

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET
POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE FERHAT ABBAS-SETIF-
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

MEMOIRE

Pour l'obtention du Diplôme de

MAGISTER

EN BIOCHIMIE

Option : Biochimie appliquée

Présenté par :

ROUBA LAMIA

THEME

**Activités antioxydante et anticoagulante des
polyphénols des graines de *Nigella sativa* L.**

Devant le jury :

Dr. SENATOR Abderrahmane

Prof. à l'Université de Sétif

Président

Dr. BELATTAR Noureddine

Prof. à l'Université de Sétif

Rapporteur

Dr. BEGHIANI Abderrahmane

Prof. à l'Université de Sétif

Examineur

Dr. HOUCHER Bekhouche

Prof. à l'Université de Sétif

Examineur

2011-2012

Remerciements

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience pour réaliser ce travail.

*J'exprime ma profonde gratitude à Mr le professeur **BELATTAR.N** pour les conseils, l'encadrement et le soutien moral qu'il a su m'apporter tout au long de ces trois années de travail. Je tiens également à le remercier de toute la patience dont il a su faire preuve au cours de la rédaction de mon mémoire.*

*Au Professeur **SENATOR A**, au Professeur **BEGHIANI A** ainsi qu'au Professeur **HOUCHER B**, j'exprime mes sincères remerciements pour avoir accepté de juger ce travail.*

*Je remercie également le Docteur **BOUZIDI A**, Qu'il veuille trouver ici l'expression de ma gratitude pour m'avoir toujours aidé chaque fois que je désirais avancer dans la recherche de différentes solutions. Soyez assuré de mon profond respect et de ma vive reconnaissance.*

*A toute l'équipe de laboratoire de biochimie appliquée (**Afaf, Sghira...**).*

Aussi, je voudrai exprimer cette reconnaissance à tous les Professeurs et Maître de conférences de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie qu'ont participé à notre formation.

Dédicace

Je tiens à dédier ce modeste travail *d'abord* :

A mes parents et ma famille qui ont toujours cru en moi et qui m'ont souvent soutenu moralement dans la réalisation de ce travail, qu'ils trouvent ici l'expression de mon profond remerciement.

*A ma chère sœur **Naima** qui n'a jamais hésiter de m'encourager.*

*A mon cher maitre Docteur **TALBI Hocine**, Qui a su me redonner confiance lorsque la motivation n'était plus au rendez-vous. Merci beaucoup.*

*A mes amis **Emy, Sara, Houda, Karima, Wafa, Assia, Karim**, vous les amis que l'éternel m'a donné, pour votre soutien moral, je vous dis merci.*

*A mon oncle **ROUBA Khaled** (rahimahou Allah) pour qui je ne suis que l'ombrage.*

A tous ceux qui ne se sentent pas notamment citer la liste est longue, je dis merci.

Résumé

L'objectif de cette étude est l'évaluation de l'activité antioxydante et anticoagulante des deux extraits polyphénoliques : extrait délipidé (ED) et extrait non délipidé (EnD) obtenus des graines de *Nigella sativa* L. cultivée dans la région de Magra (M'sila).

L'analyse qualitative des deux extraits par CCM a révélé la présence de nombreux constituants, parmi les quels la quercétine et le kœmpférol. L'analyse quantitative des deux extraits par la méthode de Folin-Ciocalteu révèle leur richesse en composés phénoliques avec des teneurs de 1544 et 1450 µg EAG/ml d'extrait pour l'ED et l'EnD, respectivement. De même la teneur en flavonoïdes a été évaluée de 523 et 578,8 µg ER/ml d'extrait, respectivement.

L'activité antioxydante des deux extraits a été évaluée *in vitro* par différents tests (DPPH, β-carotène-acide linoléique et le pouvoir réducteur). Les deux extraits démontrent une grande capacité à piéger la radical DPPH[•] avec des CI₅₀ de 7,08 et 6,50 µg /ml pour les l'ED et l'EnD, respectivement. Les résultats ont démontrés que les deux extraits sont aussi capables d'inhiber la peroxydation lipidique avec des pourcentages appréciable de l'ordre de 73% pour l'ED et 84,67 % pour l'EnD et un potentiel réducteur très important avec des CE₅₀ de 3,35 et 5,13 µg /ml, respectivement.

L'activité anticoagulante des deux extraits a été également évaluée *in vitro*, en utilisant le test du temps de céphaline-kaolin et le test de temps de Quick. Les temps de coagulation obtenus sur un plasma normal en présence des deux extraits montrent qu'ils exercent un effet anticoagulant sur les deux voies de la coagulation avec un effet plus marquée sur la voie endogène que sur la voie exogène et plus important pour l'EnD que pour l'ED.

Mots clés: *Nigella sativa* L., composés phénolique, activité antioxydante, activité anticoagulante.

Summary

The objective of this study is the evaluation of the antioxidant and anticoagulant activities of two polyphenolic extracts: extract without lipids (ED) and extract with lipids (EnD) obtained from the seeds of *Nigella sativa* L in the area of Magra (M'sila).

The qualitative analysis of the two extracts by TLC revealed the presence of many compounds, among which: quercetin and kaempferol. The quantitative analysis of the two extracts by Folin-Ciocalteu assay revealed that these were rich in phenolic compounds and the content was 1544 et 1450 µg GAE/ml of extract, respectively. Also the content of flavonoids was evaluated at 523 and 578,8 µg RE/ml of extract for the ED and the EnD, respectively.

The antioxidant activity of the two extracts was evaluated *in vitro* by different tests (DPPH, β-carotene-linoleic acid and the reducing power). The two extracts demonstrate a great capacity to trap the DPPH[•] radical with IC₅₀ of 7,08 and 6,50 µg /ml for the ED and the EnD, