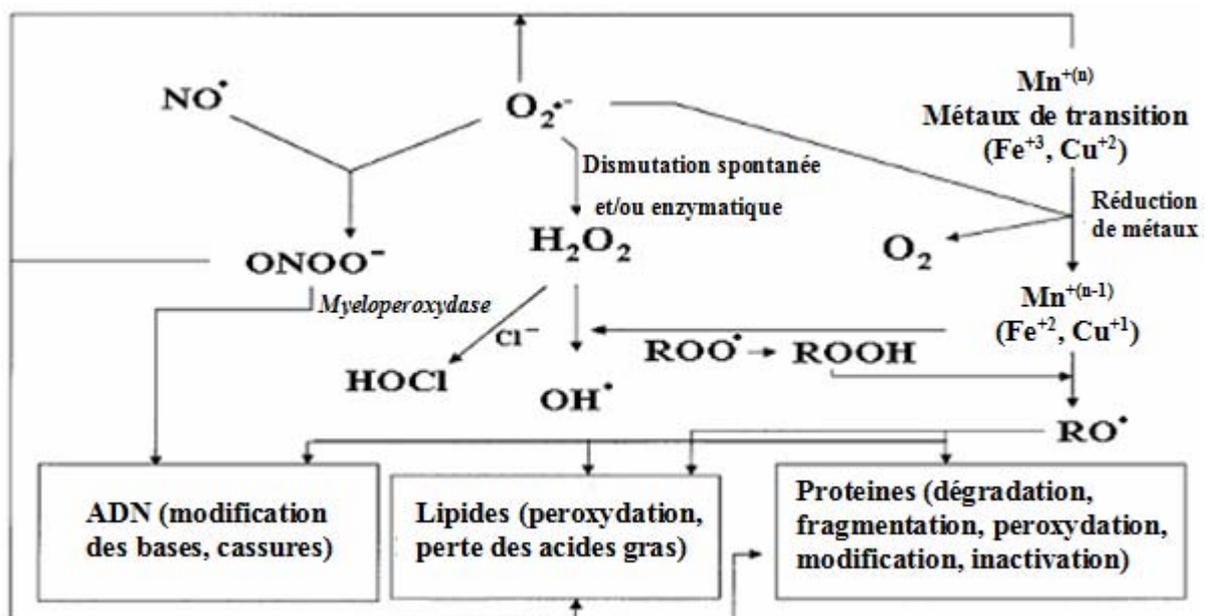


Figure2. Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les EOR
(D'après Kohen et Nyska, 2002).

I.1.3.1. Les lipides

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont la cible privilégiée des EOR en raison de leurs hydrogènes bis allyliques facilement oxydables. Comme ces derniers sont les lipides majeurs des membranes cellulaires et des lipoprotéines, on comprend leurs vulnérabilités particulières. . Les produits d'oxydation formés peuvent participer en tant que second messager à la régulation de fonctions métaboliques, de l'expression des gènes et de la prolifération cellulaire. Ils peuvent aussi, et surtout, se comporter comme des substances toxiques responsables des dysfonctionnements et d'altérations cellulaires (perte d'acides gras polyinsaturés, diminution de la fluidité membranaire, modification de l'activité des enzymes et des récepteurs

membranaires, libération du matériel à partir du compartiment subcellulaire) (Beckman *et* Ames, 1998 ; Lehucher-Michel, 2001). La peroxydation lipidique, se déroule en trois phases suivantes (illustrées par la **figure 3**).

a) l'initiation: l'attaque par un radical OH^\bullet du groupement méthylène présent entre deux doubles liaisons d'acide gras polyinsaturés produit un radical carboné R^\bullet (OH^\bullet enlève un atome d'hydrogène du CH_2 puis les doubles liaisons subissent un réarrangement moléculaire conduisant à la formation de diènes conjugués), en présence d' O_2 le radical carboné est transformé en radical peroxyde RO_2^\bullet (Martínez-Cayuela, 1995).

b) la propagation: le radical RO_2^\bullet enlève un hydrogène à un nouvel AGPI voisin qui à son tour produira un radical R^\bullet puis un radical RO_2^\bullet , une réaction en chaîne s'installe. En présence de métaux de transitions, les hydroperoxydes formés peuvent subir un clivage au niveau des liaisons C-C pour donner naissance à divers produits de décompositions ; le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal représentant les produits les plus toxiques de la peroxydation lipidique (Martínez-Cayuela, 1995 ; Lehucher-Michel, 2001).

c) la terminaison : cette phase consiste à former des composés stables issus de la rencontre entre deux espèces radicalaires ou le plus souvent par la réaction d'un radical avec une molécule antioxydante dite 'briseur de chaîne' (Khohen et Nyska., 2002).

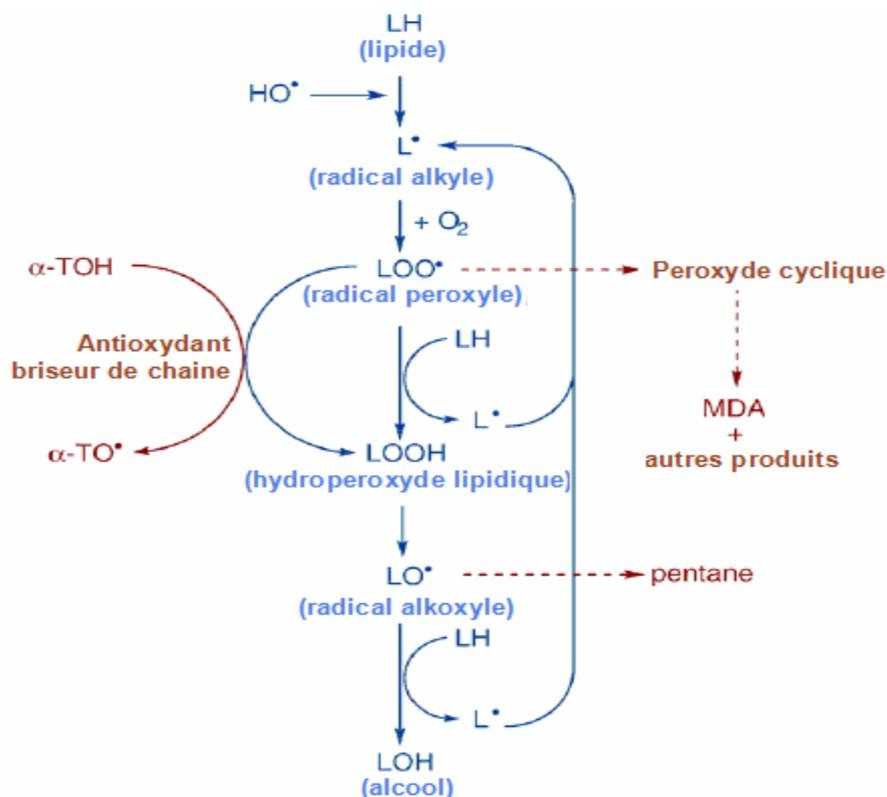


Figure 3. Les trois étapes de la peroxydation lipidique (D'après Sachdev et Davies, 2008).

I.1.3.2. Les protéines

Les acides aminés des protéines sont la cible des EOR, soit au niveau de leur chaîne latérale, avec formation de produits d'oxydations, soit au niveau de la liaison peptidique, entraînant la fragmentation de la chaîne (Berlett et Stadtman, 1997). Si la majorité des acides aminés peuvent être oxydés par les EOR, les acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) et aromatiques (tyrosine, tryptophane) sont les plus sensibles. L'oxydation des acides aminés génère des groupements hydroxyles et carbonyles sur les protéines mais peut également induire des modifications structurales plus importantes comme des réticulations intra ou intermoléculaires, ce qui affecte leurs fonctionnements, antigénicités et leurs activités, (Martinez-Cayuella, 1995 ; Lehucher-Michel *et al.*, 2001 ; Valko *et al.*, 2007). Les protéines modifiées deviennent généralement plus sensibles à l'action des protéases et sont alors dirigées vers la dégradation protéolytique au niveau du protéasome (Jung *et al.*, 2007).

I.1.3.3. Les acides nucléiques

Les bases puriques, pyrimidiques et le désoxyribose sont la cible privilégiée des EOR, ils sont alors transformés en produits de fragmentations et en bases oxydées, (Martinez-Cayuella, 1994). Les EOR ont une grande affinité de réaction avec certaines bases constitutives de l'ADN. La guanine est ainsi facilement transformée en 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) qui est normalement éliminée par des enzymes de réparation de l'ADN qui peuvent, elles aussi, être victimes de l'action des radicaux libres. Si ces systèmes de protection sont débordés ou défectueux, les altérations du matériel génétique s'accumuleront au sein de l'ADN représentant ainsi la première étape impliquée dans la mutagenèse, la carcinogenèse et le vieillissement (Lehucher-Michel *et al.*, 2001 ; Favier, 2003 ; Valko *et al.*, 2006).

I.1.4. Implications pathologiques des EOR

En raison de leur réactivité élevée, les EOR interagissent avec toute une série de substrats biologiques conduisant à l'altération de l'homéostasie cellulaire de l'organisme. Le dysfonctionnement des systèmes de régulation de l'oxygène et de ses métabolites est à l'origine de phénomènes du stress oxydant dont l'importance dans de nombreuses pathologies comme facteur déclenchant ou associé à des complications lors de leur évolution est maintenant largement démontré (Favier, 2003). En fait, de nombreuses études, tant épidémiologiques que cliniques, indiquent que le stress oxydant est potentiellement impliqué dans le développement de plus d'une centaine de pathologies humaines différentes (Pincemail *et al.*, 2002) allant de l'athérosclérose au cancer tout en passant par les maladies

inflammatoires,, cardiovasculaires, neurodégénératives et le diabète (**Tableau 2**). Le rôle du stress oxydant à été également évoqué même dans des processus physiologiques tel que le vieillissement (Martinez-Cayuela, 1995 ; Lehucher-Michel *et al.*, 2001 ; Sorg, 2004 ; Valko *et al.*, 2007).

La multiplicité des conséquences médicales de ce stress n'a rien de surprenant car, selon les maladies, celui-ci se localisera à un tissu et à des types cellulaires particuliers, mettra en jeu des espèces radicalaires différentes et sera associé à d'autres facteurs variables et à des anomalies génétiques spécifiques à chaque individu. De plus, La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux avec une diminution de l'efficacité des systèmes de réparations et de dégradations des constituants oxydés (Sohal *et al.*, 2002).

Tableau 2. Les principales affections liées à la production des EOR.

<i>Pathologies</i>	<i>Références</i>
Lésions de reperfusion post-ischémique	(Zweier et Talukder, 2006)
Maladies auto-immunes	(Halliwell et guetteridge, 1999)
Arthrite rhumatoïde	(Ahsan <i>et al.</i> , 2003)
Maladies inflammatoires	(Densiov et Afanas'ev, 2005)
Athérosclérose	(Harrison <i>et al.</i> , 2003)
Maladies d'Alzheimer, de parkinson	(Sorg, 2004)
Emphysème	(Lechuer-Michel <i>et al.</i> , 2001)
Diabète sucré	(Pal Yu, 1994)
Certains cancers	(Valko <i>et al.</i> , 2007)
Anémie drépanocytaire	(Martinez-Cayuela, 1995)

I.1.5. Systèmes de défenses antioxydants

Le maintien d'un niveau non cytotoxique des EOR est assuré par des systèmes d'antioxydants. Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (Berger, 2006). Les cellules utilisent de nombreuses stratégies anti-oxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leurs niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (**Figure 4**). La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en systèmes enzymatiques et systèmes non enzymatiques (Goudable et Favier, 1997).

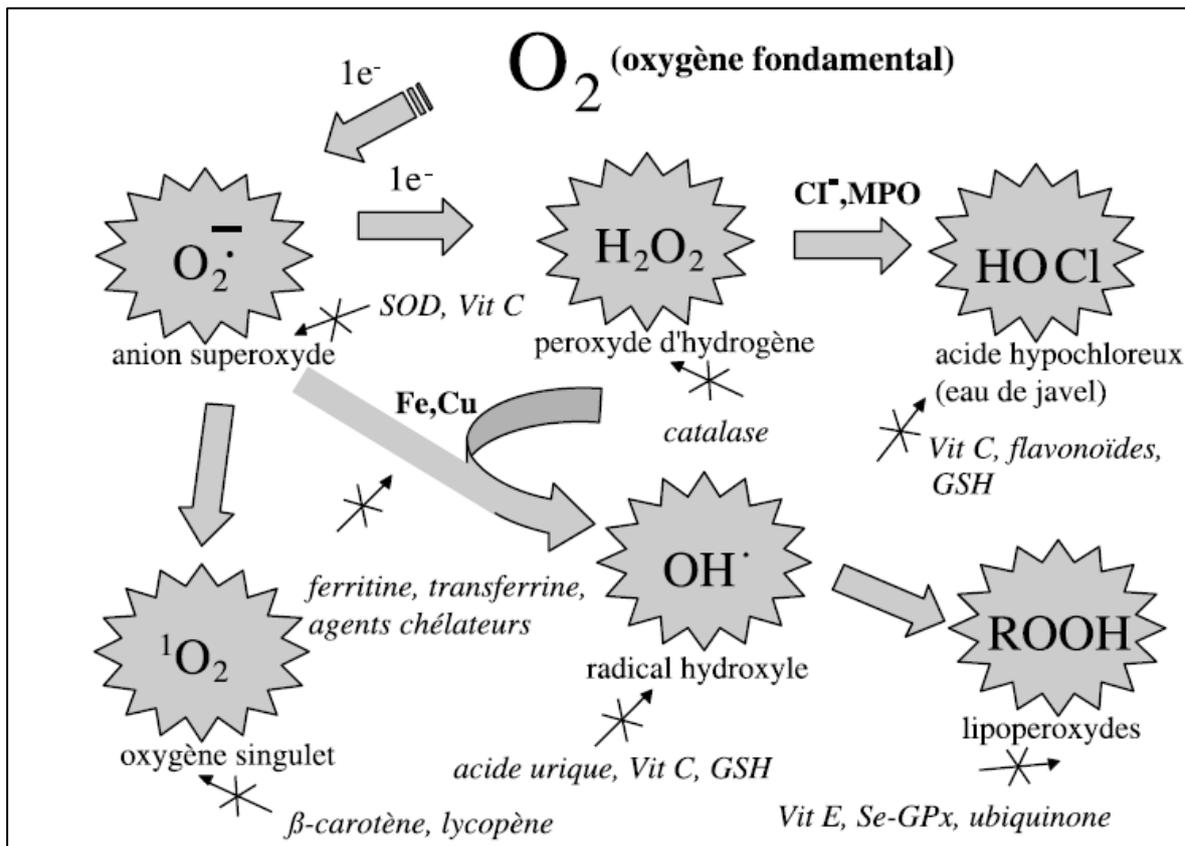


Figure 4. Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants (D'après Pincemail et al., 2002).

I.1.5.1. Systèmes enzymatiques

Il s'agit principalement de trois enzymes ; (i) la superoxyde dismutase (SOD), (ii) la catalase (CAT) et (iii) la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont une action

complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du $O_2^{\bullet-}$ et du H_2O_2 , conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire (Lehucher-Michel *et al.*, 2001).

a) La superoxyde dismutase :

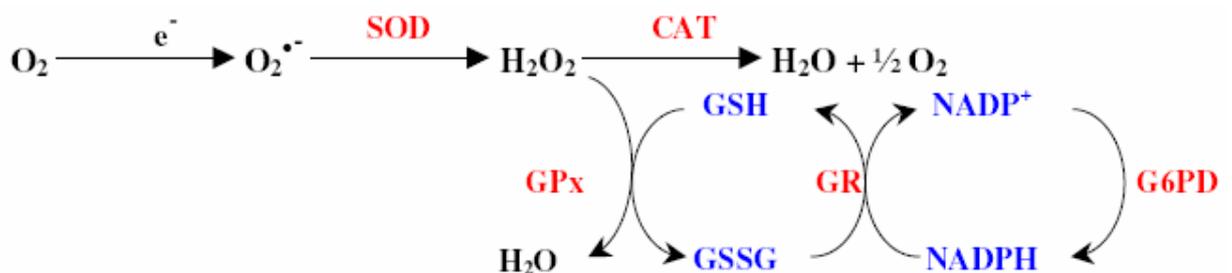
Comme l'indique son nom, la superoxyde dismutase (SOD) accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, Il existe plusieurs isoenzymes de SOD ; SOD ferreux (Fe-SOD), SOD à cuivre (Cu-SOD) et SOD à manganèse (Mn-SOD) qui diffèrent selon la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire (Zelko *et al.*, 2002).

b) La catalase :

Présente en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques. Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (Sorg, 2004).

c) Les glutathions peroxydases et réductases :

Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. La glutathion peroxydase est une sélénoenzyme (Se-GPx) qui joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultants de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de ces dérivés réactifs avec l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH). La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG tout en utilisant le NADPH comme un cofacteur (Martínez-Cayuella, 1995 ; Sorg, 2004). Au total, le mécanisme réactionnel invoqué dans cette détoxification enzymatique peut être résumé dans le schéma suivant :



I.1.5.2. Systèmes non enzymatiques

Ce groupe de systèmes anti-oxydants renferme de nombreuses substances endogènes parmi lesquelles on peut citer le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, la mélanine, la mélatonine, l'acide lipoïque. De tous ces composés endogènes synthétisés par les cellules, le plus important est sans doute le glutathion réduit (thiol majeur au niveau intracellulaire) (Favier, 2003). La bilirubine est, quant à elle, capable de piéger les radicaux peroxydes et l'oxygène singulier, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (Neuzil et Stocker, 1993).

Les protéines chélatrices de métaux de transitions comme l'haptoglobine, la ferritine, l'albumine et la céruloplasmine agissent en diminuant la disponibilité d'agents pro-oxydants, comme les ions Fe^{2+}/Fe^{3+} ou Cu^{2+}/Cu^{+} permettant par ce biais de prévenir la production des radicaux libres par la réaction de Fenton (Martínez-Cayuela, 1995).

D'autres substances exogènes apportées par l'alimentation, telles que les vitamines E (tocophérol), C (acide ascorbique), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes agissent en piégeant les radicaux et en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules stables (Pincemail *et al.*, 2002 ; Koechlin-Ramonatxo, 2006). La vitamine piégeuse devient à son tour un radical qui sera détruit ou régénéré par un autre système. A titre d'exemple, la vitamine E est régénérée par la vitamine C, elle-même régénérée par les ascorbates réductases (Pincemail *et al.*, 2002). Des composés comme les alcaloïdes, les polyphénols et les phytates, huiles essentielles (Bruneton, 1999). Flavonoïdes (Pietta, 2000 ; Cotelle, 2001) apportés également par l'alimentation, jouent un rôle similaire de piégeurs de radicaux libres (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

I.2. LES FLAVONOÏDES COMME ANTIOXYDANTS

Les flavonoïdes représentent une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols, ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux, dont plusieurs sont responsables de couleur vive des fleurs, des fruits et des feuilles (Pietta, 2000 ; Ghedira, 2005).

I.2.1. Structure et classification des flavonoïdes

De nos jours, plus de 8000 flavonoïdes ont été identifiés. Ils ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones, constitué de deux unités aromatiques; deux cycles en C₆ (A et B), reliés par un hétérocycle en C₃ (**Figure 5**) (Bruneton, 1999; Pietta, 2000). Structuralement les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules selon le degré d'oxydation et la nature des substituants portés sur le cycle C (Pietta, 2000), 14 groupes différents ont été identifiés dont six groupes sont particulièrement les plus répandus et les mieux caractérisés ; flavones, isoflavones, flavanones, flavanols, flavonols, anthocyanidines (Heim *et al.*, 2002 ; Hendrich., 2006) (**Tableau 3**).

Les composés de chaque classe se distinguent entre eux par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres. . .) sur les deux cycles aromatiques A et B (Heim *et al.*, 2002). Dans les flavonoïdes au sens strict, le deuxième cycle benzène (B) se lie à l'hétérocycle (C) en position 2. Lorsque la liaison s'effectue en position 3, les composés résultants sont appelés isoflavonoïdes. En plus, l'hétérocycle (C) peut être une pyrone (flavone) ou son dihydrodérivé (flavanone). La fixation d'un groupement hydroxyle (OH) sur le carbone 3 dans les deux cas précédents constitue respectivement les flavonols et les flavanonols (Birt *et al.*, 2001). À l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylés. La partie du flavonoïde autre que le sucre est appelée aglycone ou génine, l'unité glycosidique la plus commune est le glucose mais par fois elle peut être glucorhamnose, galactose, arabinose ou rhamnose (Heim *et al.*, 2002).

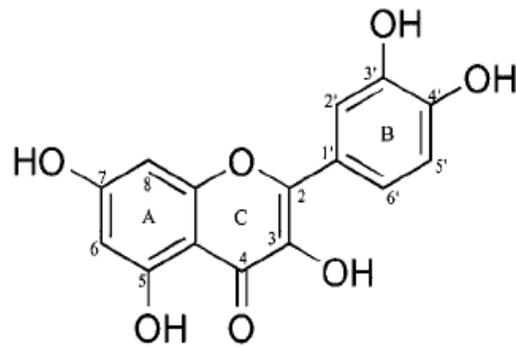


Figure 5. Structure générale du noyau des flavonoïdes

(D'après Heim et al., 2002)

Tableau 3. Structure chimique de certains flavonoïdes représentatifs de chaque classe

(D'après Heim et al., 2002)

Classe	structure générale	flavonoïdes typiques	Substituants
Flavanol		(+)-catechin (-)-epicatechin Epigallocatechin gallate	3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4',5'-OH,3-gallate
Flavone		chrysin apigenin rutin luteolin luteolin glucosides	5,7-OH 5,7,4'-OH 5,7,3',4'-OH, 3-rutinoses 5,7,3',4'-OH 5,7,3'-OH, 4'-glucose 5,4'-OH, 4',7-glucose
Flavonol		kaempferol quercetin	3,5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH
		myricetin tamarixetin	3,5,7,3',4',5'-OH 3,5,7,3'-OH,4'-OMe
Flavanone (dihydroflavon)		naringin naringenin taxifolin eriodictyol hesperidin	5,4'-OH,7-rhamnoglucose 5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 5,7,3',4'-OH 3,5,3'-OH,4'-OMe, 7-rutinoses
Isoflavone		genistin genistein daidzin daidzein	5,4'-OH, 7-glucose 5,7,4'-OH 4'-OH, 7-glucose 7,4'-OH
Anthocyanidin		apigenidin cyanidin	5,7,4'-OH 3,5,7,4'-OH,3,5-OMe

1.2.2. Localisation, distribution et biodisponibilité des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires des plantes. Ces molécules ont été identifiées dans presque toutes les parties de la plante : les feuilles, les racines, les tiges, les fleurs, les graines et l'écorce (Lee *et al.*, 1994). Les flavonoïdes sont trouvés dans les fruits, les légumes, les noix, les herbes, les épices, aussi bien que dans le thé et le vin rouge. Ils sont consommés régulièrement avec l'alimentation humaine qui nous apporte environ 75 mg de flavonoïdes par jour. En effet, le thé, les agrumes, les pommes, l'huile d'olive, les oignons, le cacao et plusieurs autres fruits et légumes sont très riches en flavonoïdes, les flavanols et les flavonols y seraient les plus abondants (Schewe et Sies, 2003).

La majorité des flavonoïdes apportés par l'alimentation sont sous forme glycosylée, ils peuvent occasionnellement y être présents sous forme aglycone (Ishii *et al.*, 2003). La plus part des flavonoïdes aglycones sont hydrophobes et peuvent donc traverser passivement les membranes biologiques. Alors que la liaison d'un groupement glucidique à un composé phénolique diminue son hydrophobicité et limite sévèrement sa diffusion passive (Williamson *et al.*, 2000). Il semblait alors que l'absorption des flavonoïdes glycosylés ne pouvait pas avoir lieu au niveau de l'intestin grêle. Cependant, Hallman et ses collaborateurs (1995 et 1997) ont montré chez l'Homme que l'absorption des formes glycosylées de la quercétine administrées oralement étaient plus importantes (52%) que celle de la quercétine aglycone (24%). Ces auteurs ont alors suggéré que la partie glucidique associée aux flavonoïdes facilite leur passage dans les entérocytes *via* le système de transport des glucides (Hallman *et al.*, 1997).

1.2.3. Effets biologiques et pharmacologiques des flavonoïdes

Etant de distribution ubiquitaire au sein des végétaux, les flavonoïdes pourraient être à l'origine des vertus préventifs et curatifs de plusieurs plantes médicinales. La principale propriété, initialement attribuée aux flavonoïdes, est d'être vasculoprotectrices et venotoniques, car ils sont capables de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance (Bruneton, 1999). Actuellement, les flavonoïdes sont connus par de remarquables activités pharmaco biologiques comme entre autres des effets, antivirales, antimicrobiens et anticancéreux (Narayana *et al.*, 2001 ; Seyoum *et al.*, 2006) antiallergiques, anti-inflammatoires, anti-thrombotiques, anti-tumoraux et hépato

protecteurs (Middleton *et al.*, 2000). Ces activités sont attribuées en partie aux propriétés anti-oxydantes de ces composés naturels.

I.2.4. Activité antioxydante des flavonoïdes

Ces dernières années, une importance particulière a été accordée aux propriétés antioxydantes des flavonoïdes qui sont attribuées à; (i) leur capacité de piéger directement les RL, (ii) de chélater les ions métalliques impliqués dans la production des EOR *via* les réactions de Fenton et Haber-Weiss, (iii) d'inhiber quelques enzymes en particulier les oxydases, (iv) d'activer les enzymes antioxydantes et (v) de réduire les radicaux α -tocophéryl (Cotelle 2001; Lin et Weng.,2006 ; Heim *et al.*, 2002).

I.2.4.1. Piégeage direct de radicaux libres

Les flavonoides possèdent une structure chimique aromatique permettant une délocalisation électronique importante, donc une stabilisation de leurs formes radicalaires. À cause de leur faible potentiel redox (Javanovic *et al.*, 1994), les flavonoïdes (Flav-OH) sont thermo dynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants (R^{\bullet}) comme le superoxyde, le radical peroxyde, le radical alkoxyde et le OH^{\bullet} par transfert d'hydrogène (Figure 6).

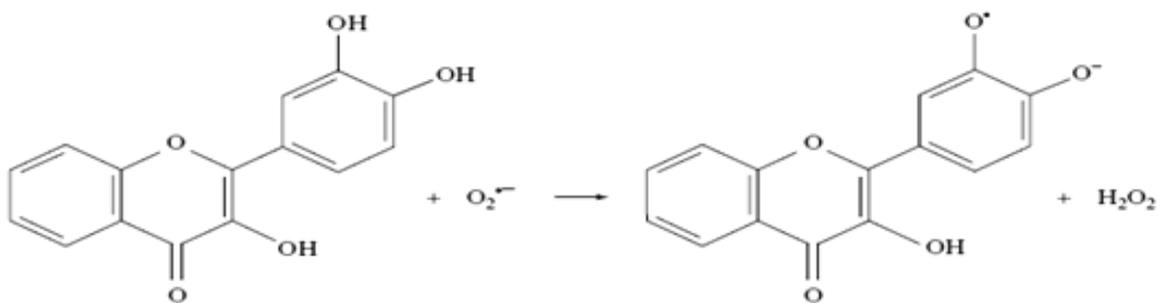
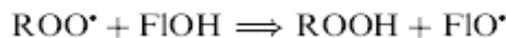
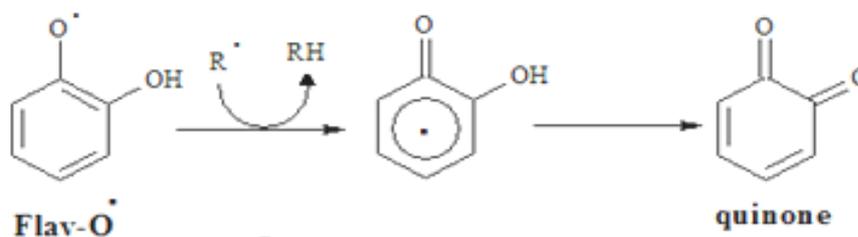


Figure 6. Réaction des flavonoïdes avec les EOR

(D'après Densiov et Afanas'ev, 2005)

Le radical aroxyde résultant (Fl-O[•]) peut réagir avec un autre radical libre pour former une structure quinone stable.



En outre, le radical aroxyde peut interagir avec l'oxygène pour donner une quinone et un anion superoxyde. Cette réaction qui peut prendre place en présence de taux élevés de métaux de transition, est responsable de l'effet prooxydant indésirable des flavonoïdes (McCord, 1995). La capacité des flavonoïdes d'agir comme antioxydants dépend donc, non seulement du potentiel redox du couple Flav- O[•]/Flav-OH, mais aussi de la réactivité du radical aroxyde. (Rice-Evans, 2001).

De nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des flavonoïdes et leur pouvoir piègeur (scavenger) des radicaux libres (Jovanovic, 1994 ; Van Acker, 1996 ; Rice-Evans, 1996 ; Cotelle, 1996 ; Cos, 1998 ; Pietta, 2000 ; Seyoum *et al.*, 2006). Ces travaux ont pu conclure que les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les critères suivants :

- i)** La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) qui confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons (la substitution de ces groupements hydroxyles sur le cycle B par des groupements méthoxyles altère le potentiel redox et donc la capacité radical scavenger des flavonoïdes) (Hendrich., 2006 ; Balasundram, 2006)
- ii)** La double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo sur le cycle C augmente la capacité radical scavenger des flavonoïdes (Balasundram., 2006).
- iii)** La présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3 augmente également la capacité radical scavenger des flavonoïdes (la substitution du groupement 3-OH conduit à l'augmentation de l'angle de torsion et une perte de la coplanarité conduisant ainsi à la réduction de l'activité antioxydante) (Balasundram, 2006).

I.2.4.2. Chélation des ions métalliques

Les ions du fer (Fe^{2+}) et du cuivre (Cu^{2+}) sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques. Ils peuvent être, soit des constituants des hémoprotéines, soit des cofacteurs des différentes enzymes du système de défense antioxydant (par exemple, Fe pour la catalase, Cu pour la ceruloplasmine, Cu et Zn pour la superoxyde dismutase). Mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon les réactions de Fenton et Haber Weiss (Cottelle., 2001). Les flavonoïdes sont considérés comme de bons chélateurs de ces ions métalliques (Morris, 1995 ; Brown, 1998). Les études menées par Van Acker et ses collaborateurs (1996) sur la chélation du fer par certains flavonoïdes, ont pu ressortir les sites potentiels pour la chélation des ions métalliques (**Figure 7**); (i) un noyau catéchol sur le cycle B, (ii) les groupes 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C, et (iii) les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles A et C (Pietta, 2000 ; Heim *et al.*, 2002).

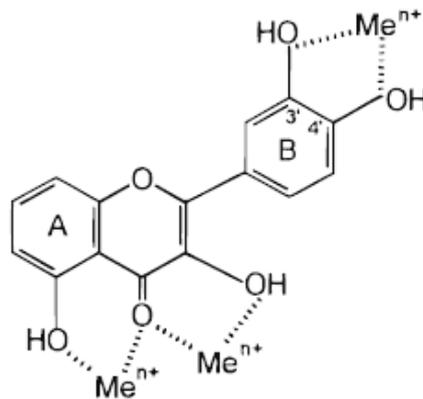


Figure 7. Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques (D'après Pietta, 2000).

I.2.4.3. Inhibition enzymatique

Les flavonoïdes sont capables d'inhiber une large gamme d'enzymes génératrices du $\text{O}_2^{\bullet-}$ et d'autres EOR, comme la xanthine oxydase, la protéine kinase C, la cyclooxygénase, lipoxygénase, monooxygénase microsomal, et la glutathion S-Transferase. Les flavonoïdes ayant une moitié catéchol sur le cycle B inhibent la succinoxidase mitochondriale et la NADH oxydase (Pietta, 2000 ; Densiov et Afanas'ev, 2005).

a) Inhibition de la xanthine oxydase

Depuis 1968, quand McCord et Fridovich ont démontré la participation de la xanthine oxydase (XO) dans la génération des radicaux libres, l'intérêt aux nouvelles propriétés de cette enzyme s'est considérablement accru. Son rôle dans la génération des EOR dans plusieurs pathologies a été largement étudié. L'allopurinol est le seul inhibiteur de la XO utilisé en clinique pour contrôler la production de l'acide urique dans la goutte et l'hyperuricémie (Rundles *et al.*, 1966 ; Klinenberg, 1965). Cependant, la toxicité sévère de l'allopurinol a été rapportée (Young *et al.* 1974). Pour cela, la recherche de nouveaux inhibiteurs dépourvus d'effets indésirables est toujours d'actualité. Les composés phénoliques d'origine naturelle, comme les flavonoïdes, semblent être des inhibiteurs prometteurs de la xanthine oxydase. Plusieurs études sur des polyphénols naturels (surtout les flavonoïdes), sous forme de plantes entières ou extraits purifiés, ont montré qu'ils peuvent être une source importante d'inhibiteurs de la XO. Cos et ses collaborateurs (1998) ont mesuré l'activité d'une trentaine de flavonoïdes sur la production de l'acide urique par la XO. Ils ont ainsi déterminé la relation entre la structure chimique des flavonoïdes et leur activité inhibitrice de la XO. Ces chercheurs ont montré que seuls les flavonols et les flavones ont la capacité d'inactiver l'enzyme, ceci montre l'importance de la double liaison C2-C3 dans l'inhibition de la XO. Cette double liaison et la conjugaison qu'elle induit, entraîne la coplanarité du cycle B avec les cycles A et C. Des études ultérieures menées par Danny *et al* (2002) montrent clairement l'importance de cette structure plane dans l'inhibition de la xanthine oxydase. En comparant les activités des flavones et de leurs analogues flavonols, cos *et al* (ont constaté que l'absence du groupe hydroxyle en C-3 augmente légèrement l'activité. Ils ont montré également que le cycle B n'a que peu d'influence sur cette inhibition et que les flavonoïdes glycosylés ont des activités inférieures à celles des composés non glycosylés.

I.3. LA PLANTE *Nigella sativa* L.

I.3.1. Généralités

Du latin *nigellus* "noirâtre", la nigelle nous offre ses petites graines aromatiques menées d'un noir 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 L est une plante herbacée appartenant à la famille des Renonculacées (Guignard, 2001). C'est une herbe originaire du moyen orient, de l'Europe centrale et de l'ouest de l'Asie, elle est maintenant cultivée dans plusieurs régions du monde surtout dans le bassin méditerranéen et en Inde. Elle se développe sur les terres semis arides au sein de communautés naturelles où prédominent les thérophytes (Antuono et hamaza., 2002 ; Badary *et al.*, 2003), Traditionnellement utilisée dans les pays arabes, dans le sous-continent indien et en Europe depuis des millénaires à des fins culinaires et médicinales. C'est un remède naturel pour de nombreuses pathologies, notamment pour le traitement de l'asthme, de l'inflammation, de la toux, de l'eczéma et des états grippaux. La graine ou l'huile qui en est issue est employée comme diurétique, carminatif, cholagogue et vermifuge (Ghedira, 2006). Leur popularité était raisonnée par la croyance idéologique de pouvoir guérir plusieurs maladies. En fait, cette plante a occupé une place spéciale pour son grand spectre d'application médicale dans la civilisation islamique, dû au proverbe du Prophète Mohamed (salut et miséricorde 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.

I.3.2. Aspect botanique de *Nigella sativa* L

Nigella sativa est une plante annuelle herbacée atteignant 30 à 60 cm de haut. 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 (Bonnier, 1990 ; Ghedira, 2006). Les fleurs sont petites à pétales blanchâtres et sépales pétaloïdes et présentent de nombreuses étamines insérées sur le réceptacle (Ghedira, 2006). La plante est hermaphrodite à reproduction autonome dont le fruit est une capsule formée de 3 à 6 carpelles soudés entre eux jusqu'à la base des styles persistants (Bonnier, 1990). Chaque capsule contient plusieurs graines triangulaires

blanchâtres et à maturité, elles s'ouvrent et l'exposition des graines à l'air les rend noire, ses graines sont ovoïdes de 2 à 3.5 mm présentent 3 à 4 angles avec une face supérieure finement granuleuse et réticulée (Ghedira, 2006) (**Figure 8**).

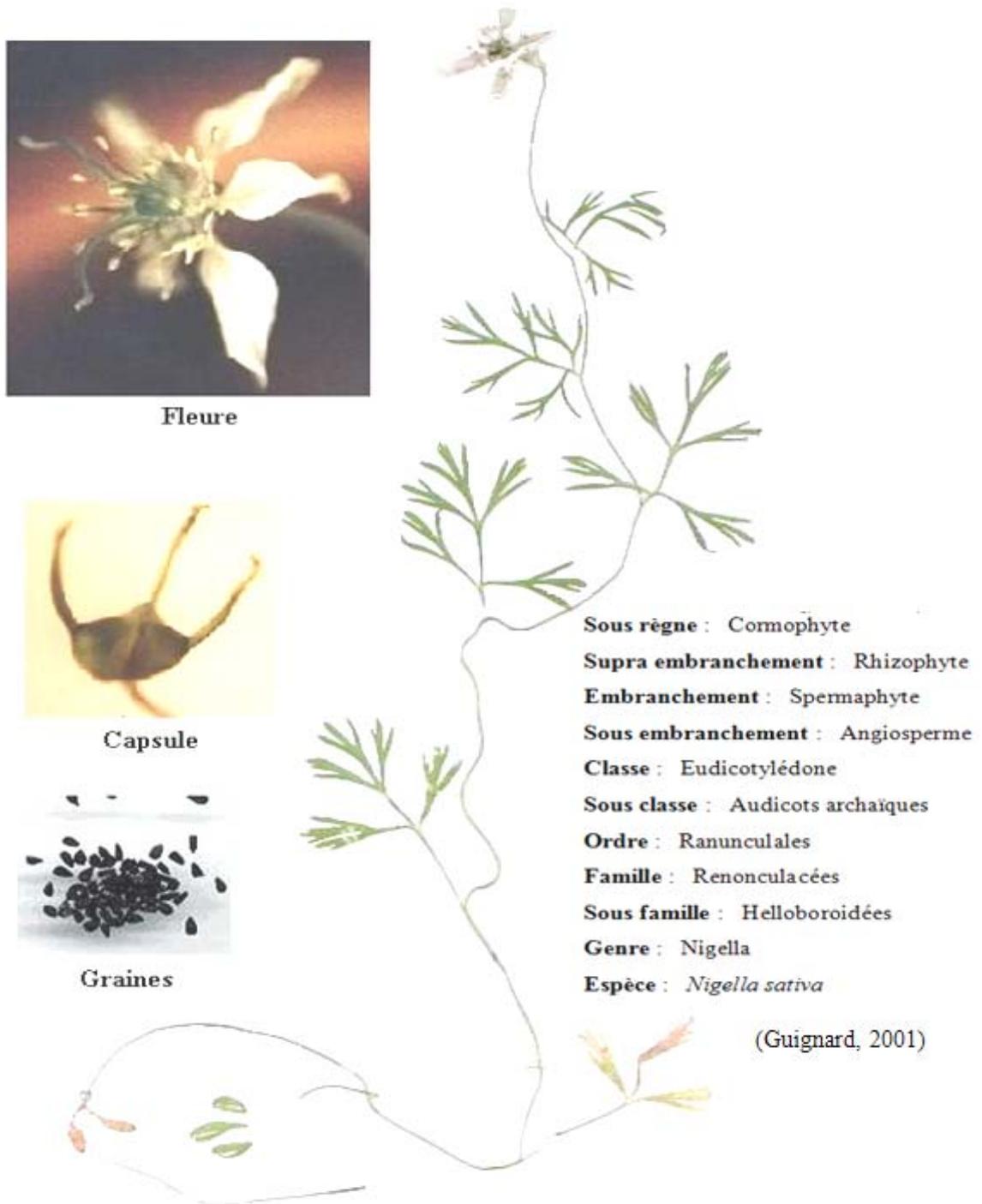


Figure 8. Aspect morphologique de la plante *Nigella sativa*
(Cultivée et photographiée au sein de notre laboratoire).

I.3.3. Composition chimique des graines de *Nigella sativa*

En raison de leur large domaine d'usage médicinal, les graines de *Nigella sativa* ont fait l'objet de plusieurs études phytochimiques intensives dans le but d'identifier ses principes actifs. Ces études ont révélé que ces graines sont très riches en plusieurs constituants tant de métabolites secondaires que primaires, dont la teneur varie selon les conditions géographiques et climatiques, ainsi que les méthodes d'études (extraction et détection).

a) L'huile fixe : Représente 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). L'analyse des phospholipides (PL) par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a permis d'identifier principalement sept constituants; phosphatidyl choline (46% des PL), phosphatidyl éthanolamine (25%), phosphatidyl sérine (12%), phosphatidyl inositol (9,56%), lysophosphatidyl choline (4,23%), phosphatidyl glycérol (1,51%) et lysophosphatidyl éthanolamine (1,2%) (Ramadan et Mörsel, 2002a). Une étude complémentaire sur les glycolipides de *Nigella sativa* a permis de séparer et d'identifier six composés dont le plus abondant est le digalactosyl diacyl glycérol qui forme 55,6% des glycolipides totaux (Ramadan et Mörsel, 2003). L'analyse phytochimiques de deux variétés des graines *Nigella sativa* (provenant d'Iran et de Tunisie) montre que le principal acide gras insaturé est l'acide linoléique suivi par l'acide oléique, alors que l'acide gras saturé majoritaire est l'acide palmitique. La présence d'autres acides gras ; myristoleique, palmitoleique, margarique, arachidique, eicosenoïque, behénique, lignocérique à été également détectée (Cheikh-Rouhou *et al.*, 2007). Ces résultats correspondent bien avec ceux trouvés par Nickavar et ses collaborateurs (2003). Ultérieurement Cheikh-Rouhou et collaborateurs, (2008) ont mis en évidence la richesse de l'huile de la Nigelle en stérols (17,41-42,66% de la matière insaponifiable), dont le β -sitostérol est le plus abondant (44-54%), suivi par le stigmastérol (16.57–20.92%), Δ^7 -stigmasterol, Δ^7 -avenasterol et le cholestérol qui sont également détectés mais à des taux plus faibles.

b) L'huile essentielle : Représente entre 1,4–1,9% du poids de l'huile fixe et 0,18 à 0,50% du poids des graines (Benkaci-Ali *et al.*, 2006). L'analyse de cette huile par GC-MS réalisée par Burits et Bucar (2000) a permis d'identifier 32 composants, dont la majorité

d'entre eux sont des monoterpènes ; 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 t-anethol (0,25-4,28%). Contrairement à l'étude précédente, Moretti et ses collaborateurs (2004) ont trouvé que le composant majeur est le p-cymène suivi du thymol alors que la thymoquinone présente un taux faible. Récemment, L'huile essentielle de *Nigella sativa* cultivée au Sahara algérien (Timimoune et Adrar), extraite par deux méthodes différentes ; l'hydrodistillation et distillation par micro-onde a été analysée par 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 (Benkaci-Ali *et al.*, 2007).

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

d) Les triterpènes saponines : Dans une étude réalisée par Kumara et Huat (2001) il a été possible d'isoler et de caractériser à partir des graines de *Nigella sativa* une saponoside triterpénique douée de propriétés antitumorales appelée l' α -hederine. Une étude ultérieure de Taskin et collaborateurs (2005) a permis d'isoler à partir de l'extrait méthanolique trois autres saponosides apparentées à l' α -hederine, avec l'élucidation de leurs structures par des méthodes chimiques et spectrales ; 3-O- β -D-xyl(1-3)- α -L-rha-(1-2)- α -L-ara-28-O- α -L-rha(1-4)- β -D-glu(1-6)- β -D-glu-hédéragénine, 3-O- α -L-rha-(1-2)- α -L-ara-28-O- α -L-rha(1-4)- β -D-glu(1-6)- β -D-glu-hédéragénine, 3-O- β -D-xyl(1-3)- α -L-rha-(1-2)- α -L-ara-hédéragénine.

e) Les flavonoïdes : Trois flavonoïdes triglycosylés ont été isolés à partir des graines de *Nigella sativa*; la quercétine 3-glycosyl(1 \rightarrow 2) galactosyl(1 \rightarrow 2) glucoside, kœmpférol 3-glycosyl(1 \rightarrow 2) galactosyl(1 \rightarrow 2) glucoside et quercétine 3-(6-feruloglucosyl)(1 \rightarrow 2) galactosyl(1 \rightarrow 2) glucoside (Merfort *et al.*, 1997).

f) Les protéines : Les graines de *Nigella sativa* sont très riches en protéines (environ 16 %), avec dominance de l'acide glutamique (22,4%), d'acide aspartique (10,05%) et

d'arginine (9,18%) (Al-Gaby, 1998). Le fractionnement de ces derniers par SDS-PAGE montre des bandes de poids moléculaire compris entre 10 et 94 KDa (Haq *et al.*, 1999). La protéine la plus étudiée jusqu'à maintenant est la lipase qui catalyse des réactions de transestérification (Tuter *et al.*, 2003). L'analyse des acides aminés de l'hydrolysat de ces protéines révèle la présence de 17 acides aminés y compris les 8 acides aminés essentiels (Al-Jassir, 1992 ; Salem, 2005 ; El-Obeid *et al.*, 2006).

g) Les vitamines et les sels minéraux : La composition en vitamines a été déterminée et révèle la présence des vitamines B₁, B₂, B₆, PP et de l'acide folique (Nergiz et Ötles, 1993). Ramadan et Mörsel (2002b) ont analysé les vitamines liposolubles de *Nigella sativa* et ont pu identifier toutes les classes des tocophérols dans l'huile. Les tocophérols totaux constituent 0,05% de l'huile, et sont constitués majoritairement de l' α -tocophérol (48%) et 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, Al-Saleh et son équipe (2006) ont affirmé après analyse par HPLC que les teneurs en α et γ -tocophérols sont relativement élevées: de 5, 65 à 11,39 et de 2, 26 à 6,95 mg/kg respectivement alors que celle de all-trans-rétinol est très faible de 0 à 0,54 mg /kg des graines. Des travaux sur la composition minérale de la graine de *Nigella sativa* ont rapporté que sa teneur en potassium est importante (1.18 % de poids total de la graine) et que le calcium, le fer, le sodium représentent 0. 188, 0. 0575 et 0. 0853 % respectivement (Nergiz et Otles, 1993), la teneur des graines en sélénium a été également déterminée, elle représente 0,27-0,54 mg/kg des graines (Al-Saleh et al 2006).

1.3.4. Propriétés pharmacologiques des graines de *Nigella sativa*

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

a) Effets sur le système immunitaire

Les graines de *Nigella sativa* présentent *in vitro* des propriétés immunopotentialisatrices des lymphocytes T humains (EL-Kadi *et al.*, 1987). Confirmées par Haq *et al.* (1995), qui ont montré que les graines activent la sécrétion d'IL-3 et augmente la

production d' l'IL-1 β par les lymphocytes T, ce qui indique un effet stimulateur sur les macrophages, soit direct ou via IL-1 β .

Des études ultérieures conduites par les mêmes auteurs (Haq *et al*, 1995) ont montré que les protéines isolées de la graine entière sont responsable d'effet stimulant sur la production de cytokine (TNF- α) ainsi que la prolifération des lymphocytes en culture. Salem et Hussain (2000) ont rapporté que *Nigella sativa* stimule également la production de l'INF- γ et la prolifération des macrophages et des lymphocytes T₄ *in vivo*. Ces résultats sont en concordance avec les travaux de Swamy et Tan. (2000), qui ont montré, qu'en présence de doses optimales de mitogènes, l'extrait d'acétate d'éthyle possède un effet cytotoxique très important sur différentes cellules cancéreuses qui est accompagné d'une potentialisation significative de la réponse immune, mais dont le mécanisme d'action n'est pas encore élucidé. D'autre part, la plupart des sujets qui ont été traités par l'huile de *Nigella sativa* pendant quatre semaines ont montré une augmentation de 55% des cellules CD4 et CD8, et 30% des cellules naturel killer (NK) (Salem, 2005).

Nigella sativa a été traditionnellement utilisée dans le traitement des maladies allergiques. Cette action ne fait pas intervenir les cellules LTh1 et LTh2 en réponse à un stimuli allergique (Büyüköztürk *et al.*, 2005). D'autres voies peuvent être impliquées comme l'inhibition de la libération d'histamine des mastocytes activés par diminution du taux du calcium intracellulaire et inhibition de la protéine kinase C (Chakravarty, 1993).

b) Effets anti-inflammatoire et analgésique

Plusieurs auteurs ont étudié l'éventuelle activité analgésique et anti-inflammatoire d'extraits ou de composés purs issus de *Nigella sativa*. Khanna *et al* (1993) ont montré que l'huile fixe de *Nigella sativa* possède une importante action antinociceptive qui est dûe à la présence d'un principe opioïde. Cette action est antagonisée par la naloxone. Des études plus approfondies ont démontré que l'action antinociceptive peut être également engendrée par la thymoquinone aussi bien que l'huile fixe par activation indirecte des récepteurs superspinaux μ et κ (Abdel-Fattah *et al.*, 2000 ; Ali et Blunden, 2003).

Ghannadi *et al* (2005) ont montré que les polyphénols de *Nigella sativa* disposent de propriétés anti-inflammatoire chez le rat et la souris dans le test de l'œdème de la pâte induit par le carragénane, et montre des propriétés analgésiques dans le test de la fomaline et de l'acide acétique. Le mécanisme par lequel l'huile fixe de *Nigella sativa* et la

thymoquinone exercent leurs effets anti-inflammatoires a été étudié, la thymoquinone s'est avérée être un puissant inhibiteur de la synthèse des eicosanoïdes notamment la thromboxane B2 et leucotriène B4 par l'inhibition respective des cycloogénase et lipoxygénase. Cependant, l'activité de l'huile fixe sur ces deux enzymes est plus importante que la thymoquinone elle même ; l'activité anti-inflammatoire n'est pas donc entièrement due à la présence de la thymoquinone ; des acides gras insaturés de type C₂₀:2 semblent être impliqués (Houghton *et al.*, 1995 ; Gilani *et al.*, 2004).

c) Activité anti-microbienne

Les différents extraits des graines de *Nigella sativa* présentent un large spectre d'inhibition vis-à-vis de nombreuses souches bactériennes. L'huile essentielle même diluée à 1%, la dithymoquinone ainsi que l'extrait méthanolique exercent une importante activité antimicrobienne sur des germes Gram positif et Gram négatif, (Agrawal *et al.*, 1979 ; Aljabre *et al.*, 2005). L'huile de la Nigelle possède également un pouvoir inhibiteur supérieur à celui de la gentamicine sur une vingtaine de souches de *Listeria monocytogenes* (Nair *et al.*, 2005). Différents extraits bruts issus de la graine ont été testés vis-à-vis de germes antibiorésistant (16 Gram négatifs et 6 Gram positifs), les alcaloïdes totaux et le décocté se sont révélés être les extraits les plus actifs, notamment à l'égard des bactéries à gramme positif (Morsi, 2000). De même, L'extrait méthanolique et hexanique possèdent aussi un effet inhibiteur très considérable sur *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* (Mashhadian et Rakhshandeh., 2005). L'huile fixe présente également une excellente activité antifongique, notamment sur *Aspergillus niger* (Agrawal *et al.*, 1979). Par ailleurs, l'extrait à l'éther et la thymoquinone exercent une activité inhibitrice sur huit espèces de dermatophytes (Aljabre *et al.*, 2005). En plus des activités antibactériennes et antifongiques, l'huile de *Nigella sativa* possède aussi un effet antiviral vis-à-vis de virus de l'herpes : cytomégalovirus murin (MCMV) (Salem, 2005), des propriétés anti-cestodales et anti-nématiques comparables à celles de la pipérazine (antiparasitaire) (Agrawal *et al.*, 1979).

d) Effets anticancéreux et antimutagène

L'activité anti-tumorale des extraits ou de composés isolés de *Nigella sativa* a été testée par plusieurs auteurs. L'extrait méthanolique brut préparé à partir des graines de *Nigella sativa* présente une importante action cytotoxique sur le carcinome ascitique d'Ehrlich et sur le lymphome ascitique de Dalton tout en exerçant une cytotoxicité

minimale vis-à-vis des lymphocytes normaux (Musa *et al.*, 2004 ; Ghedira, 2006). L'extrait décocté des graines de *Nigella sativa* exerce une forte activité cytotoxique sur les cellules hépatiques cancéreuses, notamment sur la synthèse d'ADN (Thabrew *et al.*, 2005). Iddamaldeniya et ses collaborateurs 2003 ont montré que Le traitement des souris atteintes d'un cancer hépatique initié par diéthylnitrosamine (DEN), avec le décocté des graines de *Nigella sativa* pendant 10 semaines, réduit significativement le nombre de cellules atteinte/cm², ce qui indique que cet extrait a un effet protecteur contre ces cancers hépatiques induits par le DEN. Différents extraits de *Nigella sativa* ; l'huile essentielle, l'extrait d'acétate éthyle et celui du butanol, ont été testés sur différents tissus cancéreux (murine mastocytoma, kidney carcinoma, sheep heart carcinoma). L'huile essentielle a montré un effet cytotoxique le plus important sur les trois lignées cellulaires suivi de l'extrait d'acétate éthyle, alors que celui du butanol présente un effet moindre (Ait-Mbarek *et al.*, 2007). D'autre part, L'huile essentielle de *Nigella sativa* est capable d'inhiber la carcinogénèse du colon au stade post initiation chez la souris traitée par voie orale sans effets secondaires, cette inhibition est associée à la suppression de la prolifération cellulaire dans la muqueuse du colon (Salim et Fukushima., 2003). *In vitro*, la thymoquinone et la dithymoquinone sont très cytotoxiques contre différentes lignées de cellules tumorales humaines : adénocarcinome pancréatique, sarcome utérine et la leucémie. Ils provoquent l'apoptose en bloquant le cycle cellulaire en phase G1, en augmentant le temps d'expression de p53 et en inhibant la protéine anti-apoptique Bcl-2 en même temps (Salem, 2005). 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 exerce *in vitro* et *in vivo* un effet inhibiteur de la carcinogénèse de l'estomac et du fibrosarcome induit par 20-méthylcholanthrène chez la souris (Badary *et al.*, 1999 ; Badary et Gamal, 2001). Par ailleurs, Kumara et Huat (2001) ont montré que l' α -hederine exerce d'importantes propriétés antitumorales chez la souris présentant un sarcome du poumon de Lewis ou la leucémie murine P388. De même, l'huile des graines de *Nigella sativa* réduit le potentiel fibrinolytique des cellules tumorales lié à leur phénotype de malignité. Cette action conduit à l'inhibition des invasions tumorales locales et de la métastase (Awad, 2005).

e) Effets sur le système gastro-intestinal

Les graines de *Nigella sativa* sont largement utilisées dans la médecine traditionnelle pour le traitement des désordres gastro-intestinaux, L'extrait aqueux des graines réduit de

36% l'indice d'ulcère induit par l'acide acetylsalicylique (aspirine) et diminue l'activité peptique et la production d'acide chez le rat (Ghedira, 2006). Il a été démontré que l'administration de L'huile fixe à raison de 0.88g/kg/jours pendant deux semaines augmente la mucine gastrique et le contenu en glutathion et avec diminution du taux de l'histamine, sans affecter l'acidité libre ni le suc gastrique (El-Dakhakhny *et al.*, 2000). Cette huile ainsi que la thymoquinone protègent contre les lésions gastriques, induites par le processus d'ischémie-réperfusion, grâce à leur pouvoir anti-radicalaire (El-Abhar *et al.*, 2003). L'extrait alcoolique des graines de *Nigella sativa* présente également une activité anti-ulcéreuse qui a été attribuée aux flavonoïdes qu'il contient (Raj Kapoor *et al.*, 2002). De même, l'extrait méthanolique montre un effet spasmolytique ce qui confirme l'utilisation traditionnelle de la Nigelle dans le traitement des diarrhées (Gilani *et al.*, 2004).

f) Effets sur le système respiratoire

Les propriétés anti-tussives et antiasthmatiques des graines de *Nigella sativa* sont bien reconnues depuis des siècles, faisant d'elle une des plantes les plus recommandées pour le traitement des maladies respiratoire, cette activité de *Nigella sativa* a été étudiée par un grand nombre de chercheurs. En 1993, El Tahir *et al* ont prouvé que l'administration intraveineuse des huiles essentielles de *Nigella sativa* est responsable d'une augmentation dose dépendante du quotidien respiratoire et de la pression intra trachéal chez le cobaye. Gilani et ses collaborateurs (2001) ont montré que l'extrait brut méthanolique des graines de *Nigella sativa* a un effet spasmolytique et broncho-dilatateur avec implication probable de bloqueurs des canaux calciques. Cette activité est concentrée dans la fraction organique qui est dix fois supérieure à celle de l'extrait brut. Le traitement des cobayes préalablement exposés à des aérosols de l'acide citrique par différents extraits de *Nigella sativa* (extrait aqueux, extrait macéré et extrait décocté) montre un effet antitussif très important comparable à celui de la codéine (Boskabady *et al.*, 2004). Les investigations d'autres chercheurs ont permis de prouver que le Nigellone (polythymoquinone) est un agent protecteur efficace contre l'asthme et la bronchite, en inhibant efficacement la libération de l'histamine (Gilani *et al.*, 2004). L'action des graines de *Nigella sativa* sur le système respiratoire est probablement la résultante de plusieurs effets ; cholinergiques (Boskabady et Shahabi, 1997), inhibition des récepteurs H1 de l'histamine (Boskabady et Shiravi, 2000) et antagonisme du calcium (Gilani *et al.*, 2001, Boskabady et Shirmohammadi, 2002 ; Boskabady *et al.*, 2004).

g) Activité antidiabétique

Les effets de *Nigella sativa* sur certaines complications du diabète expérimental induit chez les animaux ont fait l'objet de nombreux travaux, Al-Hader *et al.*(1993) rapportent que l'huile essentielle de la graine administrée par voie intrapéritoneale (à raison de 50 mg/kg) abaisse de façon significative (de 15 à 23 %) la glycémie à jeun chez les animaux normo et hyperglycémiques. 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 (Hawsawi *et al.*, 2001 ; El-Dakhkhny *et al.*, 2002). D'autres auteurs ont mis en évidence un effet hypoglycémiant via l'oxyde nitrique de la thymoquinone chez l'animal rendu diabétique par la streptozotocine (El-mahmoudy *et al.*, 2005). Le traitement des rats avec l'extrait de *Nigella sativa* seul ou combiné avec les hormones thyroïdiennes humaines a montré une augmentation de la production d'insuline par les cellules β du pancréas (Altan *et al.*, 2007). Les travaux menés par Houcher *et al.* (2007) sont en concordance avec les études antérieures, ils ont montré que le traitement des rats diabétiques avec l'extrait brut et l'huile commerciale provoque une réduction importante de la glycémie de 58. 09 et 73. 27 %, respectivement. Le mécanisme d'action impliqué n'est pas relié à l'inhibition de l'absorption intestinale du glucose ni à la stimulation de l'insulinosecrétion, mais il est probablement dû à l'inhibition des enzymes de la néoglucogenèse hépatique.

I.3.5. Activité antioxydante

Parmi les différents travaux qui ont été effectués pour évaluer les effets des graines de *Nigella sativa*, la majorité d'entre eux sont focalisés sur ses propriétés antioxydantes *in vitro* et *in vivo*.

I.3.5.1. Activité antioxydante *in vitro*

L'huile essentielle de *Nigella sativa*, ainsi que ses fractions, ont été testées pour leur activité antioxydante par une évaluation rapide des antioxydants en utilisant deux méthodes de CCM de criblage. La thymoquinone, le carvacrol, le t-anthenol, et le 4-terpineol ont montré une propriété scavenger des radicaux libres remarquable. Cette propriété antioxydante a été confirmée par d'autres tests [Essai du DPPH (Diphenylpicrylhydrazyl), peroxydation lipidique non enzymatique et l'essai du désoxyribose] (Burits et Bucar, 2000)

L'huile fixe et ses fractions (lipides neutres, glycolipides et phospholipide) ont montré une activité antioxydante vis-à-vis des deux radicaux libres stables (DPPH et le radical glavinoxyl). Cette activité antioxydante est corrélée avec la teneur en acides gras polyinsaturés, en composés insaponifiables et en phospholipides, de même que la valeur peroxyde initiale de l'huile (Ramadan et Mörsel, 2003). L'huile fixe de *Nigella sativa* ainsi que la thymoquinone (un des composé majoritaire de l'huile essentielle) inhibent la peroxydation lipidique non enzymatique dans les liposomes (Houghton *et al.*, 1995).

A coté de l'huile, qui a été largement étudiée pour ses propriétés antioxydantes, les extraits éthanolique et aqueux des graines de *Nigella sativa* délipidées ont présenté une activité anti-oxydante importante, comparable à celle du TBHQ (*tert*-butylhydroquinone) (Atta et Imaizumi, 1998). Thippeswamy et Akhilender (2005) ont investigué les propriétés antioxydantes de trois variétés de cumin dont *Nigella sativa*. L'extrait aqueux et méthanolique de ses graines ont montré une activité antioxydante dans trois systèmes ; effet scavenger du radical DPPH, effet scavenger des hydroperoxydes lipidiques et inhibition de la peroxydation lipidique lipooxygénase dépendante, inhibition de la peroxydation lipidique non enzymatique au niveau des microsomes hépatiques. La préincubation des macrophages péritonéales avec l'extrait aqueux ou les fractions décoctées des graines de *Nigella sativa* cause une diminution dose dépendante de la production du NO après activation par les LPS (Lipopolysaccharide) d'E. coli (Mahmood *et al.*, 2003).

La thymoquinone induit une protection significative des hépatocytes en culture contre la toxicité induite par le *tert*-Butyl hydroperoxide (Daba et Abdel-Rahman., 1998). De plus, la thymoquinone réduit la production du nitrite (un paramètre de la synthèse du NO) et diminue l'expression des gènes ainsi que la biosynthèse de la iNOS (nitrique oxyde synthase inductible) dans le surnageant des macrophage stimulés par les LPS sans affecter la viabilité cellulaire (El-Mahmoudy *et al.*, 2002). La thymoquinone montre un effet scavenger de l'anion superoxyde généré photochimiquement, biochimiquement, ou suite à une stimulation des neutrophiles par les ionophores calciques (Nagi et Mansour., 2000).

I.3.5.2. Activité antioxydante *in vivo*

L'administration de l'huile de *Nigella sativa* 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 (El-Saleh *et al.*, 2004). Ainsi, une amélioration de l'activité du système antioxydant et une protection contre la peroxydation des lipides et l'endommagement hépatique ont été observés chez des lapins avec diabète mellitus induit par l'alloxane, après traitement par l'extrait aqueux des graines de *Nigella sativa* (Meral *et al.*, 2001). Les investigations d'autres chercheurs ont prouvé que le prétraitement des rats exposés à des radiations ionisantes par l'huile essentielle de *Nigella sativa* provoque une réduction significative des marqueurs du stress oxydant (MDA, nitrate et nitrite) avec une augmentation considérable du taux des antioxydants non enzymatiques (acide ascorbique, rétinol, GSH) (Cemek *et al.*, 2006).

Par ailleurs, le traitement des rats soumis à un régime alimentaire contaminé par l'aflatoxine, avec l'huile de *Nigella sativa* entraîne une protection importante contre l'hépatonephrotoxicité et les endommagements oxydatifs (réduction des taux de la GPx, la SOD, augmentation de la peroxydation lipidique et des altérations de l'ADN) induits durant l'aflatoxicose. Cet effet protecteur de l'huile de *Nigella sativa* est probablement attribué à leur activité radical scavenger (Abdel-Wahhab et Aly, 2005).

L'effet de *Nigella sativa* sur quelques complications oxydatives du diabète expérimentalement induit par l'alloxane chez les lapins a été largement investigué par Meral et son équipe (2001) qui ont étudié l'influence de l'extrait aqueux de *Nigella sativa* sur les peroxydes lipidiques, les antioxydants (glutathion et ceruloplasmine) et le glucose sérique aussi bien que sur l'histologie du foie et du pancréas chez les lapins diabétiques. Ces chercheurs ont trouvé que le traitement pendant deux mois par l'extrait de *Nigella sativa* réduit significativement les concentrations élevées du glucose et des peroxydes lipidiques, améliore la défense anti-oxydante, par augmentation du taux des antioxydants, et protège contre l'endommagement hépatique induit par la peroxydation lipidique.

En fait, l'hépatotoxicité et la néphrotoxicité sont associées à des altérations du taux et de l'activité de certains médiateurs comme l'alanine aminotransférase, la phosphatase alcaline, les peroxydes lipidiques et le système antioxydant enzymatique incluant le GSH et la SOD. Les effets antioxydants de *Nigella sativa* sont confirmés en utilisant différent model murin de l'hépatonephrotoxicité induite par le *tert*-butylhydroperoxide (*t*-BHP), tétrachlorure de carbone (CCl₄), doxorubicin, gentamicine, méthionine, bromate de potassium (KBrO₃), cisplatine ou l'infection par *Schistosoma mansoni* (Salem, 2005).

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1 MATERIEL

II.1.1. Matériel biologique

II.1.1.1. Choix des animaux

L'étude *in vivo* a été réalisée sur des souris mâles, *Swiss albinos* dont le poids varie entre 25 et 30g, procurés aux près de l'Institut Pasteur d' Alger. Les animaux sont hébergés dans des cages de polypropylène munies d'un porte étiquette où est mentionné le nom du lot, le traitement subi et les dates des expérimentations. Ces souris sont utilisés après une période d'adaptation de 7 jours, ils ont accès libre à l'eau et à l'aliment standard fourni par l'Office National des Aliments de Bétails (ONAB) de Bejaia.

II.1.1.2. Les graines de *Nigella sativa* L.

La récolte des graines de *Nigella sativa* a été effectuée au mois de juin 2007 de la région de Theniet-Ennassr (Wilaya de Bordj Bou Arréridj). L'huile des graines de *Nigella sativa* a été procurée du marché local de Sétif, elle est extraite par pression à froid, des graines de *Nigella sativa* d'origine Saoudienne.

II.1.2. Réactifs chimiques

Les sels utilisés pour la préparation des tampons, PMS (phenazine methosulphate), β -NADH (β -Nicotinamide Adénine Dinucleotide), NBT (Nitroblue Tetrazolium), Ferrozine (3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenyl-sulfonicacid)-1,2,4-triazine), FeCl_2 , Tween 40, *t*-BHP (*tert*-butyl hydroperoxide), les antioxydants standards; TBHQ (*tert*-butylhydroquinone), BHT (butylated hydroxytoluen), α -tocophérol, les différents polyphénols et le réactif de Folin proviennent tous de Sigma. DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl), acide linoléique et β -carotène proviennent de Fluka. Les autres réactifs et solvants sont obtenus au près de Panreac, Cheminova, Prolabo, Aldrich, Organics et Janssen Chemica.

II.2. METHODES

II.2.1. Préparation de l'extrait brut

Les graines de *Nigella sativa* préalablement nettoyées et broyées sont mise à macérer dans un mélange méthanol/eau (7 :3 V/V) à un rapport de 1/10 (P/V), sous agitation douce pendant une nuit à température ambiante. L'extrait hydroalcoolique est récupéré dans un premier temps après filtration du mélange sur verre fritté (entonnoir N°03), le méthanol est éliminé du filtrat par évaporation sous pression réduite dans un rotavapeur (BÜCHI). Permettant ainsi d'obtenir un extrait caractérisé par une couleur brune foncée, qui est considéré comme étant l'extrait brut

(EBr) des graines de *Nigella sativa*. 50 ml de cet extrait sont congelés puis lyophilisés afin de déterminer leur valeur en matière sèche ainsi que le rendement d'extraction. Le volume restant sera fractionné ultérieurement.

II.2.2. Fractionnement de l'extrait brut

L'extrait brut est fractionné selon la méthode de Gilani *et al.* (2001) modifié par Boudiaf (2006), en utilisant une série de solvants à polarité croissante (**Figure 9**). L'extrait brut est initialement mélangé avec l'hexane (1 V/V), après décantation la phase organique supérieure est récupérée. Cette étape est refaite plusieurs fois avec renouvellement du solvant jusqu'à ce qu'il devient transparent. L'hexane est par la suite évaporé et l'extrait résultant est considéré comme étant la fraction de l'hexane (EHx). La phase aqueuse inférieure est soumise à un autre fractionnement par le chloroforme pour donner l'extrait du chloroforme (ECh), et enfin par l'acétate d'éthyle pour donner la fraction de l'acétate d'éthyle (EAc), en suivant les mêmes étapes que le premier fractionnement par l'hexane. Le raffinat qui en résulte représente la fraction aqueuse (EAq) résiduelle qui est également soumise à une lyophilisation et conservés avec les autres extraits à -20°C jusqu'à utilisation.

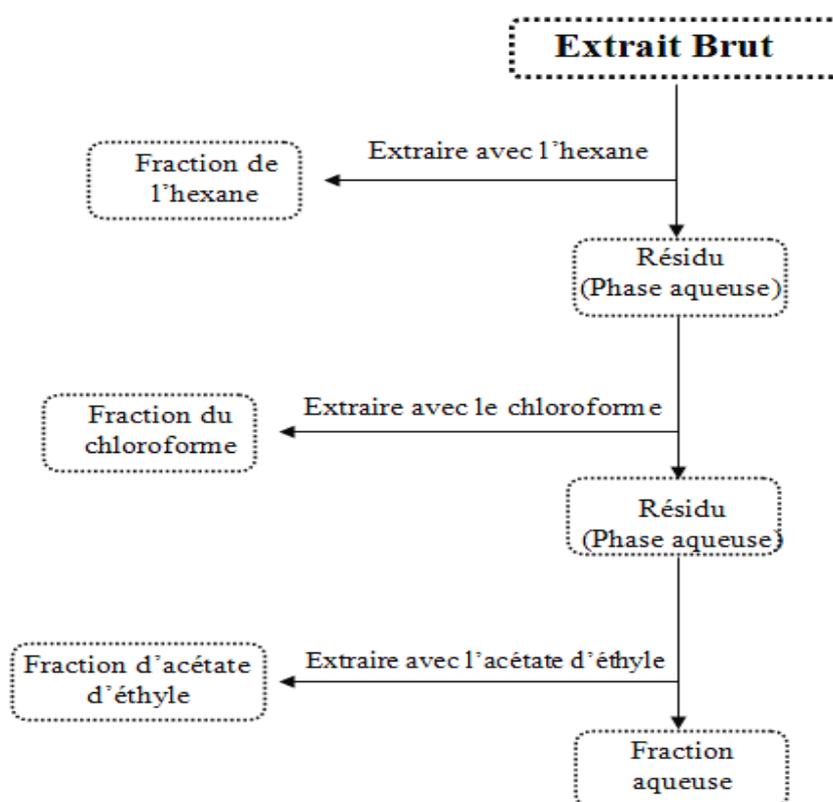


Figure 9. Les étapes du fractionnement de l'extrait brut des graines de *Nigella sativa*.

II.2.3. Analyse des extraits des graines de *Nigella sativa*

II.2.3.1. Dosage des composés phénoliques

La teneur en composés phénoliques des différents extraits des graines de *Nigella sativa* 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 (WO_4^{2-}) phosphomolybdique (MoO_4^{2-}) 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 μ l d'échantillon ou standard (préparés dans le méthanol) avec des dilutions convenables, Après 4 min, 800 μ l d'une solution de carbonate de sodium (75 mg/ml) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 h d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesurée à 765nm.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-160 μ g/ml) et est exprimée en μ g d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (μ g EAG/mg d'extrait).

II.2.3.2. 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' $AlCl_3$ (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 μ g/ml) et est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (μ g EQ/mg d'extrait).

II.2.3.3. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince est une technique de séparation des constituants d'un mélange complexe par entraînement à l'aide d'une phase mobile (solvant) le long d'une phase stationnaire (gel de silice), en se basant sur les phénomènes d'adsorption et de partage. Pour analyser les quatre extraits ; brut (EBr), chloroformique (ECh), d'acétate d'éthyle (EAc) et aqueux (EAq) des graines de *Nigella sativa* une CCM a été utilisée sur plaques de gel de silice avec indicateur fluorescent (20×20 cm, 60 F254). Dans un système de migration constitué de chloroforme : acétate d'éthyle : acide formique (50 : 40 :10 V/V/V) (Riov et Gottlieb, 1980).

5 µl de chaque extrait (100 mg/ml) et standard (5 mg/ml) sont déposés et les plaques sont ensuite introduites dans la chambre de migration préalablement saturée par les vapeurs de la phase mobile.

Après développement, les plaques sont séchées sous hotte, puis visualisées séparément par trois systèmes de révélation :

i) révélation physique sous lampe UV à 254 nm.

ii) révélation chimique par une solution aqueuse de trichlorure de fer et de ferricyanide de potassium (FeCl_3 , $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 1/1%) pour la détection des composés phénoliques (Wettasinghe, 1999).

iii) révélation chimique par une solution méthanolique de DPPH (2%) pour la détection des extraits ainsi que des composés ayant une activité antioxydante (Juma et Majinda, 2004). Les rapports frontaux des spots issus de la séparation sont calculés et comparés à ceux des témoins permettant ainsi l'identification des constituants de différents extraits.

II.2.4. Tests, *in vitro*, de l'activité antioxydante

II.2.4.1. Effet scavenger du radical DPPH

Pour étudier l'activité antiradicalaire des différents extraits, nous avons opté pour la méthode qui utilise le DPPH (diphényl picryl-hydrate) comme un radical libre relativement stable, selon le protocole décrit par Mansouri et al (2005). Dans ce test les antioxydants réduisent le diphényl picryl-hydrate ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphényl picryl-hydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Sanchez-Moreno, 2002). Brièvement, La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2,4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol. 25 µL des solutions d'extraits ou standards (quercétine, TBHQ) sont ajoutés à 975 µL DPPH, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517 nm . L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

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

Les concentrations des extraits dans le milieu réactionnel sont comprises entre 0-0,4 mg/ml, 0-0,6 mg/ml et 0-1,2 mg/ml pour l'ECh, (l'EAc, l'EBr) et (l'EHx, l'EAq) respectivement. Alors que celles des antioxydants standards (Quercétine et TBHQ) sont comprises entre 0 à 10 µg/ml.

II.2.4.2. Effet scavenger de l'anion superoxyde (PMS-NADH-NBT)

L'effet scavenger des différents extraits de *Nigella sativa* vis-à-vis de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) est évalué en utilisant un système purement chimique PMS-NADH-NBT selon le protocole décrit par Ani et ses collaborateurs (2006). La génération du $O_2^{\bullet-}$ se fait par l'oxydation de β -NADH en présence de PMS et de l'oxygène moléculaire, elle est couplée à la réduction de NBT en formazan qui absorbe à 560 nm.

La réaction est conduite dans un tampon phosphate (0,1 M, pH 7) en présence de β -NADH (300 μ M) et de NBT (100 μ M). Ce mélange est initialement incubé avec ou sans extraits pendant 2 min. La génération du $O_2^{\bullet-}$ est induite par l'addition de PMS (30 μ M concentration finale). Après 3 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 560.

L'effet des extraits de *Nigella sativa* sur le superoxyde produit par le système PMS-NADH est traduit en pourcentage d'inhibition de la formation de formazan par rapport au contrôle négatif (contenant tous les réactifs à l'exception de l'extrait).

$$\% \text{ Scavenger de superoxyde} = [(\text{Abs}_{560} \text{ contrôle} - \text{échantillon}) / \text{Abs}_{560} \text{ contrôle}] \times 100$$

La quercétine et le BHT sont utilisés comme standards aux concentrations allant de 0 à 0,08 mg/ml et 0 à 0,85 mg/ml respectivement. Les extraits (EHx, ECh), (EBr, EAc) et EAq sont utilisés à des intervalles de concentrations de 0-0,6 mg/ml, 0-10,8 mg/ml et 0-16.8 mg/ml respectivement.

II.2.4.3. Chélation du fer ferreux

La capacité chélatrice des extraits est mesurée en suivant l'inhibition de la formation du complexe Fe(II)-Ferrozine après incubation des échantillons avec le fer divalent selon la méthode de Le et al (2007). Les solutions d'échantillons (500 μ l) sont initialement mélangées avec 100 μ l $FeCl_2$ (0.6 mM dans l'eau distillée) et 900 μ l de méthanol. Après 5 min, 100 μ l de Ferrozine (5 mM dans le méthanol) sont additionnés au milieu réactionnel, le mélange est bien agité puis laissé pour réagir pendant 10 min à température ambiante permettant ainsi la complexion du fer résiduelle et la formation d'un chromophore rouge (Fe (II)-Ferrozine) ayant un maximum d'absorption à 562 nm. Par ailleurs, le contrôle négatif contient tous les réactifs à l'exception de l'échantillon à tester qui est remplacé par un volume égale de méthanol.

L'effet séquestrant des échantillons vis-à-vis du fer est exprimé en pourcentage de chélation selon l'équation suivante :

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

Les extraits ont été utilisés à des concentrations allant de 0-0,8 mg/ml, 0-19 mg/ml, 0-9 mg/ml et 0-1,8 mg/ml, pour (l'EBr, l'EAq), l'EHx, l'ECh, EAc respectivement. L'EDTA et la quercétine sont utilisés comme chélateurs de référence à des intervalles de concentration respectives de (0-24 µg /ml) et (0-2,3 mg/ml).

II.2.4.4. Test de blanchissement du β-carotène

Dans ce test la capacité antioxydante des extraits est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydatif du β-carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique selon la méthode décrite par Kartal et *al* (2007). L'émulsion de β-carotène /acide linoléique est préparée par solubilisation de 0,5 mg de β carotène dans 1 ml du chloroforme, 25 µl de l'acide linoléique et 200 mg de Tween 40 sont additionnés, le chloroforme est complètement évaporé au rotavapeur, par la suite 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés, l'émulsion résultante est agitée vigoureusement. 350 µL de solution d'extraits ou d'antioxydants de référence (BHT, α-tocophérol) solubilisé dans du méthanol (2 mg/ml) sont additionnés à 2,5 ml de l'émulsion précédente.

La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence d'antioxydant (contrôle négatif dans lequel l'échantillon est remplacé par 350µl de méthanol) est suivie à 490 nm à des intervalles de temps réguliers pendant 48 heures. L'activité antioxydante relative des extraits (AAR) est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{AAR} = \text{Abs}_{t=48h} (\text{échantillon}) / \text{Abs}_{t=48h} (\text{BHT})$$

II.2.4.5. Test, *in vitro*, de la résistance des globules rouges humains prétraités par les extraits des graines de *Nigella sativa* à l'attaque radicalaire

La résistance des érythrocytes prétraités par les extraits des graines de *Nigella sativa* à l'attaque radicalaire est évaluée selon le protocole décrit par Manna et *al*. (2002). Le sang humain utilisé dans ce test est obtenu par prélèvement veineux au pli du code de volontaires sains et non fumeurs. Le sang collecté dans un tube hépariné est centrifugé à 1500g/5min/4C°, après élimination du plasma, le culot est lavé trois fois par un tampon phosphate (NaCl 125 mM,

phosphate de sodium 10 mM, pH 7,4). Pendant chaque lavage, la suspension est homogénéisée par un simple retournement du tube, le surnageant et la couche d'interface sont éliminés juste après la centrifugation. À l'issue de la dernière centrifugation le culot cellulaire obtenu est dilué avec le même tampon phosphate pour obtenir un hémocrite de 2%. L'attaque radicalaire est induite par l'addition du *t*-BHP à la suspension érythrocytaire préalablement incubée (15 min) avec les extraits des graines de *Nigella sativa*. Après deux heures d'incubation avec le *t*-BHP (*tert*-butyle hydroperoxyde) à 37°C, le mélange réactionnel est centrifugé à 1500g/10min/4°C et l'hémolyse (libération d'hémoglobine) est évaluée en mesurant l'absorbance du surnageant à 540 nm .

II.2.5. Etude, *in vivo*, de l'activité antioxydante de l'extrait brut méthanolique et de l'huile fixe commerciale des graines de *Nigella sativa*

a) Répartition et traitement des animaux

Des souris mâles, *Swiss albinos*, adultes et de poids variant entre 25 et 30 g, sont répartis selon l'homogénéité de leurs poids en six lots expérimentaux de 6 à 7 animaux chacun. Ils ont été gavés quotidiennement durant trois semaines par :

- 300, 500 et 800 mg/kg de l'extrait brut méthanolique (groupe EM1, EM2 et EM3 respectivement).

- 2 et 4 ml/kg de l'huile fixe commerciale (groupes HF1 et HF2 respectivement).

Les souris du groupe contrôle (CTL) ont reçu le même volume d'une solution saline normale.

b) Prélèvement sanguin

Le prélèvement sanguin est réalisé après trois semaines de traitement sur les souris anesthésiées par l'éther diéthylique *via* une ponction cardiaque par le biais d'une seringue contenant une microgoutte d'héparine injectable. Au cours de chaque prélèvement, environ 1 ml de sang est recueilli dans un tube eppendorf. Un aliquote de 100 µl de sang total est transféré immédiatement vers un autre tube contenant 2,4 ml de tampon phosphate (NaCl 125 mM, phosphate de sodium 10 mM, pH 7,4) afin d'obtenir une dilution de 1/25^{ème}. La quantité du sang restante est centrifugée à 1500 g pendant 5min à 4°C. Le plasma obtenu est aliquoté et conservé à une température de -20°C jusqu'à son utilisation.

II.2.5.1. Evaluation de l'effet de l'extrait brut méthanolique et de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* sur la capacité antioxydante totale du sang chez la souris

Le potentiel global de défense antioxydante est mesuré par le test KRL (kit de dosage des Radicaux Libres) selon le protocole décrit par Girard et ses collaborateurs (2006). Avec quelques

modifications en remplaçant le radical AAPH [2,2'-azo-bis (2-amidinopropane) HCl] par le *tert*-butyle hydroperoxyde (*t*-BHP) (Manna et al., 2002). Ce test consiste à soumettre un échantillon du sang total à une agression radicalaire dans des conditions strictement contrôlées et standardisées. Tous les systèmes enzymatiques et chimiques de l'échantillon se mobilisent pour protéger l'intégrité des érythrocytes afin de résister à cette agression, jusqu'à ce que la membrane cellulaire en soit modifiée au point de libérer leurs contenu cellulaires.

Brièvement, un aliquote de 80 µl de chacune des solutions sanguines obtenues précédemment (dilution 4%), déposé dans un puit de microplaque, est exposé au radical produit par la décomposition thermique à 37°C de 136 µl de *t*-BHP (166µM) en solution. La cinétique de disparition progressive des hématies est suivie par la mesure dynamique de la diminution de l'absorbance à 620 nm (par un lecteur de plaque 96 puits). La résistance du sang à l'attaque radicalaire est exprimée par le temps nécessaire à la lyse de 50% des érythrocytes (half-hemolysis Time; HT₅₀).

II.2.5.2. Evaluation de l'effet de l'extrait brut méthanolique et de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* sur la capacité antioxydante plasmatique vis-à-vis du radical DPPH

La capacité du plasma à piéger le radical DPPH a été évaluée selon la méthode de Hasani et ses collaborateurs (2007) avec quelques modifications, en se basant sur le même principe que celui du test de DPPH effectué précédemment *in vitro*. Brièvement, un volume de 50 µL de plasma est additionné à 950 µl de la solution méthanolique de DPPH (2,4 mg/100 ml de méthanol). Après 30 min d'incubation à l'obscurité suivie d'une centrifugation (Janaszewska et Bartosz, 2002), l'absorbance à 517 est mesurée. Le pouvoir antioxydant plasmatique est ensuite calculé (voir la partie II.2.4.1).

II.2.6 Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués *in vitro* et *in vivo* sont exprimés en moyenne ± SD et moyenne ± SEM respectivement. Les valeurs d'IC₅₀ (concentration inhibitrice à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = *f* (concentration)]. Les sigmoïdes de la cinétique d'hémolyse et la détermination de l'HT₅₀ sont effectués par le logiciel (Graph Pad. Prism. V 5.00). La différence entre le contrôle et les différents tests, est déterminée par le test de Student pour les comparaisons simples ou ANOVA univariée suivie du test de Dunnett/Tukey pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification. Les valeurs de p ≤ 0.05 sont considérées statistiquement significatives.

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

III.1. PRÉPARATION DES EXTRAITS À PARTIR DES GRAINES DE *Nigella sativa*

La préparation des extraits à partir des graines de *Nigella sativa* a été effectuée selon la méthode de Gilani *et al.* (2001) modifiée, qui est très recommandée pour l'extraction des flavonoïdes. Cette extraction a été effectuée en deux grandes étapes, la première est une extraction par un mélange hydroalcoolique méthanol/eau (7/3 V/V) pour obtenir initialement l'extrait brut contenant les flavonoïdes totaux. La deuxième étape de fractionnement a été réalisée par une série de solvants à polarité croissante (Hexane → Chloroforme → Acétate d'éthyle) permettant ainsi de séparer les composés de l'extrait brut selon leur degré de solubilité dans les solvants d'extraction et donc selon leur degré de glycosylation (flavonoïdes aglycones, mono, di et tri-glycosylés) (Markham, 1982). De ce fait, cinq différents extraits ont été obtenus successivement: l'extrait brut (EBr), l'extrait d'hexane (EHx), l'extrait du chloroforme (ECh), l'extrait d'acétate d'éthyle (EAc) et l'extrait aqueux (EAq). La couleur, l'aspect ainsi que le rendement de chaque extrait par rapport au poids des graines (estimé par gravimétrie) et par rapport à l'extrait méthanolique sont représentés dans le **tableau 4** ci-dessous.

Tableau 4. Aspects, couleurs et rendements des diverses fractions extraites à partir des graines de *Nigella sativa* en pourcentage par rapport au poids total des graines et à l'extrait brut

Extrait	Aspect	Couleur	Rendement	
			(par rapport au poids du broyat)	(par rapport à l'extrait brut)
EBr	poudre	Brunâtre	21,5 %	100 %
EHx	huileux	Rouge à marron	3,05 %	14,18 %
ECh	pâteux	Marron foncé	0.41%	1,90%
EAc	pâteux	Marron foncé	0.62 %	2,88%
EAq	poudre	Brunâtre	14,08 %	65,48%

Les résultats obtenus montrent que parmi les différentes fractions de l'extrait brut, l'extrait EAq représente le rendement le plus élevé (14,08%) par rapport au poids total des graines, suivi par l'EHx (3,05 %), l'EAc (0,62%) puis l'ECh (0.41%). La même chose est observée lors de la comparaison des rendements des différents extraits par rapport à l'extrait brut (qui représente 21,5% par rapport au poids total des graines), ces rendements sont de 65,48 %, 14,18 %, 2,88 % et 1,90 % pour l'EAq, l'EHx, l'EAc et l'ECh respectivement. La somme des pourcentages des quatre extraits par rapport à l'extrait brut est de 84.44 %. Etant donné le nombre assez élevé de

lavages effectués pour la séparation des trois fractions, le fractionnement de l'extrait brut peut conduire à des pertes substantielles de matière, ces pertes représentent 15,56 %.

Le rendement de l'EBr est de l'ordre de 21,5% du poids total des graines, ce dernier est inférieur à 27 % rapporté par Houcher et collaborateurs (2007) ayant utilisé la même technique d'extraction mais dont le pourcentage du méthanol dans le mélange d'extraction est différent. En comparaison avec les résultats de Boudiaf (2006), il apparaît que le rendement de l'extrait brut et de ses fractions par rapport au poids total des graines est légèrement supérieur dans ce présent travail. Les rendements de l'extrait d'acétate d'éthyle sont comparables et celui de l'extrait aqueux est bien inférieur (65,48% *versus* 71,9 %). Toutefois, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie, car le rendement n'est que relative et semble être lié aux propriétés génétiques des graines ainsi qu'à l'origine géographique, aux conditions et à la durée de stockage de la récolte et aussi aux méthodes d'extraction appliquées.

En plus de ces aspects quantitatives, quelque soit la méthode d'extraction appliquée elle doit tenir compte de la qualité d'extrait, autrement dit de la bio-activité de ces principes actifs. Dans la présente étude, la méthode de macération sous agitation permet d'accélérer le processus d'extraction et de minimiser le temps de contact du solvant avec l'extrait tout en préservant la bio-activité de ses constituants. De même, le déroulement de cette extraction à température ambiante ainsi que l'épuisement du solvant à pression réduite permet d'obtenir le maximum des composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction.

III.2. ANALYSE DES EXTRAITS DES GRAINES DE *Nigella sativa*

III.2.1. Dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes.

Afin de caractériser les extraits préparés à partir des gaines 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 antioxydante des plantes leur sont attribués. La méthode de dosages des polyphénols totaux est celle de Folin-Ciocalteu (Li *et al.*, 2007). L'acide gallique a été utilisé comme standard. Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium (Bahorun *et al.*, 1996) en utilisant comme standard la quercétine. Les résultats sont représentés dans le **tableau 5** et les gammes d'étalonnages dans les **Figures 10** et **11**.

Tableau 5. Dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes dans les extraits des graines de *Nigella sativa*.

Extrait	Présent travail		Boudiaf (2006)	
	Polyphénols ^(a)	Flavonoïdes ^(b)	Polyphénols ^(a)	Flavonoïdes ^(b)
EBr	33,64 ± 0,34	3,80 ± 0,07	24,36 ± 2,89	3,28 ± 0,16
EHx	15,95 ± 0,58	0,43 ± 0,06	11,95 ± 1,36	0,49 ± 0,07
ECh	81,31 ± 1,97	5,20 ± 0,02	191,06 ± 23,34	6,93 ± 0,28
EAc	72,43 ± 2,94	4,19 ± 0,09	79,48 ± 8,80	5,96 ± 0,25
EAg	27,07 ± 0,58	2,45 ± 0,06	23,81 ± 2,67	3,17 ± 0,16

^(b) µg d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait.

^(a) µg d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait.

Les valeurs représentent la moyenne de 3 à 4 mesures ± SD.

Les résultats du dosage des polyphénols montrent que l'extrait brut méthanolique contient 33,64 ± 0,34 µg EAG/mg d'extrait. Cependant, l'extrait du chloroforme constitue dans les extraits de *Nigella sativa* la fraction phénolique la mieux représentée (81,31 ± 1,97 µg EAG/mg d'extrait) suivi par l'extrait d'acétate d'éthyle (72,43 ± 2,94 µg EAG/mg d'extrait), l'extrait aqueux renferme (27,07 ± 0,58 µg EAG/mg d'extrait), alors que l'extrait hexanique ne contient que (15,95 ± 0,58 µg EAG/mg d'extrait).

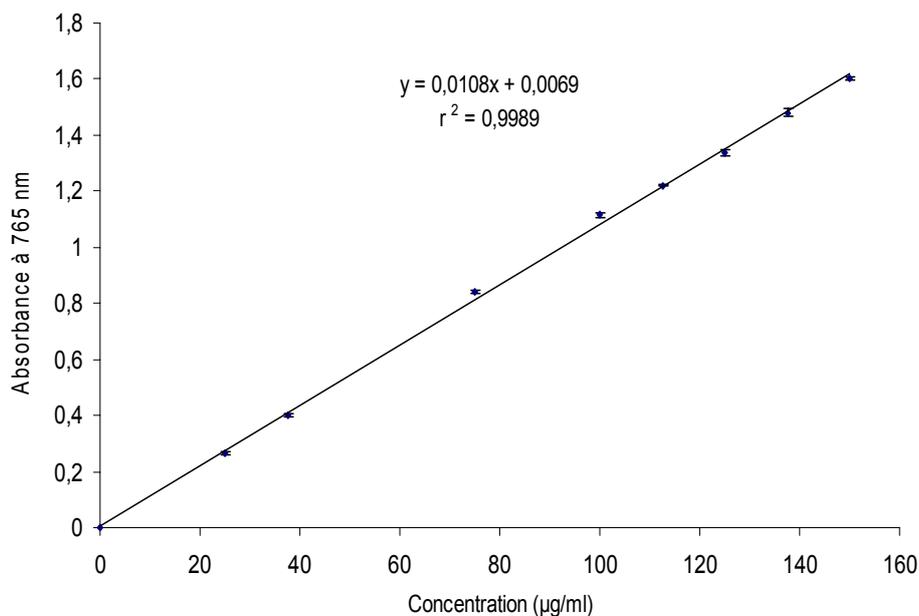


Figure 10. Droite d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne \pm SD de trois essais).

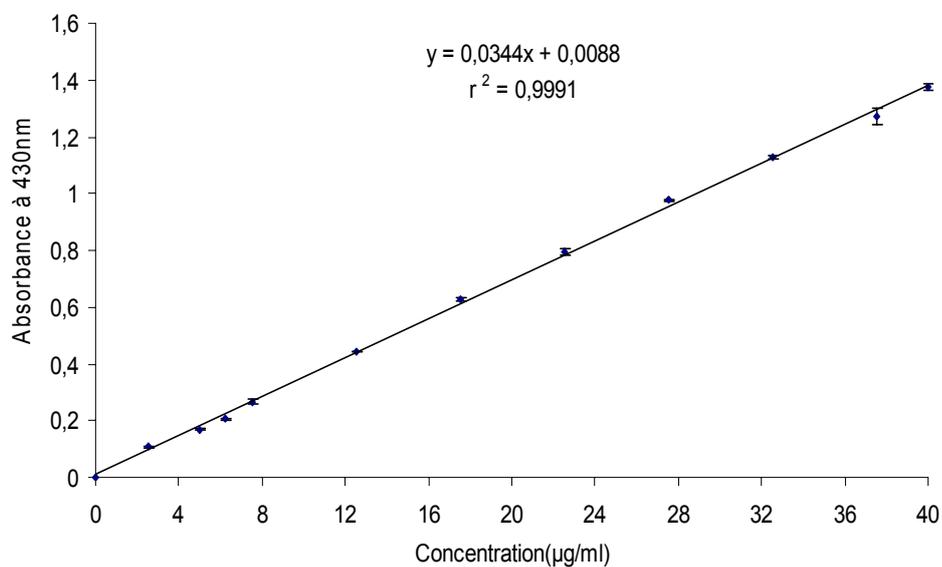


Figure 11. Droite d'étalonnage de la quercétine (moyenne \pm SD de trois essais)

La méthode de Folin-Ciocalteu a été choisie pour doser les polyphénols pour les raisons suivantes ; **(i)** c'est une méthode qui satisfait aux critères de faisabilité et de reproductibilité, **(ii)** la disponibilité du réactif de Folin et la méthode est bien standardisée, **(iii)** la grande longueur

d'onde (765nm) d'absorption du chromophore permet de minimiser les interférences avec la matrice d'échantillon qui est souvent coloré, (iv) c'est un test largement pratiqué dans les laboratoires de recherche d'antioxydants alimentaires à travers le monde (Huang *et al.*, 2005).

Si le dosage de Folin-Ciocalteu est simple à mettre en œuvre et très sensible, il n'est cependant pas spécifique des polyphénols car il réagit avec les acides aminés tyrosine et tryptophane des protéines. De telles interférences peuvent être négligés car ces acides aminés aromatiques sont en proportions trop faibles par rapport aux composés phénoliques non protéiques dans les extraits (Boizot et Charpentier, 2006).

La détermination quantitative des flavonoïdes totaux par la méthode du trichlorure d'aluminium révèle que l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait de chloroforme sont les plus riches en flavonoïdes avec des teneurs de ($4,19 \pm 0,089 \mu\text{g EQ/mg d'extrait}$) et ($5,20 \pm 0,025 \mu\text{g EQ/mg d'extrait}$) respectivement. Par la suite vient l'extrait brut ($3,80 \pm 0,077 \mu\text{g EQ/mg d'extrait}$) suivi par l'extrait aqueux ($2,45 \pm 0,061 \mu\text{g EQ/mg d'extrait}$). Cependant seulement ($0,43 \pm 0,064 \mu\text{g EQ/mg d'extrait}$) sont trouvés dans l'extrait hexanique.

L'examen de ces résultats permet de mettre en évidence une corrélation linéaire significative ($r^2 = 0,76$, $p \leq 0,05$) entre la teneur des extraits en flavonoïdes et en composés phénoliques. Ceci est logique étant donné que les flavonoïdes représentent les composés majoritaires des polyphénols.

Si on compare nos résultats à ceux réalisés par Boudiaf (2006), on remarque le même ordre décroissant des extraits (ECh > EAc > EBr > EAq > EHx) en terme de teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes. De même, le taux des flavonoïdes dans les deux études est relativement comparable notamment pour les extraits EBr, EHx et EAq. Par ailleurs, la teneur des composés phénoliques est plus ou moins différente. Pour l'EBr, l'EAq et l'EHx les taux des polyphénols dans la présente étude sont bien supérieurs mais pour l'ECh et l'EAc les taux sont inférieurs, cette différence est plus marquée pour l'ECh dont la teneur est de l'ordre de $81,31 \mu\text{g EAG/mg d'extrait}$, soit 42 % de celle rapporté par Boudiaf (2006) par la méthode au bleu de Prusse. Toutefois, il est important de signaler que l'utilisation de différentes méthodes de dosage, réduit la fiabilité d'une comparaison entre les deux études.

III.2.2. Chromatographie sur couches minces (CCM)

Par ses faibles contraintes techniques, son emploi simple et son coût modeste, la CCM est un outil de choix pour l'analyse phytochimiques de routine d'extraits bruts, de fractions, ainsi que de produits purs isolés. De ce fait nous avons opté pour cette technique dans le but de caractériser les différents constituants des extraits des graines de *Nigella sativa*. Le système de migration constitué de chloroforme, acétate d'éthyle et acide formique, (50: 40:10, V/V/V), a permis d'avoir une très bonne séparation chromatographique et une visibilité acceptable des spots. La révélation est réalisée par trois méthodes différentes; **A)** Observation sous lumière ultraviolette (à 254 nm), **B)** révélation chimique par une solution aqueuse de trichlorure de fer et de ferricyanide de potassium (FeCl_3 , $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 1 /1%) et **C)** révélation chimique par une solution méthanolique de DPPH (2%) (**Figure 12**).

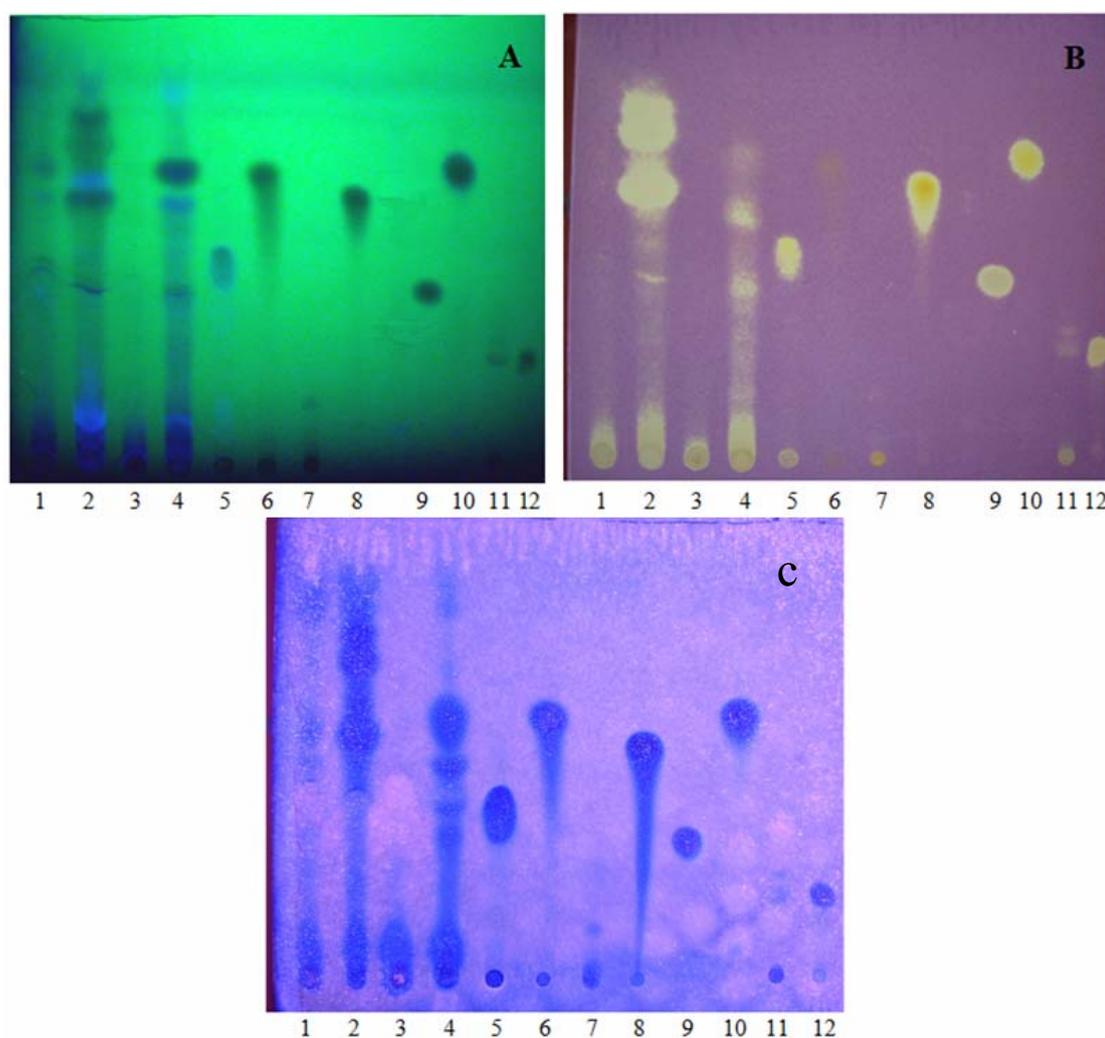


Figure 12. Chromatographie sur couches minces des extraits des graines de *Nigella sativa*.

A) observation sous UV (254 nm), **B)** révélation par FeCl_3 , $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 1 /1%, **C)** révélation par solution de DPPH (2%), 1; EBr, 2; ECh, 3; EAq, 4; EAc, 5; Morine, 6; Apigénine, 7; Quercétrine, 8; Quercétine, 9; Acide gallique, 10; Kaempferol, 11; Acide élagique, 12 ; Catéchine.

Les rapports frontaux (Rf) des différents échantillons et témoins utilisés sont représentés dans le tableau suivant.

Tableau 6. *Rapports frontaux des spots issus de la séparation des extraits des graines de Nigella sativa ainsi que ceux des témoins utilisés.*

<i>Extraits/Témoins</i>	<i>Révélation sous UV (254 nm)</i>	<i>Révélation par DPPH (2%)</i>
EBr	0,06. 0,38. 0,44. 0,59. 0,65	0,06
ECh	0,05. 0,1. 0,39. 0,59. 0,63. 0,69. 0,76. 0,84	0,05. 0,1. 0,39. 0,59. 0,63. 0,69. 0,76. 0,84
EAc	0,05. 0,11. 0,39. 0,58. 0,64. 0,83	0,05. 0,11. 0,40. 0,58. 0,64
EAq	0,06	–
Morine	0,44	0,44
Apigénine	0,63	0,63
Quercétrine	0,09	–
Quercétine	0,59	0,59
Acide gallique	0,38	0,38
Kaempferol	0,65	0,65
Acide élagique	0,25	0,25
Catéchine	0,23	0,23

Suite à l'observation sous la lampe UV (254 nm), la comparaison des Rfs des spots issus de la séparation des extraits avec ceux des témoins utilisés permet d'avoir une idée sur les composés présents dans les graines de *Nigella sativa*. La quercétine et l'acide gallique (Rf : 0,59 et 0,38 respectivement) sont probablement présents dans EBr, ECh et EAc. Le Kaempferol (Rf : 0,65) est probablement présent dans EBr et EAc. La morine (Rf : 0,44) et l'apigénine (Rf : 0,63) pourrait être présents dans EBr et ECh respectivement. Cependant le Rf du spot unique issu de l'extrait aqueux ne correspond à aucun Rf des témoins utilisés.

D'après la bibliographie, très peu de travaux de recherches se sont intéressés aux flavonoïdes des graines de *Nigella sativa*. Merfort et ses collaborateurs (1997) ont pu identifier trois flavonoïdes glycosylés dans les graines de la nigelle; quercétine 3-glycosyl (1→2) galactosyl (1→2) glucoside, kaempférol 3-glycosyl (1→2) galactosyl (1→2) glucoside et quercétine 3- (6-feruloylglycosyl) (1→2) galactosyl (1→2) glucoside. Récemment, Bourgou et son équipe (2008) ont analysé la composition phénolique des racines et des tiges de *Nigella*

sativa par HPLC, quarante composés phénoliques ont été identifiés, dont les plus abondants sont l'acide vanillique, l'acide gallique, l'acide trans-cinnamique, la catéchine, la quercétine et l'apigénine.

La révélation de la plaque par la solution méthanolique de DPPH est une CCM de criblage qui permet l'obtention de renseignements supplémentaires sur l'activité antioxydante des différents composants des extraits testés. Les composés actifs sont visualisables comme des taches jaunes sur un fond violet. L'extrait chloroformique présente le plus grand nombre de composés actifs avec huit taches jaunes (R_f : 0,05 ; 0,1 ; 0,39 ; 0,59 ; 0,63 ; 0,69 ; 0,76 ; 0,84), suivi par l'extrait d'acétate d'éthyle qui présente cinq taches de composés actifs (R_f : 0,05 ; 0,11 ; 0,40 ; 0,58 ; 0,64). L'extrait méthanolique présente un seul spot actif (R_f : 0,06), alors que l'extrait aqueux ne présente aucune activité. Notant toutefois qu'un résultat négatif obtenu pour un extrait testé ne doit pas exclure la présence de substances actives dans cet extrait. En effet, la concentration de ces substances est peut être très faible pour que l'on puisse détecter leurs activités sur plaque CCM.

Par ailleurs, la troisième plaque a été révélée par une solution aqueuse de trichlorure de fer et de ferricyanide de potassium (FeCl_3 , $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 1 /1%), ceci permet de visualiser les composés phénoliques issus de la séparation des constituants des extraits sous forme de taches bleues. Cette coloration bleue est due à la complexion du FeCl_3 avec les ions ferreux résultants de l'oxydation du ferricyanide de potassium par les composés phénoliques (Price et Butler, 1977). Le chromatogramme obtenu montre que les deux extraits (ECh et EAc) sont les plus riches en composés phénoliques. Ces résultats confirment ceux du dosage des polyphénols par la méthode de Folin-Ciocalteu.

III.3. TESTS, *IN VITRO*, DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE

III.3.1. Effet scavenger du radical DPPH

L'activité antioxydante des différents extraits de *Nigella sativa* vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm (**Figure 13**)

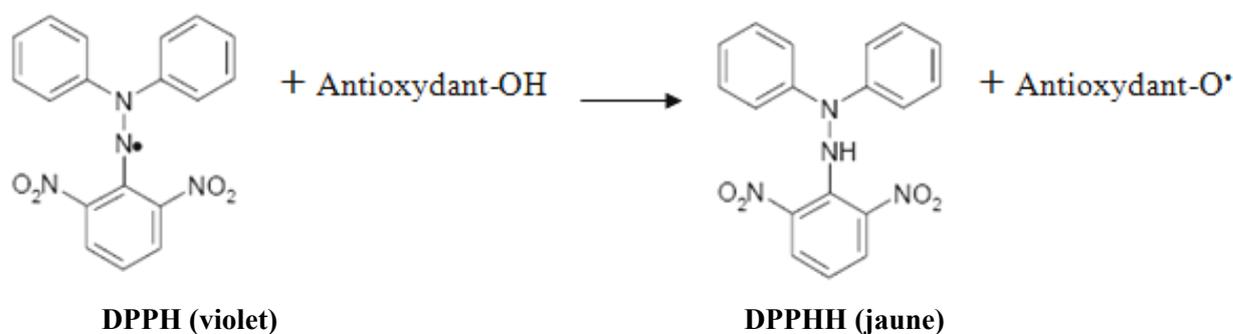


Figure 13. Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH

Les profils d'activité antiradicalaire obtenus (**Figure 14**) révèlent que les extraits de *Nigella sativa* possèdent une activité antiradicalaire dose dépendante, les IC₅₀ de chacun des différents extraits ont été déterminées (**Tableau 7**). Pour mieux caractériser le pouvoir antiradicalaire, deux autres paramètres sont introduits :

- **Calcul de l'EC₅₀** qui prend en considération la concentration de DPPH dans le milieu réactionnel [concentration effective à 50%, EC₅₀ = (IC₅₀/mg de DPPH/ml)]
- **Calcul du pouvoir antiradicalaire (APR)** qui est inversement proportionnel à l'EC₅₀ (APR = 1/EC₅₀) (Prakash *et al.*, 2007).

Tableau 7. Activité antiradicalaire des extraits des graines de *Nigella sativa*

	IC ₅₀ (µg /ml)	EC ₅₀ (µg /µg DPPH)	APR
TBHQ	2,29 ± 0,05	0,10 ± 0,002	9,93 ± 0,250
Quercétine	1,48 ± 0,03	0,06 ± 0,001	15,41 ± 0,345
EBr	237,79 ± 3,15	10,42 ± 0,09	0,096 ± 0,001
EHx	394 ,53 ± 4,78	17,29 ± 0,13	0,058 ± 0,000
ECh	106 ,56 ± 1,28	4 ,67 ± 0,05	0,214 ± 0,002
EAc	121 ,62 ± 2,60	5,33 ± 0,11	0,187 ± 0,004
EAq	447 ,76 ± 1,48	19,62 ± 0,06	0,051 ± 0,000

Les valeurs représentent la moyenne de trois essais ± SD

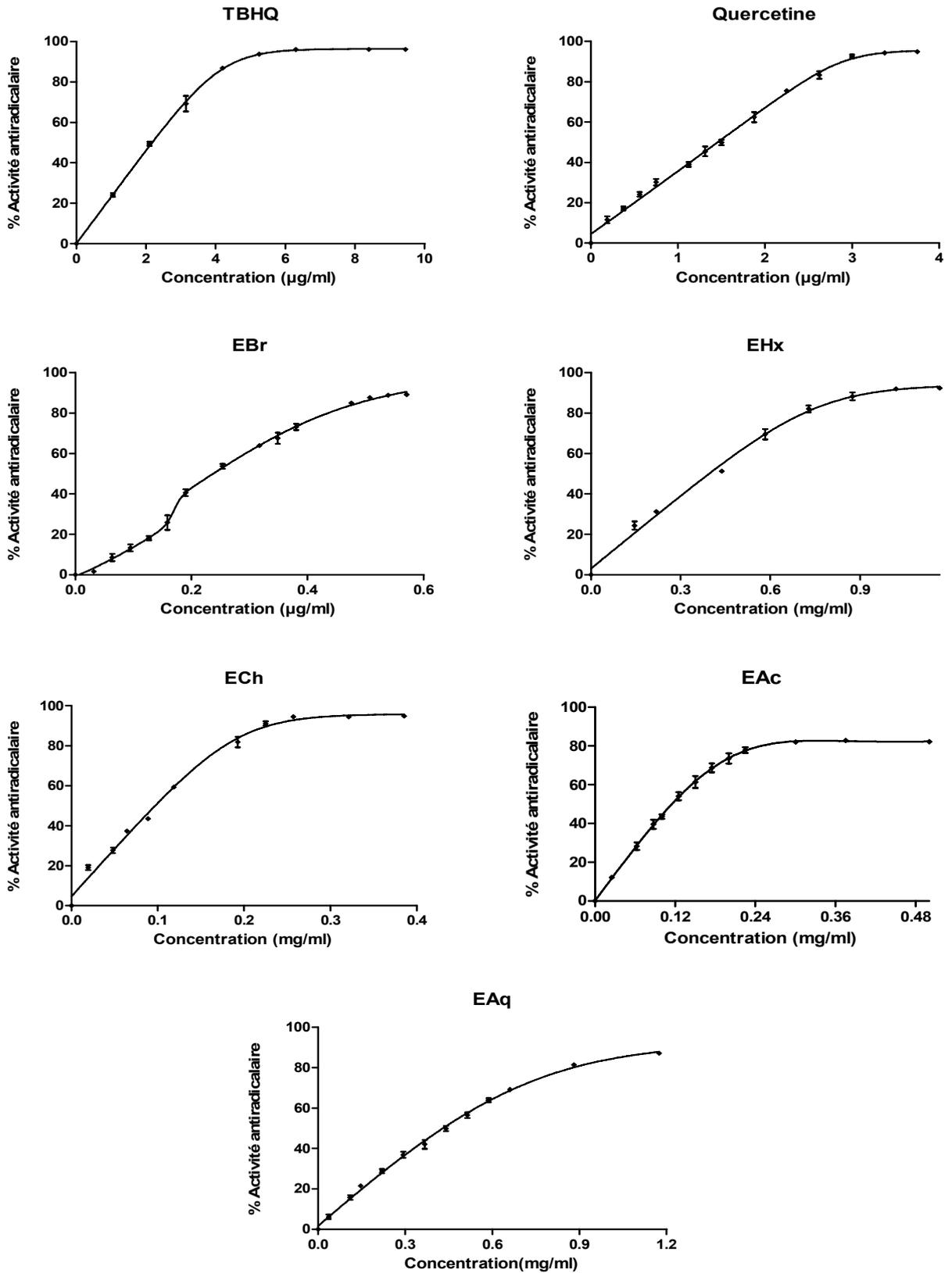


Figure 14. *Activité antiradicalaire des extraits des graines de Nigella sativa, de la quercétine et du TBHQ* (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD).

À des fins comparatives deux antioxydants standards sont utilisés; la quercétine et le TBHQ (analogue structurale de la thymoquinone). Ils ont montré une activité antiradicalaire très puissante avec des IC_{50} de l'ordre de 2.29 $\mu\text{g}/\text{mg}$ et 1.48 $\mu\text{g}/\text{mg}$ et des APR de l'ordre de 9.93 et 15.41 pour le TBHQ et la quercétine respectivement. La valeur d' IC_{50} de la quercétine est très proche de celle rapportée auparavant ($IC_{50}=1.31 \mu\text{g}/\text{mg}$) par Burit et Bucar (2000).

Parmi les cinq extraits de *Nigella sativa*, l'ECh représente l'extrait le plus actif avec une IC_{50} de l'ordre 106.56 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et un APR de 0.214 suivi par l'EAc avec une IC_{50} de 121.62 $\mu\text{g}/\text{mg}$ et un APR de 0.187. Ce qui confirme les résultats de la CCM de criblage. Par contre, l'activité antiradicalaire la plus faible a été exprimée par l'EAq et l'EHx ($IC_{50}= 447.76 \mu\text{g}/\text{ml}$, 394.53 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et APR de 0.051 et 0.058 respectivement) qui sont 3 à 4 fois moins actifs que l'ECh. Une activité intermédiaire a été obtenue avec l'EBr ayant une IC_{50} de l'ordre de 237.79 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et un APR 0.096, soit la moitié de l'activité exprimée par l'ECh.

En comparaison avec les antioxydants standards, tous les extraits testés s'avèrent moins actifs. Le TBHQ est 46 à 53 fois plus actif que l'ECh et l'EAc, la quercétine est 1,5 fois plus active que le TBHQ et 72 à 82 fois plus active que l'ECh et l'EAc. L'effet des extraits ECh et EAc est fort probablement attribué à leur richesse en composés phénoliques et en flavonoïdes. Pour l'EHx (qui représente l'huile fixe des graines de la nigelle), il renferme la teneur la plus faible en polyphénols et en flavonoïdes parmi les cinq extraits de *Nigella sativa* mais il possède une activité significativement supérieure ($p\leq 0,05$) à celle de l'EAq, ceci peut être dû à la contribution des huiles essentielles ainsi qu'à d'autres composés lipidiques dont l'activité antiradicalaire a été largement étudiée. Le carvacrol, le t-anthenol et le 4-terpineol aussi bien que la thymoquinone, sont de puissants agents réducteurs du radical DPPH, et piègeurs du radical hydroxyle (Burits et Bucar, 2000).

L'activité antiradicalaire d'autres composés de l'huile des graines de la nigelle a été investiguée par Ramadan et son équipe (2003). Cette étude a été menée sur l'huile fixe et ses fractions, en utilisant deux radicaux libres stables; le DPPH et le radical glavinoyl. L'activité antiradicalaire manifestée par l'huile brute a été interprétée par une action combinée des différents antioxydants endogènes contenus dans l'huile et elle est corrélée avec la teneur en acides gras polyinsaturés, en composés insaponifiables et en phospholipides, de même que la valeur peroxyde initiale de l'huile brute

Globalement, les résultats obtenus dans le présent travail indiquent l'existence d'une corrélation linéaire remarquable et significative entre le pouvoir antiradicalaire des cinq extraits de la nigelle et leur teneur en composés phénoliques ($r^2 = 0,98$, $p \leq 0,01$) et en flavonoïdes ($r^2 = 0,70$, $p \leq 0,01$). Comme l'on montré un grand nombre de travaux réalisés sur l'activité antiradicalaire d'extraits de plantes (Mansouri *et al.*, 2005; Beta *et al.*, 2005; Samaniego Sánchez *et al.*, 2007). En effet, les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes sont reconnus comme des substances potentiellement antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène, l'effet scavenger des flavonoïdes (FLOH) est attribué à leur faible potentiel redox qui les rend thermodynamiquement capable de réduire les radicaux libres (R^\bullet) par un transfert d'atome d'hydrogène à partir des groupements hydroxyle. Cette réaction donne naissance au radical aroxyde (FLO^\bullet) et à la molécule radicalaire rendu stable (RH), le FLO^\bullet subira par la suite un réarrangement structurale permettant la redistribution de l'électron célibataire sur le cycle aromatique et la stabilisation de radicaux aroxyde (Javanovic *et al.*, 1994).

Dans le but d'identifier les sites potentiels au sein des flavonoïdes qui sont responsables sur l'effet scavenger vis-à-vis du radical DPPH, plusieurs travaux ont étudié la cinétique et le mécanisme réactionnel des flavonoïdes avec ce radical stable. Amič et collaborateurs (2003) ont mis en évidence la relation structure fonction de 29 flavonoïdes (flavones, flavonols et flavanones) et leurs capacités de piéger le DPPH. Les résultats de cette étude ont montré que les flavonoïdes les plus efficaces sont ceux qui renferment des groupements 3',4'-dihydroxy sur le cycle B et/ou un groupement 3-OH sur le cycle C.

III.3.2. Effet scavenger de l'anion superoxyde (PMS-NADH-NBT)

Le pouvoir piègeur du radical anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) par les différents extraits des graines de *Nigella sativa* a été évalué spectrophotométriquement en suivant la diminution de la réduction de NBT (Nitroblue tetrazolium) en formazan ($\lambda_{max} = 560nm$) par le superoxyde produit chimiquement dans le système PMS-NADH. Les résultats obtenus montrent que tous les extraits piègent le radical superoxyde d'une manière dose dépendante (**Figure 15**) excepté l'extrait du chloroforme qui présente un profil d'activité biphasique ; dans la première phase l'ECh manifeste un effet scavenger dose dépendant jusqu'à atteindre un maximum d'activité de 60% pour une concentration de 0,45mg/ml. Au delà de cette concentration l'effet de l'ECh s'inverse et s'exprime par une diminution brusque de son effet scavenger. Ce phénomène peut être expliqué par un changement du comportement de l'extrait de l'effet antioxydant à l'effet prooxydant ou par le fait que le pourcentage de molécules prooxydantes dépasse largement celui des molécules antioxydantes à un certain seuil de concentration d'extrait.

L'extrait de chloroforme présente un grand paradoxe, d'une part c'est l'extrait le plus riche en composés phénoliques et en flavonoïdes, il possède également la valeur d'IC₅₀ la plus faible en comparaison avec les autres extraits (**Tableau 8**) donc c'est l'extrait le plus actif. De l'autre part c'est le seul extrait qui a montré des propriétés prooxydantes. Ceci n'est pas vraiment surprenant dans la mesure où les composés phénoliques agissent généralement comme antioxydants à faible concentration, mais à forte concentration ils peuvent devenir prooxydants par leur autooxydation conduisant à la formation de semiquinone et du radical superoxyde (Mochizuki *et al.*, 2002 ; Jayaprakasha et Patil, 2007).

Tableau 8. Effet scavenger des extraits des graines de *Nigella sativa* vis-à-vis du superoxyde produit dans le système PMS-NADH-NBT.

	IC ₅₀
BHT	344.59 ± 35.3 µg/ml
Quercétine	33.69 ± 0.35 µg/ml
EBr	6.88 ± 0.068 mg/ml
EHx	371.80 ± 7.10 µg/ml
ECh	361.86 ± 22.42 µg/ml
EAc	5.58 ± 0.28 mg/ml
EAq	9.24 ± 0.067 mg/ml

Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais ± SD

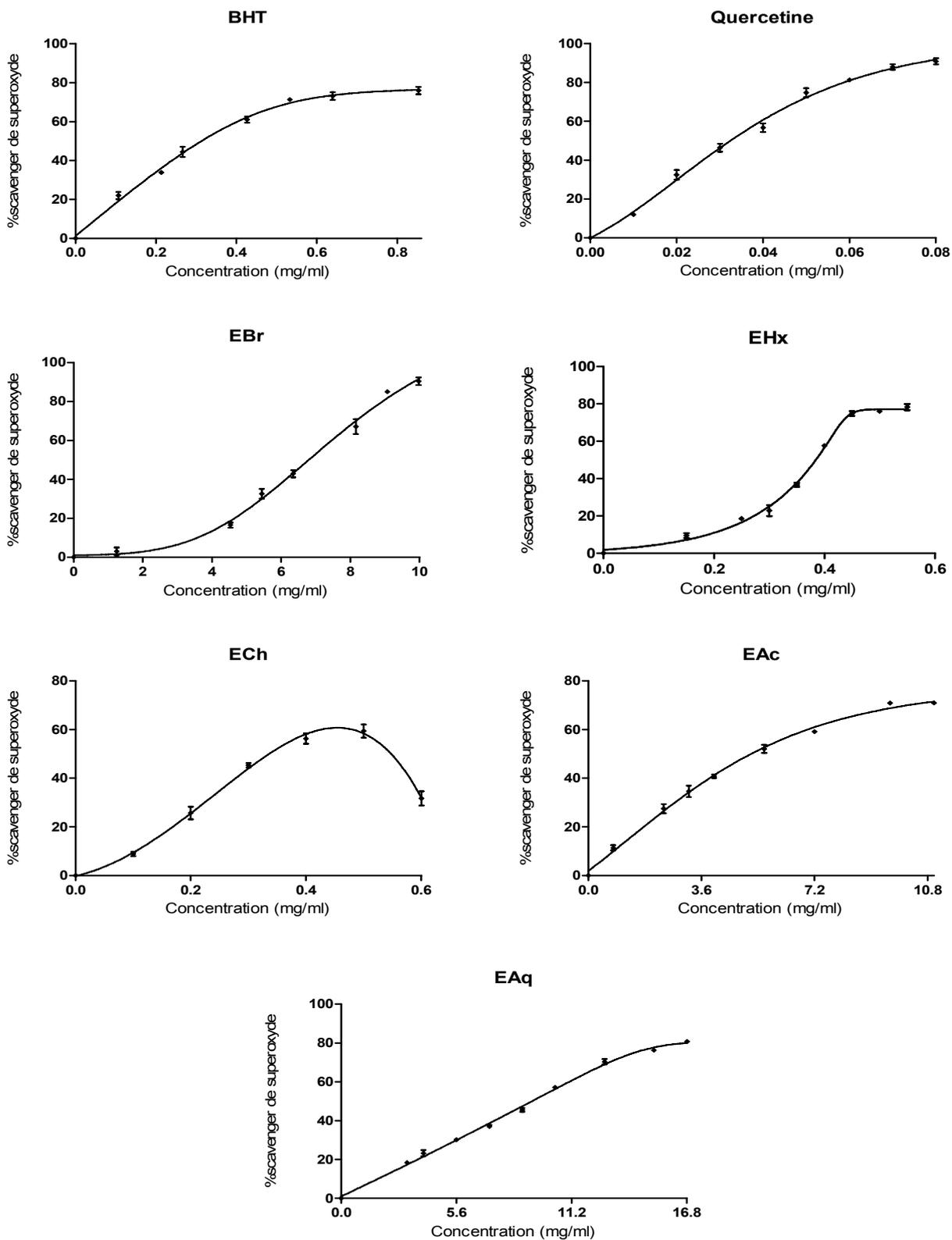


Figure 15. Effet piègeur du radical superoxyde produit dans le système (PMS-NADH-NBT) par les extraits des graines de *Nigella sativa*, la quercétine et le BHT (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD).

D'après Simić *et al* (2007) l'effet antioxydant/prooxydant des composés phénoliques est déterminé par leur concentration, le nombre et la position des groupements hydroxyles portés sur ces composés, le pH et la concentration des métaux de transition dans le milieu réactionnel. Pratiquement, l'effet antioxydant/prooxydant de certains extraits de plantes a été également mis en évidence dans plusieurs travaux récents; Zubia et collaborateurs (2007) ont constaté que l'extrait de l'algue marine *Chondria baileyana* possède un effet scavenger de l'anion superoxyde (produit dans le système PMS-NADH-NBT) à faibles concentrations mais au delà de 1mg/ml l'extrait devient prooxydant. De même, Chen et Yen (2007) ont rapporté que les extraits des feuilles de *Psidium guajava* possèdent des propriétés scavenger significatives sur les radicaux peroxydes mais lorsque la concentration dépasse 10µg/ml ces extraits se comportent comme prooxydants.

Mise à part son effet prooxydant, l'extrait ECh représente avec l'EHx les deux extraits les plus actifs parmi les cinq extraits testés dans cette étude, avec des IC₅₀ respectives de 361.86 ± 22.42 et 371.80 ± 7.10 µg/ml. L'effet scavenger de ces deux extraits (ECh et EHx) est statistiquement similaire (p<0.001) à celui de l'antioxydant standard BHT (IC₅₀=344.59 ± 35.3 µg/ml) qui est 10 fois moins actif que la quercétine (IC₅₀ = 33.69 ± 0.35 µg/ml). Contrairement à l'ECh et l'EHx, l'effet scavenger des extraits EAc, EBr ,EAq est très faible avec des valeurs IC₅₀ de l'ordre du mg/ml ; 5.58 mg/ml, 6.88 mg/ml et 9.24 mg/ml respectivement.

L'effet piègeur du O₂[•] (produit dans le système PMS-NADH-NBT) par l'extrait méthanolique des tiges et des racines de *Nigella sativa* a été étudié par Bourgou *et al* (2008) où les doses effectrices (IC₅₀ =16 µg/ml et 15 µg/ml pour les tiges et les racines respectivement) étaient largement inférieures à celles obtenues avec les cinq extraits des graines de *Nigella sativa*.

L'effet de l'ECh semble être lié à sa richesse en polyphénols et en flavonoïdes. Cependant, ce n'est pas le cas pour l'extrait d'hexane, le plus pauvre en polyphénols et plus particulièrement en flavonoïdes. Son activité est donc partiellement attribuée à la présence d'autres substances plus actives que celles présentes dans les autres extraits. Ces substances sont probablement les huiles essentielles qui représentent entre 0.18 à 0.50% du poids des graines et entre 1.4–1.9% du poids de l'huile fixe (Benkaci-Ali *et al.*, 2006). L'effet piègeur des espèces oxygénées réactives par des composés purs contenus dans l'huile essentielle a été largement étudié. La thymoquinone, l'un des composés majoritaires de cette huile, inhibe la génération du radical O₂[•] par le système xanthine/xanthine oxydase (IC₅₀ = 3.35 ± 0.25 µM) sans avoir le moindre effet sur l'activité de

l'enzyme elle-même à cette dose (Badary *et al.*, 2003). De même la thymoquinone et son dimère la dithymoquinone montrent également des propriétés proches de celles de la SOD, appelées 'SOD like' en piégeant le radical $O_2^{\cdot-}$ alors que le thymol possède un effet scavenger de l'oxygène singulier (Kruk *et al.*, 2000).

À l'exception de l'extrait d'hexane, tous les extraits testés dans cette étude présentent une corrélation linéaire significative entre leurs effets scavenger de l'anion superoxyde et leurs teneurs en composés phénoliques ($r^2=0.76$, $p<0,01$) et en flavonoïdes ($r^2=0.91$, $p<0,01$).

Globalement, les résultats obtenus sont en accord avec ceux rapportés auparavant par Boudiaf (2006), qui a utilisé le système enzymatique (xanthine /xanthine oxydase) pour la génération du radical superoxyde. Mais, pour faire la distinction entre les extraits doués d'un effet scavenger proprement dit de ceux ayant un effet inhibiteur sur la génération du superoxyde, l'auteur a fait recours à deux techniques complémentaires; la technique de la chemiluminescence (permettant la détection du superoxyde présent dans le milieu) et une technique spectrophotométrique (pour suivre l'inhibition de l'enzyme génératrice du superoxyde). Ce n'est qu'après l'analyse des valeurs d' IC_{50} obtenues par les deux techniques, que l'auteur a pu montrer que les extraits ECh et EAc possèdent un effet piègeur très important du superoxyde produit par la xanthine oxydase (XO) à côté de leurs effets inhibiteurs de cette enzyme et que l'EAc inhibe la XO de la même façon que l'ECh et l'EHx, mais son effet piègeur est très faible. Alors que l'EBr et l'EAq sont à la fois de faibles piègeurs du superoxyde et de faibles inhibiteurs de sa production.

En tenant compte des données fournies par l'ensemble de ces études, y compris la notre, l'utilisation d'un système purement chimique (PMS-NADH-NBT) pour l'étude de l'effet scavenger du radical anion superoxyde paraît plus avantageuse qu'un système enzymatique xanthine/XO, elle permet en effet d'éviter les interférences liées à l'inhibition directe de l'enzyme (Etcheverry *et al.*, 2007).

III.3.3. Chélation du fer ferreux

La chélation des ions ferreux a été estimée selon la méthode de Le *et al* (2007) dont laquelle la Ferrozine peut quantitativement former un complexe avec le fer (Fe^{2+} -Ferrozine); chromophore 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 rouge qui est suivie spectrophotométriquement.

Les résultats obtenus montrent que les différents extraits de *Nigella sativa* ainsi que les standards interfèrent d'une manière dose dépendante avec la formation du complexe (Fe^{2+} -Ferrozine), suggérant qu'ils possèdent une activité chélatrice tout en capturant l'ion ferreux avant qu'il soit complexé avec la Ferrozine. À partir des profils de chélation obtenus (**Figure 16**), il semble que la linéarité des tracés avant la saturation est plus importante dans le cas de l'EDTA; ligand hexadénate dont la constante de liaison avec le fer est de l'ordre de $4,9 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ (Kolayli *et al.*, 2004). Cependant pour les extraits cette linéarité est moins importante. Cela reflète simplement la nature complexe des extraits contenant un ou plusieurs chélateurs ayant des affinités différentes pour le fer, en concurrence avec la Ferrozine. Toutefois, l'effet chélateur est saturable à la haute concentration d'extrait.

La valeur d' IC_{50} 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_{50} de $5,6 \mu\text{g/ml}$ rapportée par Le et ses collaborateurs (2007). Pour mieux caractériser l'efficacité des extraits leurs activités chélatrices sont exprimées en terme de mg d'équivalent d'EDTA/g d'extrait (**Tableau 9**).

Tableau 9. *Activité chélatrice des ions ferreux par les extraits des graines de Nigella sativa.*

	IC_{50} (mg/ml)	Activité chélatrice (mg E-EDTA/g d'extrait)
EDTA	$6,87 \pm 0,131^*$	—
Quercétine	$0,55 \pm 0,024$	$12,402 \pm 0,535$
EBr	$0,316 \pm 0,003$	$22,021 \pm 0,227$
EHx	$13,137 \pm 0,376$	$0,523 \pm 0,007$
ECh	$4,103 \pm 0,104$	$1,675 \pm 0,042$
EAc	$0,173 \pm 0,011$	$39,704 \pm 2,637$
EAq	$0,169 \pm 0,000$	$40,578 \pm 0,114$

* $\mu\text{g/ml}$.

Les valeurs représentent la moyenne de trois essais \pm SD.

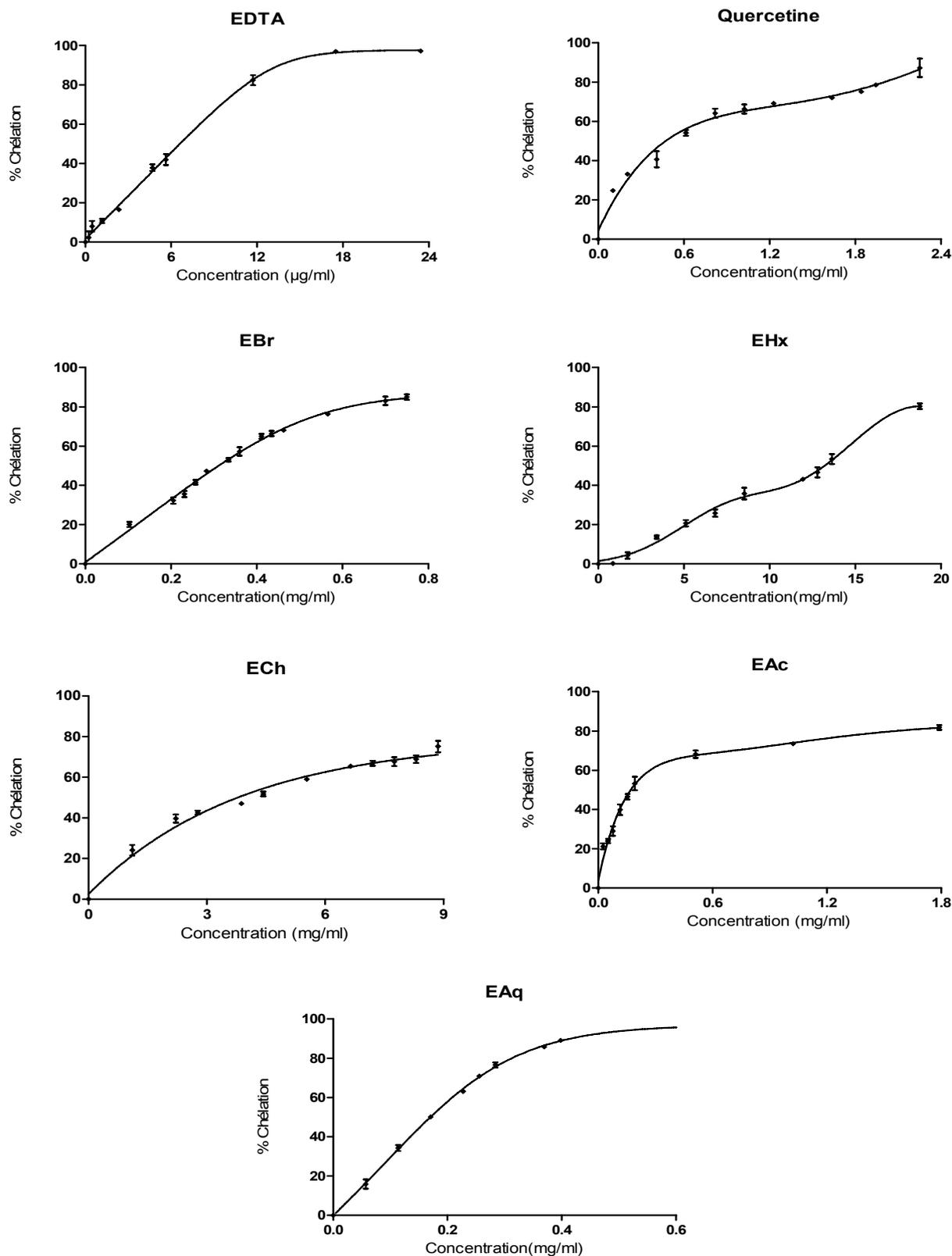


Figure 16. *Activité chélatrice des extraits des graines de Nigella sativa, de l'EDTA et de la quercétine (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD).*

Les valeurs d'IC₅₀ des différents extraits testés montre une grande variation allant de 0,169 µg/ml à 13,137 mg/ml. Les extraits EAq et EAc semblent avoir l'activité chélatrice la plus importante avec des IC₅₀ respectives de 0,169 et 0,173 mg/ml (soit 40,578 et 39,704 mg E-EDTA/g d'extrait), suivis par l'extrait brut (IC₅₀=0,316 mg/ml), en comparaison avec la quercétine, ces trois extraits s'avèrent 1,75 à 3,27 fois plus actifs. Cette constatation trouve sûrement son explication, dans un effet synergique entre les constituants de ces extraits. En outre, le pouvoir chélateur des extraits ECh et EHx est très faible (IC₅₀ = 4,10 et 13,137mg/ml), soit 24 à 77 fois moins actif que l'EAq et 7 à 24 fois moins actif que la quercétine.

De nombreuses études ont évalué l'effet chélateur des ions ferreux par les extraits de diverses plantes. L'étude menée par Le et ses collaborateurs (2007) montre que la concentration effectrice de l'extrait éthanolique des fruit de *Lycium barbarum* est de l'ordre de 10 mg/ml, cette valeur est nettement supérieure aux valeurs obtenues avec les différents extraits des graines de *Nigella sativa* excepté l'EHx ayant une valeur d'IC₅₀ comparable, ce qui reflète une importante activité chélatrice des graines de *Nigella sativa*.

L'activité chélatrice d'autres parties de la plante *Nigella sativa* a été investiguée par Bourgou et son équipe (2008), cette étude réalisée sur l'extrait méthanolique des tiges et racines de *Nigella sativa* révèle une activité chélatrice très faible par rapport à l'extrait brut méthanolique (EBr) des graines, les valeurs d' IC₅₀ obtenues sont de 7,5 mg /ml et 3,8 mg/ml pour les racines et les tiges respectivement.

La capacité chélatrice est très importante du fait qu'elle réduit la concentration de métaux de transitions catalyseurs de la peroxydation lipidique. En effet, le fer peut stimuler l'oxydation des lipides par la réaction de Fenton, et accélère également cette oxydation en décomposant les hydroperoxydes en radicaux peroxydes et alcoxydes qui peuvent à leur tour entretenir la réaction en chaîne (Elmastaş *et al*, 2006). Il a été rapporté que les agents chélateurs qui forment une liaison de type σ avec les métaux sont actifs comme antioxydants secondaires car ils réduisent le potentiel redox et stabilisent la forme oxydée de l'ion métallique (Suresh-Kumar *et al*, 2008).

Selon la littérature, les composés phénoliques s'avèrent comme de bons chélateurs des ions métalliques (Morris, 1995; Brown, 1998). Cependant, dans la présente étude une corrélation faible et non significative ($r^2 = 0.15$, $p \geq 0.05$) a été mise en évidence entre le pouvoir chélateur des extraits des graines de *Nigella sativa* et leurs teneurs en composés phénoliques. Des résultats

similaires ont été rapportés dans d'autres travaux récents. À titre d'exemple, dans une étude menée sur des extraits de quatorze variétés d'orge, Zhao et collaborateurs (2008) ont mis en évidence l'existence d'une corrélation très faible et non significative ($r = 0.041$, $p \geq 0.05$) entre l'activité chélatrice de ces extraits et leurs teneurs en composés phénoliques.

Ces constatations pourraient indiquer que les composés phénoliques ne sont pas les principaux chélateurs présents dans les extraits qui sont en fait un mélange complexe d'acides organiques (acides citrique, malique, tartrique, oxalique, lipoïque et phytique...etc.), d'acides aminés et de sucres qui peuvent contribuer également à la séquestration des métaux de transition (Wong *et al.*, 2006). Les composés contenant le nitrogène sont généralement des chélateurs plus puissants que les composés phénoliques (Chan *et al.*, 2007). De plus, la capacité chélatrice d'un composé phénolique dépend de la disponibilité d'un certain nombre de groupements fonctionnels convenablement orientés (Van Acker *et al.*, 1996). Donc un échantillon riche en composés phénoliques ne pourrait pas chélater les métaux de transition si ses polyphénols ne disposent pas des groupements fonctionnels nécessaires pour l'activité chélatrice. Les ligands bidentates sont des chélateurs plus puissants que les monodentates, par exemple un groupement catéchol se lie fortement au fer contrairement à un groupement phénol, de même la conjugaison d'un composé phénolique avec une partie glucidique entraîne la perte de l'activité chélatrice (Wong *et al.*, 2006).

III.3.4. Test de blanchissement du β -carotène

Dans ce test l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, suite à l'abstraction des atomes d'hydrogènes à partir de groupements méthylènes diallyliques de l'acide linoléique. Ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β -carotène hautement insaturé entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie spectrophotométriquement à 490 nm. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène. La cinétique de blanchissement du β -carotène en absence et en présence des extraits de *Nigella sativa*, des antioxydants standards et les activités antioxydantes relatives (AAR) sont représentés dans les **Figures 17 et 18**.

D'après ces résultats, il est évident que tous les standards et les extraits testés inhibent d'une manière efficace et significative ($p \leq 0,01$) l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β carotène par rapport au contrôle négatif qui représente 100% de la peroxydation. Les deux extraits EAc et ECh montrent la plus grande activité inhibitrice. Etant donné qu'il n'existe pas une différence significative entre ces deux extraits, la valeur moyenne d'activité antioxydante relative est de 69,82%, mais cette activité reste significativement inférieure ($p \leq 0,01$) à celle du BHT (100%) et du α -tocophérol (87,21%) utilisés comme contrôles positifs. Une activité antioxydante intermédiaire a été obtenue avec l'EHx (48,58%) qui est statistiquement similaire ($p \leq 0,01$) à celle de l'EBr (47,91%) mais significativement supérieure ($p \leq 0,01$) à celle de l'EAq (26%) qui représente l'extrait le moins actif. En comparaison avec les antioxydants de référence, l'ECh et l'EAc sont 1,2 fois moins actifs que α -tocophérol et 1,4 fois moins actifs que le BHT. L'EAq est 1,8 fois moins actif que l'EHx et l'EBr et 2,7 fois moins actif que l'ECh et l'EAc, soit 3,3 à 3,8 fois moins actif que l' α -tocophérol et le BHT respectivement.

On peut donc résumer l'ordre décroissant des extraits testés en terme d'activité antioxydante relative comme suit : EAc = ECh > EHx = EBr > EAq. On constate d'une part que les extraits apolaires ou moyennement apolaires (EAc, ECh, EHx) sont plus actifs que l'extrait polaire (EAq). D'autre part, les extraits les plus riches en composés phénoliques sont les extraits les plus actifs (ECh et EAc).

En effet, à l'exception de l'EHx qui représente l'extrait le moins polaire et le plus pauvre en composés phénoliques/flavonoïdes, une corrélation linéaire remarquable et significative a été mise en évidence entre l'AAR des extraits de *Nigella sativa* et leurs teneurs en composés phénoliques ($r^2 = 0.85$, $p \leq 0,05$) et en flavonoïdes ($r^2 = 0.81$, $p \leq 0,05$).

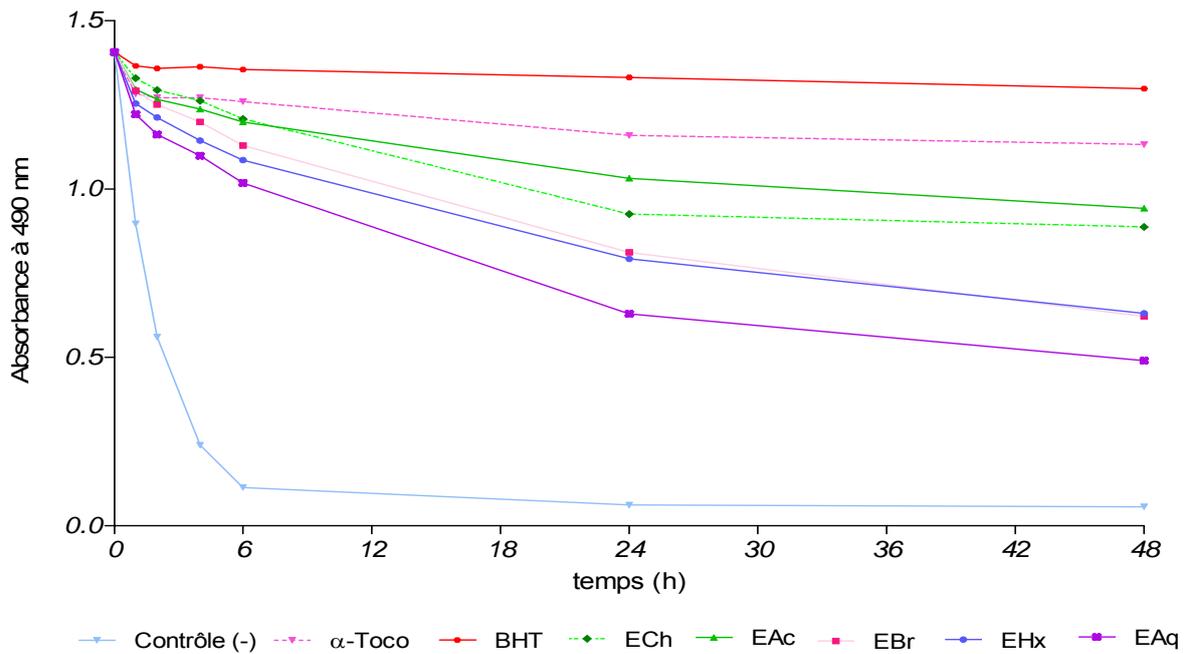


Figure 17. Cinétique de blanchissement du β -carotène à 490 nm en absence et en présence des extraits de *Nigella sativa*, du BHT, α -tocophérol (chaque valeur représente la moyenne de trois essais).

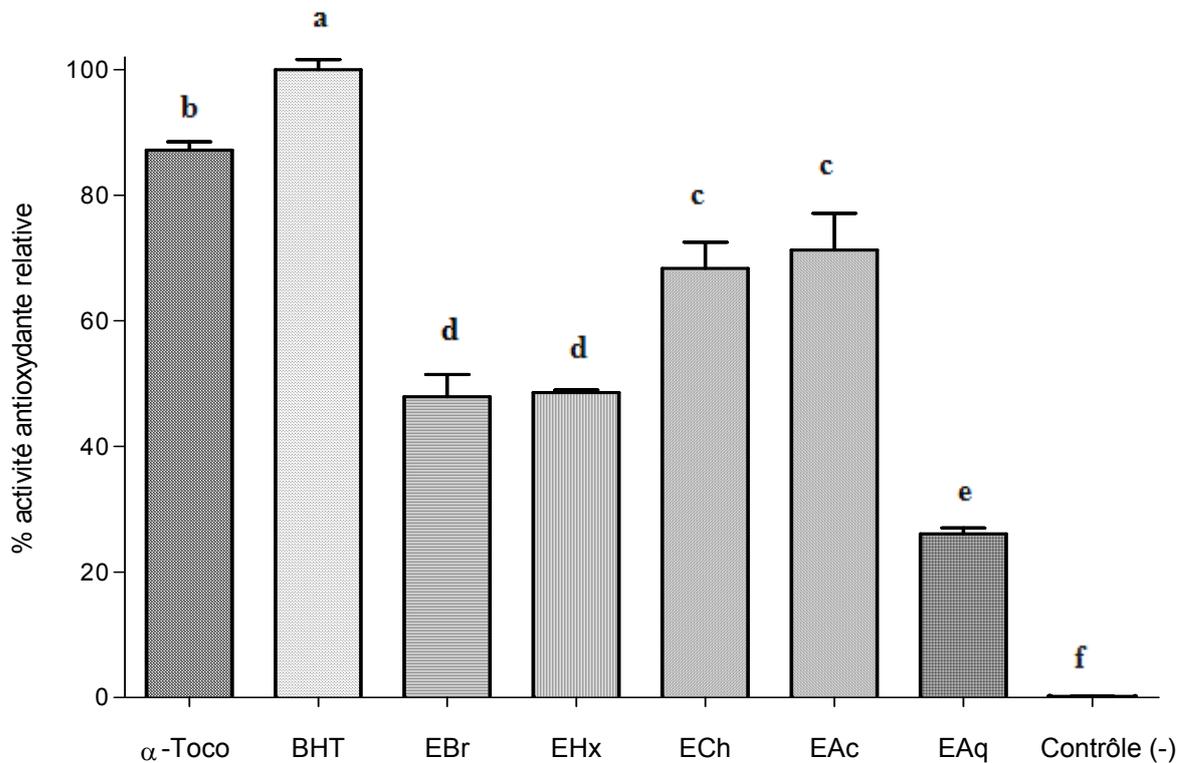


Figure 18. Activité antioxydante relative des extraits des graines de *Nigella sativa*, du BHT et de l' α -tocophérol dans le système β -carotène/acide linoléique (les valeurs sont la moyenne de trois mesures \pm SD), les barres avec des lettres différentes indiquent des activités significativement différentes ($p \leq 0,01$).

En plus de la contribution probable des huiles essentielles à l'activité de l'EHx, dans le système β -carotène/acide linoléique un autre paramètre semble intervenir; la polarité de l'extrait. On peut donc expliquer l'activité des extraits apolaires par le paradoxe des phénomènes polaires comme il est décrit par Frankel et ses collaborateurs (1994). Etant donné que le test de blanchissement du β carotène est similaire à un système d'émulsion de lipides dans l'eau, Frankel et Meyer (2000) ont proposé que les antioxydants apolaires exposent des propriétés antioxydantes plus importantes car ils sont concentrés au sein de l'interface lipide-eau, permettant ainsi de prévenir la formation de radicaux lipidiques et l'oxydation du β -carotène. Alors que les antioxydants polaires restent dilués dans la phase aqueuse et sont ainsi moins efficaces dans la protection des lipides.

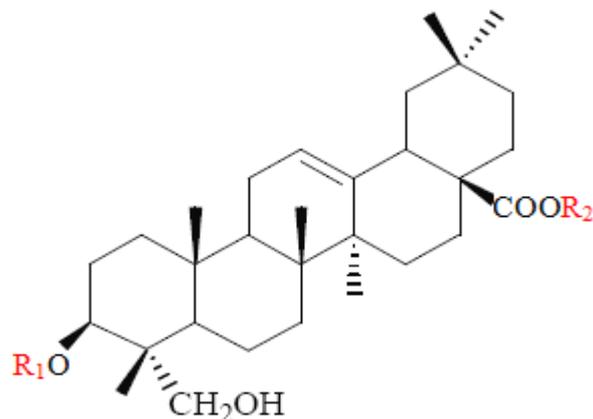
Un extrait qui retarde ou inhibe le blanchissement du β -carotène peut être décrit comme un piègeur de radicaux libres et comme un antioxydant primaire (Liyana-Pathirana *et al.*, 2006). Selon plusieurs auteurs, le test d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplée à celle du β -carotène, paraît très utile comme un modèle mimétique de la peroxydation des lipides dans les membranes biologiques (Ferreria *et al.*, 2006).

III.3.5. Test, *in vitro*, de la résistance des globules rouges humains prétraités par les extraits des graines *Nigella sativa* à l'attaque radicalaire

Les érythrocytes constituent un modèle cellulaire très adéquat pour l'étude du stress oxydant. En raison de la richesse de leurs membranes en acides gras polyinsaturés et la concentration cellulaire élevée en oxygène et en l'hémoglobine, ces cellules sont extrêmement susceptibles aux endommagements oxydatifs (Arbos *et al.*, 2008 ; Çimen, 2008). L'exposition des érythrocytes à une attaque radicalaire conduit donc à la rupture de leurs membranes plasmiques avec libération du contenu cellulaire mesurable à 540 nm.

Ce système cellulaire aurait pu être très utile pour l'étude de l'effet protecteur des extraits des graines de *Nigella sativa* contre l'hémolyse oxydative induite par le *t*-BHP. Cependant, ce test n'a pas pu être réalisé car on a constaté durant l'incubation des érythrocytes avec les extraits et avant l'exposition à l'attaque radicalaire que les extraits eux mêmes provoquent une hémolyse importante. Ces constatations viennent en contradiction avec les travaux de Suboh *et al* (2004) qui ont rapporté que l'extrait des graines de *Nigella sativa* protègent les érythrocytes contre les endommagements oxydatifs induits par l'eau oxygénée (H₂O₂). Cependant, les travaux de Costa-Lotufo *et al* (2005), ont montré, dans une étude menée sur l'effet cytotoxique et hémolytique des extraits de onze plantes y compris *Nigella sativa*, que l'extrait de ses graines présentait l'effet hémolytique le plus puissant, par rapport aux extraits d'autres plantes testés, sur les érythrocytes de souris avec une EC₅₀ de l'ordre de 116,8 µg/ml.

Selon la littérature, l'effet hémolytique des extraits de plantes est attribué à la présence des saponosides (Chwalek, 2004). Ces composés, connus depuis très longtemps pour leur propriété tensioactive (solution moussante dans l'eau) ou encore leur capacité à lyser les globules rouges, sont des métabolites secondaires de nature amphiphile. Cette propriété lytique a conduit à la mise en place de tests hémolytiques permettant la détection de saponines dans les drogues ou les extraits de plantes (Sparg *et al.*, 2004). De même, elle est actuellement utilisée dans les laboratoires d'analyses hématologiques afin de détruire les globules rouges du sang et effectuer les numérations leucocytaires (Chwalek, 2004). Effectivement, plusieurs études phytochimiques ont mis en évidence la présence de saponosides dans les extraits des graines de *Nigella sativa*. En 2001, Kumara et Huat ont isolé une saponoside triterpénique à hédéragénine douée de propriétés antitumorales appelée l' α -hederine. Ultérieurement, Taskin et collaborateurs (2005) ont réussi à isoler, à partir de l'extrait méthanolique des graines de *Nigella sativa*, et à identifier trois autres saponosides triterpéniques apparentées à l' α -hederine (**Figure 19**).



R₁	R₂
α -L-rha (1-2)- α -L-ara	H
β -D-xyl (1-3)- α -L-rha (1-2)- α -L-ara	H
α -rha (1-2)- α -L-ara	α -rha (1-4)- β -D-glu(1-6)- β -D-glu
β -D-xyl (1-3)- α -L-rha (1-2)- α -L-ara	α -rha (1-4)- β -D-glu (1-6)- β -D-glu

Figure 19. Structure des saponosides à hédéragénine isolés à partir des graines de *Nigella sativa* (Taskin *et al.*, 2005; Chwalek, 2004).

Chwalek et collaborateurs (2006) ont étudié la relation structure-activité hémolytique de certaines saponosides à hédéragénine, et ont montré que l' α - hederine est la molécule la plus active avec une EC₅₀ de l'ordre de 11 μ M. Selon ces auteurs, cette activité est attribuée à la présence de la séquence glucidique α -L-rha (1-2)- α -L-ara qui est caractéristique des saponosides les plus cytotoxiques. Le mécanisme hémolytique des saponosides est dû à la formation d'un complexe avec le cholestérol membranaire formant des structures assimilables à des pores ou des puits (**Figure 20 a**), altérant ainsi la perméabilité membranaire et conduisant à la destruction du globule rouge (Sparg *et al.*, 2004). Les auteurs proposent un arrangement bidimensionnel de type micellaire pour ces puits, la partie lipophile du saponoside (génine) complexée avec le cholestérol formerait la partie extérieure du micelle (**figure 20 b**). Celle-ci serait associée avec les lipides membranaires, la partie hydrophile constituée de la chaîne osidique, serait dirigée vers l'intérieur du micelle en contact avec la phase aqueuse (Chwalek, 2004).

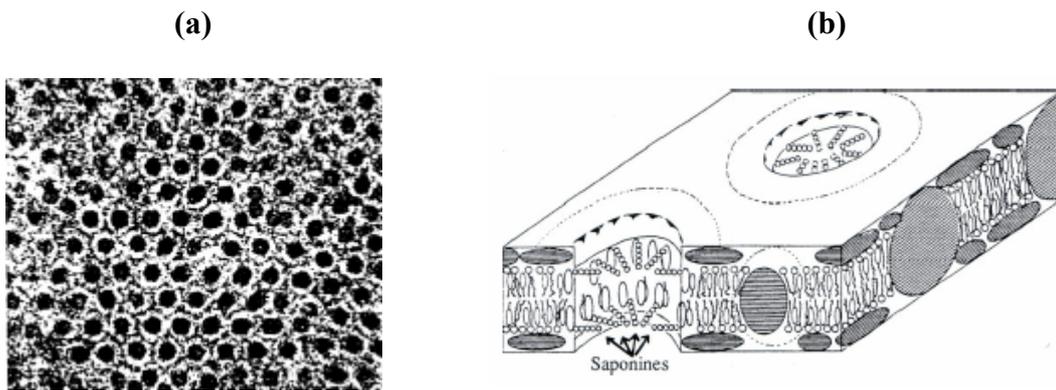


Figure 20. Effet des saponosides sur la membrane érythrocytaire (D'après Chwalek, 2004)

- (a) Microscopie électronique d'une membrane érythrocytaire traitée par un saponoside avec formation de puits ayant une forme hexagonale entourés par un anneau d'un diamètre de $85 \pm 10\text{Å}$ et une profondeur de $40 \pm 20\text{Å}$.
 (b) Arrangement possible des saponosides dans la membrane érythrocytaire.

En somme, ces constatations de l'effet hémolytique des extraits des graines de *Nigella sativa* n'excluent pas la présence d'autres composés doués d'activité antioxydante dans un système cellulaire permettant de protéger les érythrocytes contre l'hémolyse oxydative. Cependant, pour mettre en évidence l'activité de ces composés, il serait nécessaire d'éviter le contact direct de l'extrait avec les globules rouges. L'étude *in vivo* avec une administration *per os* de l'extrait offrira probablement cette possibilité.

III.4. ÉTUDE, *IN VIVO*, DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DE L'EXTRAIT BRUT MÉTHANOLIQUE ET DE L'HUILE FIXE COMMERCIALE DES GRAINES DE *Nigella sativa*

III.4.1. Effet sur la capacité antioxydante totale du sang

Il est largement accepté que les régimes alimentaires riches en fruits, en légumes et en huiles végétales permettent l'augmentation du potentiel antioxydant qui revient par plusieurs effets bénéfiques sur la santé (Chu *et al.* 2002). Dans ce contexte, l'effet du traitement par l'extrait brut méthanolique et par l'huile fixe des graines de *Nigella sativa*, sur l'état de défense globale des souris vis-à-vis des radicaux libres a été évalué par le test KRL (kit Radicaux Libres). Ce test, réalisé sur le sang entier des souris, considère toutes les défenses de l'organisme, étant donné que le sang contient les diverses classes d'antioxydants moléculaires et enzymatiques (Stocker *et al.*, 2003). Ces antioxydants se mobilisent lors d'une attaque radicalaire induite *ex vivo* par le *t*-BHP pour protéger l'intégrité des érythrocytes présentes dans l'échantillon sanguin et retarder ainsi leur hémolyse. La résistance du sang à l'attaque radicalaire est exprimée par le temps nécessaire à la lyse de 50% des érythrocytes (HT₅₀).

À partir des cinétiques d'hémolyses obtenues (**Figure 21**), il paraît que le traitement par l'extrait brut méthanolique et l'huile fixe entraîne un retardement de l'hémolyse qui est évident dans un décalage des sigmoïdes d'hémolyse vers la droite. Effectivement les valeurs d'HT₅₀ calculées révèlent un prolongement du temps de demie hémolyse chez tous les groupes traités par rapport au groupe contrôle (CTL) (**Figure 22**). Cependant, pour les souris du groupe EM1 traités par l'extrait méthanolique (300 mg/kg), l'augmentation de l'HT₅₀ (HT₅₀=117,33 ± 3,23 min) reste statistiquement non significative en comparaison avec le groupe contrôle (HT₅₀=106,77 ± 2,36 min).

Par contre, l'administration d'une dose plus élevée d'extrait méthanolique (500 mg/kg) chez les souris du groupe EM2 a provoqué un retardement significatif ($p \leq 0,05$) de l'hémolyse (HT₅₀=125,17 ± 7,15 min), l'augmentation de l'HT₅₀ est plus importante et plus significative (HT₅₀=136,01 ± 3,11 min, $p \leq 0,001$) chez les souris du groupe EM3 traités par la troisième dose (800mg/kg) de l'extrait méthanolique. Cela permet de mettre en évidence un effet dose dépendant de l'extrait sur l'accroissement des défenses antioxydantes globales.

Parallèlement, le traitement des souris des groupes HF1 et HF2 par deux doses croissantes (2ml/Kg et 4ml/kg) de l'huile fixe a entraîné également un retardement significatif ($p \leq 0,01$) de l'hémolyse où les HT₅₀ sont de 132,15 ± 2,96 min et 133,6 ± 4,46 min respectivement.

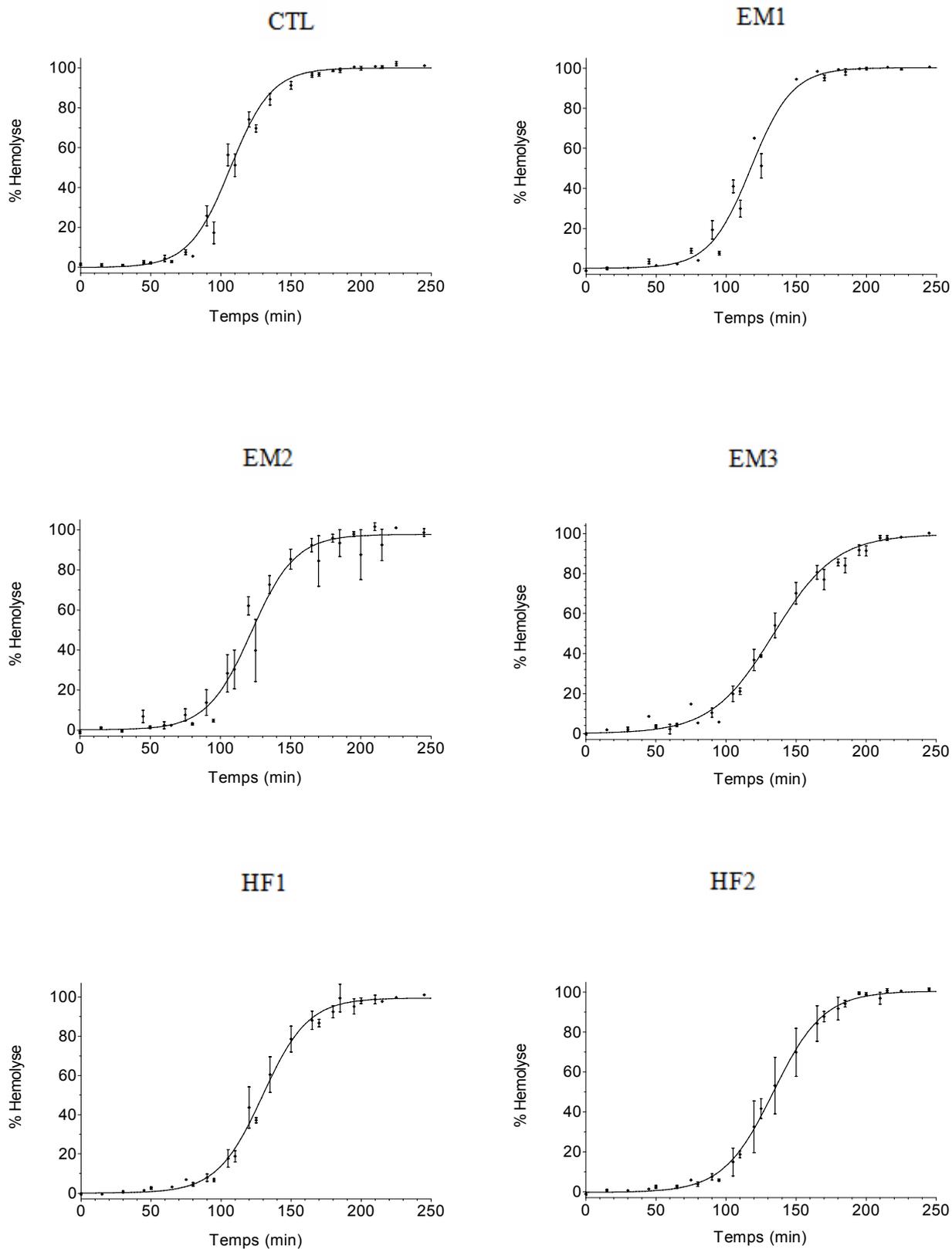


Figure 21. Cinétique de la lyse érythrocytaire en présence de *t*-BHP pour les différents groupes.

Les valeurs sont les moyennes \pm SEM (n = 6-7). **Groupes** : [CTL (groupe contrôle gavé par une solution saline normale) ; EM1, EM2, EM3 (groupes traités par l'extrait méthanolique 300, 500 ,800 mg/kg respectivement ; HF1, HF2 (groupes traités par l'huile fixe 2 et 4ml/kg respectivement)].

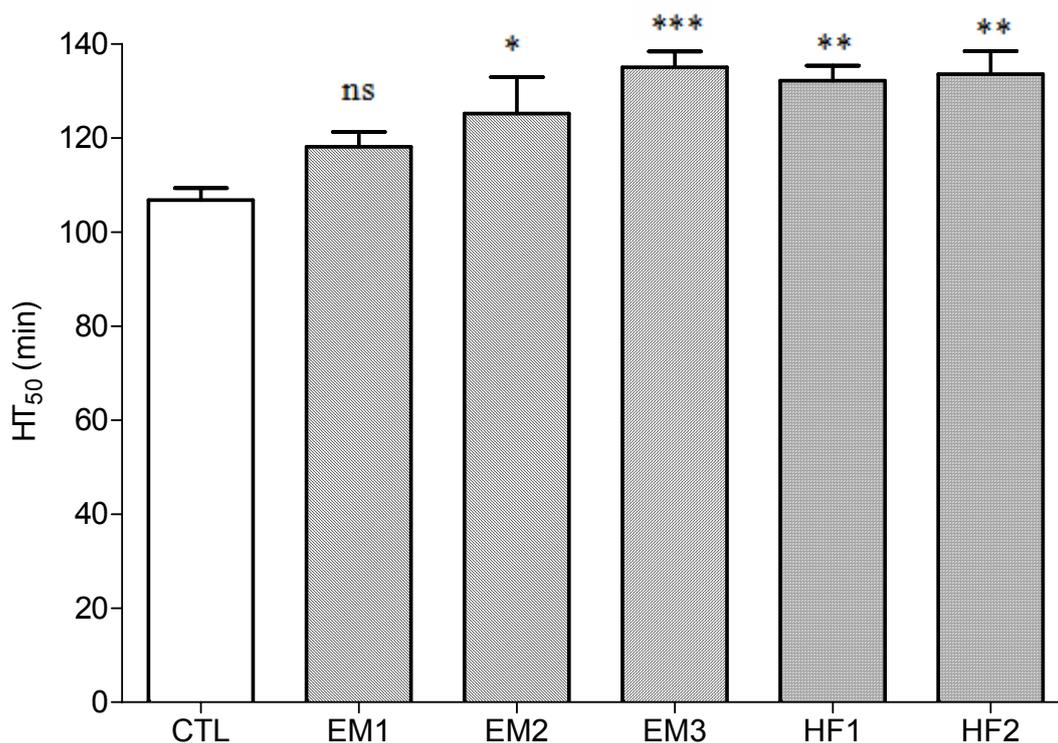


Figure 22. Temps de demis hémolyse (HT₅₀) pour les différents groupes étudiés.

Les valeurs sont les moyennes \pm SEM (n = 6-7). Les comparaisons sont effectuées par rapport au groupe contrôle ; *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, *** : $p \leq 0.001$, ns: non significatif. **Groupes** : [CTL (groupe contrôle gavé par une solution saline normale) ; EM1, EM2, EM3 (groupes traités par l'extrait méthanolique 300, 500 ,800 mg/kg respectivement ; HF1, HF2 (groupes traités par l'huile fixe 2 et 4ml/kg respectivement)].

Ces résultats sont en concordance avec les travaux Kökdil *et al*, (2005, 2006) où il a été rapporté que le traitement des rats soumis à un stress oxydant induit par le cadmium, par l'extrait des graines de *Nigella sativa* entraîne une réduction significative du taux de MDA plasmatique, érythrocytaire et du taux de fer sérique, avec une diminution remarquable de la destruction des membranes et de la lyse érythrocytaire.

Des résultats similaires ont été obtenus par Kanter et son équipe (2005) qui ont montré que l'administration *per os* de l'huile fixe des graines de *Nigella unguicularis*, *Nigella orientalis* et *Nigella segetalis*, à raison de 1ml/kg chez le rat durant quatre semaine, entraîne une amélioration des paramètres sanguins et une augmentation significative du statut antioxydant total sans affecter le taux d'MDA sérique.

Dans le même contexte, des études menées *in vitro* ont montré que les extraits des graines de *Nigella sativa* protègent les érythrocytes contre la peroxydation lipidique, la dégradation des protéines, la perte de la déformabilité et l'augmentation de la fragilité osmotique causée par l'eau oxygénée H₂O₂ (Suboh *et al.*, 2004).

Par ailleurs, Blache et collaborateurs (2002) ont rapporté que la supplémentation en catéchine semble n'être efficace que chez les rats préalablement soumis à un stress oxydant induit par le fer qui présentent des défenses antiradicalaire fortement amoindries (HT₅₀ = 68.7 ± 3.7 min pour le groupe soumis au stress oxydant et non traité *versus* 87.2 ± 5.1 min pour le groupe soumis au stress oxydant traité par la catéchine *versus* 99.4 ± 3.1min pour le groupe sains non supplémenté par la catéchine). En réalité, chez les rats sains la régulation des défenses antiradicalaires circulantes explique que le niveau mesuré par le test KRL est voisin dans le groupe sain supplémenté comparativement au groupe non supplémenté.

La synthèse des résultats obtenus dans la présente étude montre que le traitement par l'extrait brut et l'huile fixe de *Nigella sativa* améliore significativement la capacité antioxydante totale chez la souris. Cependant, le comportement de ces extraits contre l'attaque radicalaire est toujours difficile à expliquer car le sang est une matrice complexe dans laquelle les substances pharmacologiques évaluées pourraient être impliquées dans de nombreuses réactions dans le cytoplasme cellulaire, la membrane cellulaire et/ou au niveau extracellulaire (plasma) (Stocker *et al.*, 2003 ; Djeridane *et al.*, 2007). Toutefois, ce test biologique est cliniquement plus approprié que d'autres essais communs parce qu'il peut détecter plusieurs classes d'antioxydants (Stocker *et al.*, 2003).

III.4.2. Effet sur la capacité antioxydante plasmatique vis-à-vis du radical DPPH

La capacité antioxydante plasmatique (CAP) est l'un des biomarqueurs les plus utilisés pour évaluer l'efficacité d'une supplémentation alimentaire ou d'un traitement antioxydant. En raison du grand nombre d'antioxydants présents dans le plasma, plusieurs méthodes ont été développées; (i) le pouvoir antioxydant de réduction ferrique (FRAP), (ii) la capacité antioxydante équivalente de Trolox (TEAC), (iii) méthode des potentiels d'absorption totale du radical (TRAP) et (iv) l'effet scavenger du radical DPPH (Janaszewska et Bartosz, 2002 ; Huang *et al.*, 2005). Cette dernière méthode est largement utilisée pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de plantes et des aliments, elle est également utilisée pour évaluer la capacité antioxydante plasmatique qui est exprimée en pourcentage d'inhibition de décoloration du mélange réactionnel en présence du plasma par rapport à la solution méthanolique contenant uniquement le DPPH.

Dans notre étude, les résultats obtenus (**Figure 23**) montre que l'administration *per os* de (300 mg/ml) de l'extrait méthanolique chez les souris du groupe EM1 entraîne une augmentation de la capacité antioxydante plasmatique ($41,63 \pm 4,36$ % pour le groupe EM1 *versus* $26,34 \pm 6,14$ % pour le groupe contrôle), cependant cette augmentation est statistiquement non significative par rapport au groupe contrôle. Par contre, l'administration de deux doses plus élevées 500 mg/kg et 800 mg/kg respectivement pour les groupes EM2 et EM3 a entraîné une augmentation significative ($p \leq 0,01$) du pouvoir scavenger plasmatique ($49,62 \pm 2,26$ % et $48,18 \pm 3,73$ %).

De même, l'administration (2 ml/kg) de l'huile fixe chez les souris du groupe HF1 a entraîné une augmentation significative ($44,32 \pm 4,98$ %. $p \leq 0,05$) de la capacité antioxydante plasmatique, mais plus significative ($49,44 \pm 2,45$ %. $p \leq 0,01$) pour le groupe HF2 traité par une dose plus élevée (4 ml/kg).

Ce même test a été utilisé par Hasani et son équipe (2007) pour évaluer l'effet du traitement par l'extrait éthanolique de *Teucrium polium* sur la CAP chez le rat, où ils ont trouvé que l'administration orale de cet extrait (50, 100 et 200 mg/kg) pendant deux semaines conduit à une augmentation significative de la CAP ($p \leq 0,05$) par rapport au groupe contrôle. Cette capacité est comparable à celle du groupe traité parallèlement par 10 mg/kg de α -tocophérol.

En fait, le plasma contient un réseau d'antioxydants endogènes comme (l'albumine, bilirubine, le glutathion réduit et l'acide urique) mais aussi des antioxydants exogènes dérivés de l'alimentation. Ces antioxydants peuvent agir d'une manière complémentaire et synergique au niveau de la cascade radicalaire conférant une meilleure protection contre les EOR.

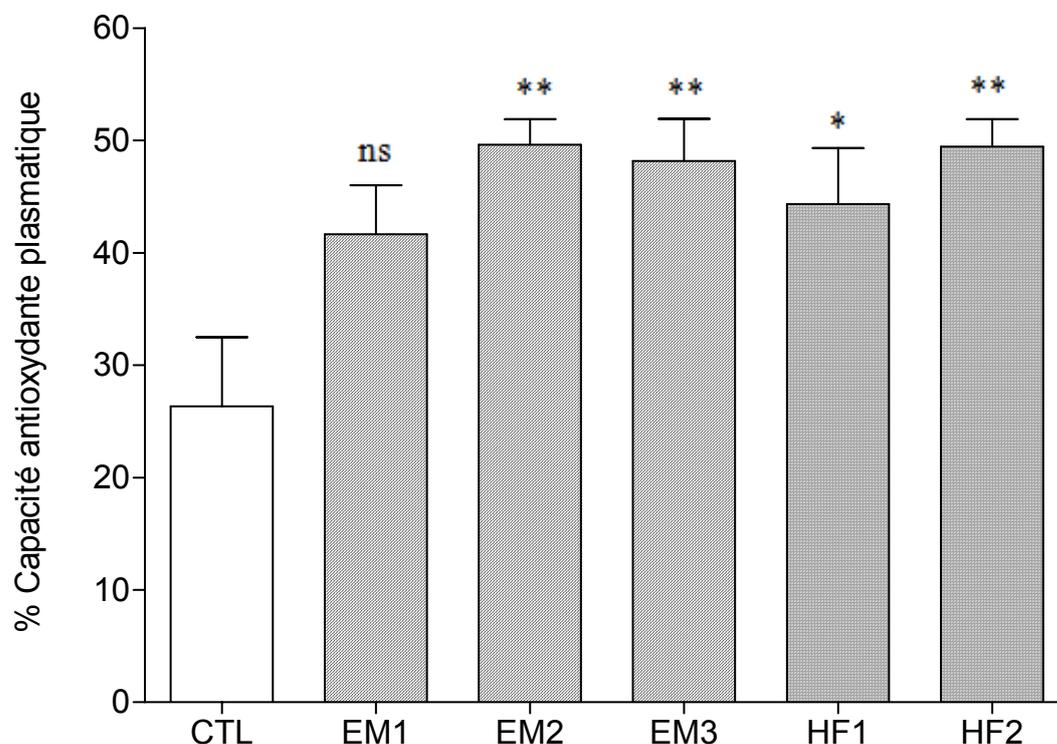


Figure 23. La capacité antioxydante plasmatique vis-à-vis du radical DPPH pour les différents groupes. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM (n = 6-7). Les comparaisons sont effectuées par rapport au groupe contrôle ; * : $p \leq 0.05$, ** : $p \leq 0.01$, ns : non significatif. **Groupes** : [CTL (groupe contrôle gavé par une solution saline normale) ; EM1, EM2, EM3 (groupes traités par l'extrait méthanolique 300, 500 ,800 mg/kg respectivement ; HF1, HF2 (groupes traités par l'huile fixe 2 et 4ml/kg respectivement)].

En tenant compte des résultats obtenus, il paraît que l'augmentation de la capacité antioxydante plasmatique, est probablement attribuée à une élévation du taux d'antioxydants exogènes tel que l'acide ascorbique, les caroténoïdes, la vitamine E et également les flavonoïdes ou les composés phénoliques, acquis suite au traitement par les extraits des graines de *Nigella sativa* (huile fixe, extrait brut méthanolique) dont les propriétés antioxydantes ont été déjà démontrées dans notre étude *in vitro*

En comparaison avec le test de la capacité antioxydante totale du sang, on constate que la dose de l'extrait méthanolique 300mg/kg n'a pas d'effet significatif sur l'augmentation de la capacité antioxydante plasmatique et la capacité antioxydante totale du sang. Cependant, pour les doses les plus élevées (500 et 800mg/kg) une augmentation significative des deux capacités antioxydantes ; totale du sang et du plasma a été observée. Pour l'huile fixe, le traitement par les doses (2ml/kg et 4ml/kg) a provoqué également une augmentation significative des deux capacités antioxydantes.

En effet, une corrélation linéaire positive et significative ($r=0.48$, $p \leq 0.01$) a été mise en évidence entre la capacité antioxydante totale du sang (HT_{50}) et la capacité antioxydante plasmatique (**Figure 24**), cela laisse supposer que la capacité antioxydante totale du sang est attribuée partiellement aux antioxydants piègeurs de radicaux libres présents dans le plasma.

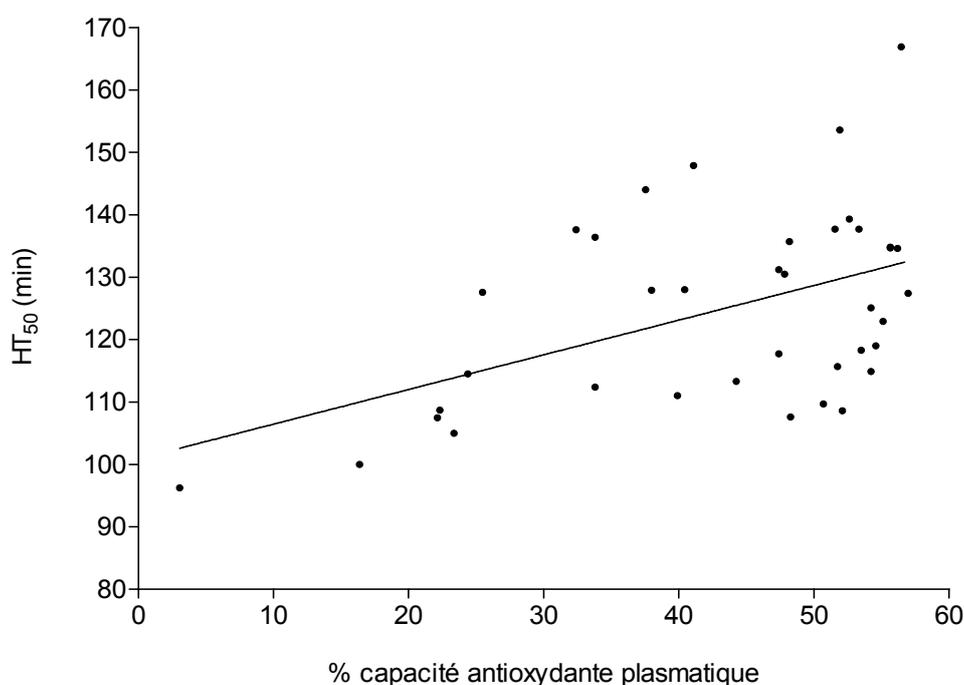


Figure 24. Relation entre la capacité antioxydante plasmatique et la capacité antioxydante totale du sang (HT_{50}) chez les souris des différents groupes étudiés ($N= 37$), les souris dans chaque groupe ($n= 6-7$) sont regroupées et non individualisées.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le stress oxydatif réfère à une perturbation dans la balance métabolique cellulaire durant laquelle, la génération d'oxydants accable le système de défense antioxydant. En raison de la toxicité des antioxydants synthétiques, le recours à des phytonutriments doués d'activités antioxydantes s'avère très avantageux et d'actualité. La plante *Nigella sativa* est parmi les plantes largement exploitées dans la civilisation islamique et fortement utilisées de nos jours en médecine traditionnelle à travers le monde.

Dans notre étude, les extraits des graines *Nigella sativa* semblent présenter un intérêt réel et potentiel par leurs activités antioxydantes qui ont été établies aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

Le criblage préliminaire des extraits en CCM a permis de localiser le pouvoir piègeur du radical DPPH dans deux extraits (ECh et EAc) qui sont les plus riches en composés phénoliques. Effectivement, le test au DPPH révèle que ces deux extraits sont les plus actifs comme piègeurs du radical DPPH.

En revanche, les extraits ECh et EHx sont très actifs comme piègeurs du radical anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), produit dans le système chimique PMS-NADH-NBT. L'utilisation de ce système paraît plus avantageuse que le système enzymatique xanthine/xanthine oxydase où il n'est pas possible de distinguer clairement les pouvoirs inhibiteurs de l'enzyme elle-même et piègeurs du $O_2^{\bullet-}$ produit par cette enzyme. L'effet piègeur du $O_2^{\bullet-}$ par l'extrait d'hexane est attribué probablement à la présence des huiles essentielles.

Le test de l'activité chélatrice a révélé que les trois extraits EBr, EAq et EAc manifestent un pouvoir chélateur relativement supérieur à celui de la quercétine. Une corrélation faible et non significative existe entre l'activité chélatrice des extraits graines de *Nigella sativa* et leurs teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes. Cela laisse supposer que l'activité chélatrice est probablement attribuée à des composés autres que les polyphénols ou les flavonoïdes.

Le test de blanchissement du β -carotène a montré également que l'ECh et l'EAc sont les extraits les plus actifs comme inhibiteurs de l'oxydation de l'acide linoléique couplée à celle du β -carotène.

Ces résultats restent préliminaires, Il serait intéressant de tester l'activité des fractions chromatographiées et d'isoler les molécules qui sous tendent les diverses activités détectées dans

les différents extraits. De plus, des études complémentaires approfondies concernant l'identification des composés phénoliques par des méthodes plus performantes sont nécessaires.

Par ailleurs, nous n'avons pas pu mettre en évidence l'effet protecteur *in vitro* des extraits des graines *Nigella sativa* contre l'hémolyse oxydative des érythrocytes, car ces extraits, eux mêmes possèdent un effet hémolytique qui est fort probablement attribué à la présence de saponosides, dont l'activité hémolytique a été largement étudiée.

Cependant, l'étude *in vivo* avec une administration orale a permis de détourner ce problème et d'évaluer l'effet de l'extrait brut méthanolique et de l'huile fixe commerciale sur le statut antioxydant chez la souris. Le traitement par ces deux extraits a entraîné une amélioration significative de la capacité antioxydante totale du sang et de la capacité antioxydante plasmatique chez la souris.

Pour mieux évaluer le pouvoir antioxydant des extraits des graines de *Nigella sativa*, des études similaires *in vivo* seraient intéressantes et plus prometteuse visant d'autres marqueurs biologiques tels que l'évaluation de la peroxydation lipidique et les enzymes antioxydantes plasmatiques et érythrocytaires. De même, des études approfondies sur la pharmacocinétique et la pharmacodynamique de ces principes actifs serait utiles pour la détermination des doses préventives et thérapeutiques.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

- 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.
- Abdel-Wahhab, M.A., Aly, S.E. (2005) Antioxidant property of *Nigella sativa* (black cumin) and *Syzygium aromaticum* (glove) in rats during aflatoxicosis. *Journal of applied toxicology*. **25**: 218-223.
- 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.
- Ahsan, H., Ali, A., Ali, R. (2003) Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clinical and experimental immunology*. **131**: 398-404.
- Ait-Mbarek, L., Ait Mouse, H., Elabbadi, N., Bensalah, M., Gamouh, A., Aboufatima, R., Benharref, A., Chait, A., Kamal, M., Dalal, A., Ziad, A. (2007) Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **40**: 839-847.
- Al-Hader, A., Aqel, M., Hasan, Z. (1993) Hypoglycemic effects of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds. *International Journal of Pharmacognosy*. **31**: 96-100.
- Al-Gaby, A.M.A. (1998) Amino acid composition and biological effects of supplementing broad bean and corn proteins with *Nigella sativa* (black cumin) cake protein. *Die Nahrung*. **42**: 290-294.
- Al-Ghamdi, M.S. (2003) Protective effect of *Nigella sativa* seeds against carbon tetrachloride-induced liver damage. *The American journal of Chinese medicine*. **31**: 721-728.
- Ali, B.H., Blunden, G. (2003) Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytotherapy research*. **17** : 299-305.
- 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.
- Al-Saleh, I.A., Billedo, G., El-Doush, I.I. (2006) Levels of selenium, DL- α -tocopherol, DL- γ -tocopherol, all-trans-retinol, thymoquinone and thymol in different brands of *Nigella sativa* seeds. *Journal of Food Composition and Analysis*. **19**: 167-175.
- Altan, M.F., Kanter, M., Donmez, S., Kartal, M.E., Buyukbas, S. (2007) Combination therapy of *Nigella sativa* and human parathyroid hormone on bone mass, biomechanical behavior and structure in streptozotocin-induced diabetic rats. *Acta histochemica*. **109** : 304-314
- Amič, D., Davidovic'-Amic', D., Beslo, D., Trinajstic', N. (2003) Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemica Acta*. **76**: 55-61.
- Ani, V., Varadaraj, M.C., Akhilender Naidu, K. (2006) Antioxidant and antibacterial activities of polyphenolic compounds from bitter cumin (*Cuminum nigrum* L.). *European food research and technology*. **224**: 109-115.
- Antuono, F., Hamaza, K. (2002) Composition of *Nigella sativa* and *Nigella damascene* from Egypt. *Planta medica*. **27**: 142 -149.
- Arbos, K.A., Claro, L.M., Borges, L., Santos, C.A.M., Weffort-Santos, A.M. (2008) Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. *Nutrition Research*. **28**: 457-463.
- Aruma, O.I. (1999) Free radicals, antioxidants and international nutrition. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*. **8** : 53-63.
- Atta, M.B., Imaizumi, K. (1998) Antioxidant activity of nigella (*Nigella sativa* L.) seeds extracts. *JAPAN Oil Chemists' Society*. **47**: 49-54.

- Atta-ur-Rahman., Malik, S., Cun-heng, H., Clardy, J. (1985a) Isolation and structure determination of nigellicine, a novel alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Tetrahedron letters*. **26**: 2759-2762.
- Atta-ur-Rahman., Malik, S., Ahmed, S., Choudhary, M.I., Habib-ur-Rehman. (1985b) Nigellimine-N-oxide-a new isoquinoline alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Heterocycles*. **23**: 935-955.
- Atta-ur-Rahman., Malik, S., Zaman, K. (1992) Nigellimine, a new isoquinoline from the seeds of *Nigella sativa*. *Journal of natural products*. **55**: 676-678.
- Atta-ur-Rahman., Malik, S., Hasan, S.S., Choudhary, M.I., Ni, C-Z., Clardy, J. (1995) Nigellidine, a new indazol alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Tetrahedron Letters*. **36**:1993-1996.
- Awad, E.M. (2005) *In vitro* decrease of the fibrinolytic potential of cultured human fibrosarcoma cell line, HT1080, by *Nigella sativa* oil. *Phytomedicine*. **12**: 100-107.
- B**abior, B.M., Lambeth, J.D., Nauseef, W. (2002) The neutrophil NADPH Oxidase. *Archive of Biochemistry and Biophysics*. **397**: 342-344.
- 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.
- Badary, O.A., Taha, R.A., Gamal El-Din, A.M., Abdel-Wahab, M.H. (2003) Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug and chemical toxicology*. **26**: 87-98.
- Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunete, C., Dine, T., Vasseur, J., Gazin, J.C., Pinkas, M., Luycky, M., Gazin, M. (1996) Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*. **46**: 1086-1089.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*. **9**: 191-203.
- Bartosz, G. (2003) Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*. **9**: 5-21.
- Beckman, K.B., Ames, B.N. (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiological reviews*. **78**: 547-581.
- Benkaci-Ali, F., Baaliouamer, A., Meklati, B.Y. (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 & Fragrance Journal*. **22**: 148-153.
- Berger, M.M. (2006) Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. **20**: 48-53.
- Berlette, B.S., Stadtman, E.R. (1997) Protein oxidation in aging disease, and oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*. **272**: 20313-20316.
- Beta, T., Nam, S., Dexter, J.E., Sapirstein, H.D. (2005) Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions. *Cereal chemistry*. **82**: 390-393.
- Birt, D.F., Hendrich, S., Wang, W. (2001) Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & therapeutics*. **90**: 157-177.
- Blache, D., Durand, P., Prost, M., Loreau, N (2002) (+)-Catechin inhibits platelet hyperactivity induced by an acute iron load *in vivo*. *Free Radical Biology & Medicine* **33**: 1670-1680.
- Boizot, N., Charpentier, J.P. (2006) Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'Inra*. pp: **79-82**
- Bonnier, G. (1990) La grande flore en couleur. *Ed Belin, Paris*. Tome 1. pp: 17.

- Bonnefont-Rousselot, D., Thérond, P., Delattre, J. (2003) Radicaux libres et anti-oxydants. IN : *Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires*. Delattre, J., Durand, G., Jardillier, J.C. Eds: Médecine-sciences. Flammarion (Paris), Pp: 59-81
- Boskabady, M.H., Shirmohammadi, B. (2002) Effect of *Nigella sativa* on isolated guinea pig trachea. *Archives of Iranian Medicine*. **5**: 103-107.
- Boskabady, M.H., Shahabi, M. (1997) Bronchodilatory and anticholinergic effects of *Nigella sativa* on isolates guinea-pig tracheal chains. *Iranian Journal of Medical Sciences*. **22**: 127-133.
- Boskabady, M.H., Shiravi, N. (2000) Inhibitory effect of *Nigella sativa* on histamine (H₁) receptors of isolated guinea pig tracheal chains. *The European respiratory journal* . **16**: 461.
- Boskabady, M.H., Shirmohammadi, B., Jandaghi, P., Kiani, S. (2004) Possible mechanism(s) for relaxant effect of aqueous and macerated extracts from *Nigella sativa* on tracheal chains of guinea pig. *BMC Pharmacology*. **4**: 3-8.
- Boudiaf, K. (2006) Etude des effets anti-xanthine oxydoréductase et anti-radicalaires des extraits des graines de *Nigella sativa*. Thèse de magistère. Département de biologie. Université Ferhat abbas. (Sétif) Algérie.
- 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.
- Brown, J.E., Khodr, H., Hider, R.C., Rice-Evans, C. (1998) Structural dependence of flavonoïdes interactions with Cu²⁺ ions : implication for their antioxidant properties. *The Biochemical journal*. **330**: 1173-1178.
- Brunneton J (1999). Flavonoïdes. In : *Pharmacognosie, Phytochimie: Plantes médicinales*, 3^{ème} édition, *Technique et Documentation* (Paris), pp: 310-353.
- Büyükoztürk, S., Gelincik, A., Özşeker, F., Genç, S., Şavran, FO., Kıran, B., Yıllar, G., Erden, S., Aydın, F., Çolakoğlu, F., Dal, M., Özer, H., Bilir, A. (2005) *Nigella sativa* (black seed) oil does not affect the T-helper1 and T-helper 2 type cytokine production from splenic mononuclear cells in allergen sensitized mice. *Journal of Ethnopharmacology*. **100**: 295-298.
- Burits, M., Bucar, F. (2000) Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy research*. **14**: 323-328.
- Cash, T., Pan, Y., Simon, M.C. (2007) Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. *Free radical biology & medicine*. **43**: 1219-1225.
- Cemek, M., Enginar, H., Karaca, T., Unak, P. (2006) *In vivo* radioprotective effects of *Nigella sativa* L oil and reduced glutathione against irradiation-induced oxidative injury and number of peripheral blood lymphocytes in rats. *Photochemistry and photobiology*. **82**: 1691-1696.
- Chakravarty, N. (1993) Inhibition of histamine release from mast cells by nigellone. *Annals of allergy*. **70** : 237-242.
- Chan, E.W.C., Lim, Y.Y., Mohammed, O. (2007) Antioxidant and antibacterial activity of leaves of etlingera species (Zingiberaceae) in peninsular Malaysia. *Food Chemistry*. **104**: 1586-1593.
- Cheikh-Rouhou, S., Besbes, S., Hentati, B., Blecker C., Deroanne C., Attia, H. (2007) *Nigella sativa* L. chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction. *Food Chemistry*. **101**: 673-681.
- Cheikh-Rouhou, S., Besbes, S., Lognay, G., Blecker, C., Deroanne, C., Attia, H. (2008) Sterol composition of black cumin (*Nigella sativa* L.) and Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) seed oil. *Journal of Food Composition and Analysis*. **21**: 162-168.
- Chen, H.Y., Yen, G.C. (2007) Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of extracts from guava (*Psidium guajava* L.) leaves. *Food Chemistry*. **10**: 686-694.

- Chiarugi, P., Fiaschi, T. (2007) Redox signalling in anchorage-dependent cell growth. *Cellular Signalling*. **19**: 672-682.
- Chu, Y.F., Sun, J., Wu, X., Liu, R.H. (2002) Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *Journal of agricultural and food chemistry*. **50**: 6910-6916.
- Chwalek, M. (2004) Hémisynthèse de saponosides à hédragenine. Etude de l'influence de la chaîne osidique sur l'activité hémolytique. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Reims Champagne-Ardennes. France.
- Chwalek, M., Lalun, N., Bobichon, H., Plé, K., Voutquenne-Nazabadioko, L. (2006) Structure-activity relationships of some hederagenin diglycosides: hemolysis, cytotoxicity and apoptosis induction. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1760**: 1418-1427.
- Çimen, M.Y.B. (2008) Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clinica Chimica Acta*. **39**: 1-11.
- Comhair, S.A., Erzurum, S.C. (2002) Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *The American journal of physiology*. **238**: 246-255
- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Vlietinck, A.V., Berghe, D.K. (1998) Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of natural products*. **61**: 71-76.
- Costa-Lotufo, L.V., Kahn, M.T.H., Ather, A., Wilke, D.V., Jiminez, P.C., Pessoa, C., Amaral de Moraes, M.E., Odorico de Moraes, M. (2005) Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. **99**: 21-30.
- Cotelle, N. (2001) Role of flavonoids in oxidative stress. *Current topics in medicinal chemistry*. **1**: 569-590.
- D**aba, M.H., Abdel-Rahman, M.S. (1998) Hepatoprotective activity of thymoquinone in isolated rat hepatocytes. *Toxicology letters*. **95**: 23-9.
- Danny, E.C., Van Hoorn, R.J., Nijveldt Paul, A.M., Van, L., Zandrie Hofman, A., Laura M'Rabet, A., Dries, B. A. De Bont, A, Norren, K. V. (2002) Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *European Journal of Pharmacology*. **451**: 111-118.
- Dastmalchi, K., Dorman, H.J.D., Oinonen, P.P., Darwis, Y., Laakaso, I., Hiltunen, R. (2008) Chemical composition and *in vitro* antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. *Food Science and Technology*. **41**: 391-400.
- Del Rio, L.A., Corpus, F.J., Sandalio, L.M., Corpas, 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.
- Densiov, E.T., Afanas'ev, I.B. (2005) IN: *Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology*. Eds: Taylor & Francis Group (U.S.A), Pp: 703-861.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Vidal, N., Lesgards, J.F., Stocker, P. (2007) Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*. **224**: 801-809.
- Droge, W. (2002) free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*. **82**: 47-95.
- E**l-Abhar, H.S., Abdallah, D.M., Saleh, S. (2003) Gastroprotective activity of *Nigella sativa* oil and its constituent, thymoquinone, against gastric mucosal injury induced by ischaemia/reperfusion in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. **84**: 251-258.
- El-Dakhkhny, M., Barakat, M., Abd El-Halim, M., Aly, S.M. (2000) Effect of *Nigella sativa* oil on gastric secretion and ethanol induced ulcer in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. **72**: 299-304.
- El-Dakhkhny, M., Mady, N.I., Lembert, N. (2002) The hypoglycemic effect of *Nigella sativa* oil is mediated by extrapancreatic actions. *Planta medica*. **65**: 465-466.

- Al-Hader, A., Aqel, M., Hasan, Z., (1993) Hypoglycemic effects of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds. *International Journal of Pharmacognosy*. **31**: 96-100.
- El-Kadi, A., Kandil, O., Tabuni, A.M. (1987) *Nigella sativa* cell-mediated immunity. *Archives of AIDS research*. **1**: 232-233.
- El-Mahmoudy, A., Matsuyama, H., Borgan, M.A., Shimizu, Y., El-Sayed, M.G., Minamoto, N. (2002) Thymoquinone suppresses expression of inducible nitric oxide synthase in rat macrophages. *International immunopharmacology*. **2**: 1603-1611.
- El-Mahmoudy, A., Shimizu, Y., Shiina, T. (2005) Successful abrogation by thymoquinone against induction of diabetes mellitus with streptozotocin via nitric oxide inhibitory mechanism. *International immunopharmacology*. **5**: 195-207.
- Elmastaş, M., Gülçin, İ., Işildak, Ö., Küfrevioğlu, Ö.İ., İbaoğlu, K., Aboul-Enein, .H.Y. (2006) Radical scavenging activity and antioxidant capacity of bay leaf extracts. *Journal of the Iranian Chemical Society*. **3**: 258-266.
- El-Obeid, A., Al-Harbi, S., Al-Jomah, N., Hassib, A. (2006) Herbal melanin modulates tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 6 (IL-6) and vascular endothelial growth factor (VEGF) production. *Phytomedicine*. **13**: 324–333.
- El-Saleh, S.C., Al-Sagair, O.A., Al-Khalaf, M.I. (2004) Thymoquinone and *Nigella sativa* oil protection against methionine-induced hyperhomocysteinemia in rats. *International journal of cardiology*. **93**: 19-23.
- El-Tahir, K. E., Ashour, M.M., Al-Harbi, M.M. (1993) The respiratory effects of the volatile oil of the black seed (*Nigella sativa*) in guinea pigs: elucidation of the mechanism(s) of action. *General pharmacology*. **24**: 1115-1122.
- Etcheverry, S.B., Ferrer, E.G., Naso, L., Rivadeneira, J., Salinas, V., Williams, P.M. (2008) Antioxidant effects of the VO(IV) hesperidin complex and its role in cancer chemoprevention. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. **13**: 1432-1327.
- F**avier, A. (2003) Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*. **108-115** .
- Ferreria, A., Proenca, C., Serralheiro, M.L.M., Araujo, M.E.M. (2006) The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plant from Portugal. *Journal of ethnopharmacology*. **108**: 31-37.
- Frankel, E. N., Huang, S.-W., Kanner, J., German, J.B. (1994) Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs. emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **42**:1054-1059.
- Frankel, E.N., Meyer, A.S. (2000) The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**: 1925-1940.
- G**eorgé, S., Brat, P., Alter, P., Amiot, J.M. (2005) Rapid determination of polyphénols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**: 1370-1373.
- Ghannadi, A., Hajhashemi, V., Jafarabadi (2005) An investigation of the analgesic and anti-inflammatory effects of *Nigella sativa* seed polyphenols . *Journal of medicinal food*. **8**: 488-493.
- Ghedira, K. (2005) Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*. **4**: 162-169.
- Ghedira, K. (2006) La nigelle cultivée : *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae). *Phytothérapie*, **4**: 1-7.
- Gilani, A.H., Aziz, N., Khurram, I.M., Chaudary, K.S., Iqbal, A. (2001) Bronchodilator, spasmolytic and calcium antagonist activities of *Nigella sativa* seeds (Kalonji). *Journal of the Pakistan Medical Association*. **51**: 115-120.
- Gilani, A.H., Jabeen, Q., Khan, M.A.U., (2004) A review of medecinal uses and pharmacological activites of *Nigella sativa*. *Pakistan journal of biological sciences*.**7**: 441-451.

- Girard, A., Madani, S., Boukourt, F., Cherkaoui-Malki, M., Belleville, J., Prost, J. (2006) Fructose-enriched diet modifies antioxidant status and lipid metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Nutrition*. **22**: 758-766.
- Goudable, J., Favier, A. (1997) Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. **11**: 115-20.
- Guignard, J.L. (2001) In : *Botanique systématique moléculaire* . 12^{ème} Edition Masson (Paris), P: 304.
- Guetteridge, J.M. (1993) free radicals in disease processes : a complication of cause and consequence. *Free radical research communications*. **19**: 141-158.
- Halliwell, A., Gutteridge, J.M.C. (1990) The antioxidant of human extracellular fluids. *Archives of biochemistry and biophysics*. **280**: 1-8.
- Halliwell, B., Whiteman, M. (2004) Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture : how should you do it and what do the results mean?. *British journal of pharmacology*. **142**: 31-2.
- Hallman, P.C.H., De Vries, H.M., Van Leeuwen, S.D., Mengelers, M.J.B. and Katan. M.B. (1995) Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *American Journal of Clinical Nutrition*. **62**: 1276-1282.
- Hallman, P.C.H., Trijp, L.M.P., Buysman, M.N.C.P., Gaag, M.S., Mengelers, J.B., De vries, J.H.M., Katan, M.B. (1997) Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Letters*. **418**: 152-156.
- Haq, A., Abdullatif, M., Lobo, P.I., Khabar, K.S.A., Sheth, K.V., Al-Sedairy, S.T. (1995) *Nigella sativa* : effect on human lymphocytes and polymorphonuclear leukocyte phagocytic activity. *Immunopharmacology*. **30**: 147-155.
- Haq, A., Lobo, P.I., Al-Tufail, M., Rama, N., Al-Sedairy, S.T. (1999) Immunomodulatory effect of *Nigella sativa* proteins fractionated by ion exchange chromatography. *International Journal of Immunopharmacology*. **21**: 283-295.
- Harrison, D., Griendling, K.K., Landmesser, U., Hornig, B., Drexler, H. (2003) Role of oxidative stress in atherosclerosis. *The American Journal of Cardiology*. **91**: 7-11.
- Hasani, P., Yasa, N., Vosough-Ghanbari, S., Mohammadirad, A., Dehghan, G., Abdollahi, M. (2007) *In vivo* antioxidant potential of *Teucrium polium*, as compared to α -tocopherol. *Acta Pharmaceutica*. **57**: 123-127.
- Hawsawi, Z.A., Ali, B.A., Bamosa, A.O. (2001) Effect of *Nigella sativa* (Black seed) and thymoquinone on blood glucose in albino rats. *Annals of Saudi medicine. Med*. **21**: 242-244.
- Heim, E.K., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. (2002) Flavonoid antioxidants : chemistry , metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. **13**: 572-584.
- Heimbach, J., Reith, S., Mohamedshah, F., Slesinki, R., Samuel-Fernando, P., Sheehan, T., Dickman, R., Borzelleca, J. (2000) Safety assessment of iron EDTA [sodium iron (Fe³⁺) ethylenediaminetetraacetic acid]: summary of toxicological, fortification and exposure data. *Food and Chemical toxicology*. **38**: 99-111.
- Hendrich, A.B. (2006) Flavonoid-membrane interactions : possible consequence for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta pharmacologica Sinica*. **27**: 27-40.
- Hodek, P., Trefil, P., Stiborová, M. (2002) Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions*. **139**: 1-21.
- Houcher, Z., Boudiaf, K., benboubetra, M., Houcher, B. (2007) Effects of methanolic extract and commercial oil of *Nigella sativa L.* on blood glucose and antioxidant capacity in alloxan-induced diabetic rats. *Pteridines*. **18**: 8-18.

- Houghton, P.J., Zarka, R., de las Heras, B., Hoult, J.R. S. (1995) Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leucocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Med.* **61**: 33-36.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L (2005) The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural & Food Chemistry.* **53**:1841-1856.
- Iddamaldeniya, S.S., Wickramasinghe, N., Thabrew, I., Ratnatunge, N., Thammitiyagodage, M.G. (2003) Protection against diethylnitrosoamine-induced hepatocarcinogenesis by an indigenous medicine comprised of *Nigella sativa*, *Hemidesmus indicus* and *Smilax glabra* : a preliminary study. *Journal of Carcinogenesis.* **2**: 1-6.
- Ishii, K., Furuta, T., Kasuya, Y. (2003) High-performance liquid chromatographic determination of quercetin in human plasma and urine utilizing solid-phase extraction and ultraviolet detection. *Journal of Chromatography.* **749**: 49-56.
- Janaszewska, A., Bartosz, G. (2002) Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation.* **62**: 231-236.
- Javanovic, S.V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B., Simic, M.J. (1994) Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society.* **116**: 4846-4851.
- Jayaprakasha, G.K., Patil, B.S. (2007) *In vitro* evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. *Food Chemistry.* **101**: 410-418.
- Juma, B.F., Majinda, R.R.T. (2004) Erythrinaline alkaloids from the flowers and pods of *Erythrina lysistemon* and their DPPH radical scavenging properties. *Phytochemistry.* **65**: 1397-1404.
- Jung, T., Bader, N., Grune, T. (2007) Oxidized proteins : intracellular distribution and recognition by the proteasome. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **462**: 231-237.
- Kanter, M., Coskun, O., Gurel, A., (2005) Effect of black cummin (*Nigella sativa*) on cadmium-induced oxidative stress in the blood of rats. *Biological Trace Element Research.* **107**: 277-287.
- Kartal, N., Sokmen, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen., A. (2007) Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry.* **100**: 584–589.
- Khader, M., Eckl, P.M., Bresgen, N. (2007) Effects of aqueous extracts of medicinal plants on MNNG-treated rat hepatocytes in primary cultures. *Journal of Ethnopharmacology.* **112**: 199-202.
- Khanna, T., Zaidi, F.A., Dandiya, P.C. (1993) CNS and analgesic studies on *Nigella sativa*. *Fitoterapia.* **64**: 407-410.
- Klinenberg, J.R., Goldfinger, S.E., Seegmiller, J.E. (1965) The effectiveness of xanthine oxidase inhibitor allopurinol in the treatment of gout. *Annals of internal medicine.* **62**: 639-647.
- Koehlin-Ramonatxo, C. (2006) Oxygen , oxidative stress and antioxidant supplementation ,or an other way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition clinique et métabolique.* **20**:165-177.
- Kohen, R., Nyska, A. (2002) Oxidation of biological systems : oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology.* **30**: 620-650.
- Kökdil, G., Tamer, L., Ercan B., Çelik M., Atik, U. (2006) Effects of *Nigella orientalis* and *N. segetalis* fixed oils on blood biochemistry in rats. *Phytotherapy Research.* **20**: 71-75.
- Kökdil, G., Tamer, L., Ercan, B., İlçim, A., Aras, N., Atik, U. (2005) Effects of *Nigella unguicularis* fixed oil on blood biochemistry and oxidant/antioxidant balance in rats. *Journal of Ethnopharmacology.* **99**: 131-135.
- Kolayli, S., Ocak, M., Kucuk, M., Abbasoglu, R. (2004) Does caffeine bind to metal ions? *Food chemistry.* **84**: 383-388.

- Kumara, S.S., Huat, B.T. (2001) Extraction, isolation and characterization of antitumor principle, alpha-hederin, from the seeds of *Nigella sativa*. *Planta medica*. **67**: 29-32.
- Kruk, I., Michalska, T., Lichszteld, K., Adna, A.K., Aboul-Enein, H.Y. (2000) The effect of thymol and its derivatives on reactions generating reactive oxygen species. *Chemosphere*. **41**: 1059-1064.
- Le, K., Chiu, F., Ng, K (2007) Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*. **105**: 353-363
- Lee, Y.J., Erdos, G., Hou, Z., Kim, S.H., Kim, J.H., Cho, J.M., Corry, P.M. (1994) Mechanism of quercetin-induced suppression and delay of heat shock gene expression and thermotolerance development in HT-29 cells. *Molecular and cellular biochemistry*. **137**: 141-154.
- Lehucher-Michel, M.P., Lesgards, J.F., Delubac, O., Stocker, P., Durand, P., Prost, M. (2001) Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale*. **30**: 1076-1081.
- 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.
- Liyana-Pathirana, C.M., Shahidi, F. (2006) Antioxydant properties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **86**: 477-485.
- Lin, J.K., Weng, M.S. (2006) Flavonoids as Nutraceuticals. In : *The science of flavonoids*. Grotewold, E. Eds, Springer, Pp: 217.
- Mahmood, M.S., Gilani, A.H., Khwaja, A., Rashid, A., Ashfaq, M.K. (2003) The *in vitro* effect of aqueous extract of *Nigella sativa* seeds on nitric oxide production. *Phytotherapy research*. **17**: 921-924.
- Manna, C., D'angelo, S., Migliardi, V., Loffredi, E., Mazzoni, O., Morrica, P., Galletti, P., Zappia, V. (2002) Protective effect of the phenolic fraction from virgin olive oils against oxidative stress in human cells. *Journal of agricultural and food chemistry*. **50**: 6521-6526.
- Mansouri, A., Embarek, G., Kokkalou, E., Kefalas, P. (2005) Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry*. **89**: 411-420.
- Markham, K.R. (1982) Techniques of flavonoid identification. *Academic Press*. London. 133p
- Martinez-Cayuela, M. (1995) Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*. **77**: 147-161.
- Mashhadian, N.V., Rakhshandeh, H. (2005) Antibacterial and antifungal effects of *Nigella sativa* extracts against *S.aureus*, *P. aeruginosa* and *C.albicans*. *Pakistan Journal of Medical Sciences*. **21**: 47-52.
- McCord, J.M. (1995) Superoxide radical: Controversies, contradictions and paradoxes. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. **202**: 112-117.
- Meral, I., Yener, Z., Kahraman, T., Mert, N. (2001) Effect of *Nigella sativa* on glucose concentration, lipid peroxidation, anti-oxidant defence system and liver damage in experimentally- induced diabetic rabbits. *The Journal of Veterinary Medical Science*. **48**: 539-599.
- Merfort, I., Wray, V., Barakat, H., Hussein, S.A.M., Nawwar, M.A.M., Willuhn, G. (1997) Flavonol triglycosides from seeds of *Nigella sativa*. *Phytochemistry*. **46**: 359-363.
- Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharidies, T.C. (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells : implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological reviews*. **52**: 673-751.
- Mochizuki, M., Yamazaki, S., Kano, K., Ikeda, T. (2002) Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1569**: 35-44.
- Moretti, A., D'Antuono, L.F., Elementi, S. (2004) Essential oils of *Nigella sativa* L. and *Nigella damascena* L. seed. *Journal of Essential Oil Research*, **16**: 182-183.

- Morikawa, T., Xu, F., Kashima, Y., Matsuda, H., Ninomiya, K., Yoshikawa, M. (2004a) Novel dollabellane-type diterpene alkaloids with lipid metabolism promoting activities from the seeds of *Nigella sativa*. *Organic letters*. **6**: 869-872.
- Morikawa, T., Xu, F., Ninomiya, K., Matsuda, H., Yoshikawa, M. (2004b) Nigellamines A₃, A₄, A₅ and C, new dolabellane-type diterpene alkaloids, with lipid metabolism promoting activities from the Egyptian medicinal food black cumin. *Chemical & pharmaceutical bulletin*. **52**: 494-497.
- Morris, C.J., Earl, J.R., Trenam, C.W., Blake, D.R. (1995) Reactive oxygen species and iron-a dangerous partnership in inflammation. *The international journal of biochemistry & cell biology*. **27**: 109-122.
- Morsi, N.M. (2000) Antimicrobial effect of crude extracts of *Nigella sativa* on multiple antibiotics-resistant bacteria. *Acta microbiologica Polonica*. **49**: 63-74.
- Musa, D., Dilsiz, N., Gumushan, H., Ulakoglu, G. And Bitiren, M. (2004) Antitumor activity of an ethanol extract of *Nigella sativa* seeds. *Biologia, Bratislava*. **59**: 735-740.
- Nagi, M.N., Mansour, M.A. (2000) Protective effect of thymoquinone against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats : a possible mechanism of protection. *Pharmacological research*. **41**: 283-9.
- Nair, M.K.M., Vasudevan, P., Venkitanarayanan, K. (2005) Antibacterial effect of black seed oil on *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. **16**: 395-398.
- Narayana, K.R., Reddy, M.S., Chaluvadi, M.R., Krishina, D.R. (2001) Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*. **33**: 2-16.
- 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.
- Neuzil, J., Stocker, R. (1993) Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS Letters*. **331**: 281-284.
- Nickavar, B., Mojaba, F., Javidniab, K., Amolia, M.A.R. (2003) : Chemical composition of the fixed and volatile oils of *Nigella sativa* L. from Iran. *Journal of biosciences*. **58**: 9-10.
- Pal Yu, B. (1994) Cellular defences against damage from reactive oxygen species . *Physiopathological Reviews*. **74**: 139-155.
- Prakash, D., Upadhyay, G., Brahma, N., Singh, H.B. (2007) Singh antioxidant and free radical-scavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean (*Glycine max*). *Food Chemistry*. **104**: 783-790.
- Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.O. (2002) Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. **16**: 233-239.
- Price, M.L., Butler, L.G. (1977) Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of the tannin content of sorghum grain. *Journal of agricultural and food chemistry*. **25**: 1269-1273.
- Pietta, P.G. (2000) Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*. **63**: 1035-1042.
- Raj Kapoor, B., Anandan, A., Jayakar, B. (2002) Anti-ulcer effect of *Nigella sativa* Linn. against gastric ulcers in rats. *Current Science*. **82**: 177-179.
- Ramadan, M.F., Mörsel, J.T. (2002a) Characterization of phospholipid composition of black cumin (*Nigella sativa* L.) seed oil. *Nahrung Food*. **46**: 240-244.
- 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.
- Ramadan, M. F., Mörsel, J.T. (2003) Analysis of glycolipids from black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.) and niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) oil seeds. *Food Chemistry*. **80**: 197-204.

- Ramadan, M.F., Kroh, L.W., Mörsel, J.T. (2003) Radical scavenging activity of black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.), and niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) crude seeds oils and oil fractions. *Journal of agricultural and food chemistry*. **51**: 6961-6969.
- Rice-Evans, C. (2001) Flavonoid as Antioxidants. *Current medicinal chemistry*. **8**: 797-807.
- Riov, J., Gottlieb, H.E. (2006) Metabolism of auxin in pine tissues: Indole-3-acetic acid conjugation. *Physiologia Plantarum*. **50**: 347-352.
- Rundles, R.W., Metz, E.N., Sliberman, H.R. (1966) Allopurinol in the treatment of gout. *Annals of Internal Medicine*. **64**: 229-258.
- Sachdev, S., Davies, K.J.A. (2008) Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radical Biology & Medicine*. **44**: 215-223.
- Salem, M.L. (2005) Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. Seed. *International Immunopharmacology*. **5**: 1749-1770.
- Salem, M.L., Hossain, M.S. (2000) Protective effect of black seed oil from *Nigella sativa* against murine cytomegalovirus infection. *International journal of immunopharmacology*. **22**: 729-740.
- Salim, E.I., Fukushima, S. (2003) Chemopreventive potential of volatile oil from black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds against rat colon carcinogenesis. *Nutrition and cancer*. **45**: 195-202.
- Samaniego-Sánchez, C., González, A.M.T., Garcia-Parrilla, M.C., Granados, J.J.Q., Garcia de la Serrana, H.L., Mart'inez, M.C.L. (2007) Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Analytica Chimica Acta*. **593**: 103-107.
- 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.
- Schewe, T., Sies, H. (2003) Flavonoids as protectants against prooxidant enzymes. *Biologie médicale*. **34**: 243-253.
- Sevanian, A., Nordenbrand, K., Kim, E., Ernester, L., Hochstein, P. (1990) Microsomal lipid peroxidation: the role of NADPH-cytochrome P₄₅₀ reductase and cytochrome P₄₅₀. *Free radical biology & medicine*. **8**: 145-152.
- Seyoum, A., Asres, K., El-Fiky, F.K. (2006) Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Journal of phytochemistry*. **67**: 2058-2070.
- Simić, A., Manojlović, D., Šegan, D., Todorović, M. (2007) Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. *Molecule*. **12**: 2327-2340.
- Sohal, R.S., Mockett, R.J., Orr, W.C. (2002) Mechanisms of aging : an appraisal of the oxidative stress hypothesis, *Free radical biology & medicine*. **33**: 575-586.
- Sorg, O. (2004) Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies*. **327**: 649-662.
- Sparg, S.G., Light, M.E., Van Staden, J. (2004) Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*. **94**: 219-243.
- Stocker, P., Lesgards, J.F., Vidal, N., Chalier, F., Prost, M. (2003) ESR study of a biological assay on whole blood: antioxidant efficiency of various vitamins. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1621**: 1-8.
- Suboh, S.M., Bilot, Y.Y., Aburjai, T.A. (2004) Protective effects of selected medicinal plants against protein degradation, lipid peroxidation and deformability loss of oxidatively stressed human erythrocytes. *Phytotherapy research*. **18**: 280-284.
- Suresh Kumar, K., Ganesan, K., Subba Rao, P.V. (2008) Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty - an edible seaweed. *Food Chemistry*. **107**: 289-295.
- Swamy, S.M., Tan, B.K. (2000) Cytotoxic and immunopotentiating effects of ethanolic extract of *Nigella sativa* L. seeds. *Journal of Ethnopharmacology*. **70**: 1-7.

- T**askin, M.k., Alankus Caliskan, O., Anil, H., Abou-gazar, H., A.Khan, I., Bedir, E. (2005) Triterpène saponins from *Nigella sativa* L. *Turkish Journal of Chemistry*. **29**: 561-569.
- Thabrew, M.I., Mitry, R.R., Morsy, M.A., Hughes, R.D. (2005) Cytotoxic effects of a decoction of *Nigella sativa*, *Hemidesmus indicus* and *Smilax glabra* on human hepatoma HepG2 cells. *Life Sciences*. **77**: 1319-1330.
- Thippeswamy, N.B., Akhilender, N.K. (2005) Antioxidant potency of cumin varieties-cumin, black cumin and bitter cumin-on antioxidant systems. *European food research and technology*. **220**: 472-476.
- Tuter. M., Aksoy, H.A., Ustun, G., Riva, S., Secundo, F., Ipekler S. (2003) Partial purification of *Nigella sativa* L. seed lipase and its application in hydrolytic reactions. enrichment of γ -linolenic acid from borage oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **80**: 237-241.
- V**alko, 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.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*. **160**: 1-40.
- Van Acker, S.A.B.E., Van Den Berg, D.J., Tromp, M.N.L., Griffioen, D.H., Bennenkom, W.P.V., Van Der Vijgh, W.J.F., Bast, A. (1996) Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free radical biology & medicine*. **20**: 331-342.
- W**ettasinghe, M. (1999) Characterisation of natural antioxidants of meals of borage and evening primrose. Thèse de Doctorat, Département de Biochimie. Memorial University of Newfoundland, Canada.
- Williamson, G., Day, A.J., Plumb, G.W., Couteau, D. (2000) Human metabolic pathways dietary flavonoïds and cinnamatates. *Biochemical Society Transactions*. **28**: 16-22.
- Wong, S.P., Leong, L.P., William Koh, J.H. (2006) Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry*. **99**: 775-783.
- Young, J.L., Boswell, R.B., Nies, A.S. (1974) Severe allopurinol hypersensitivity. association with Thiazides and Prior Renal Compromise. *Archives of internal medicine*. **134**: 553-559.
- Z**elko, IN., Marian, T.J., Folz, R.J. (2002) Superoxide dismutase multigene family : a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free radical biology & medicine*. **33**: 337-349.
- Zhao, H., Fan, W., Dong, J., Lu, J., Chen, J., Shan, L., Lin, Y., Kong, W. (2008) Evaluation of antioxidant activities and total phenolic contents of typical malting barley varieties. *Food Chemistry*. **107**: 296-304.
- Zubia, M., Robledo, D., Freile-Pelegrin, Y. (2007) Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the yucatan peninsula, Mexico. *Journal of applied phycology*. **19**: 449-458.
- Zweier, J.L., Talukder, M.A.H. (2006) The role of oxidants and free radicals in reperfusion Injury. *Cardiovascular Research*. **70**: 181-190.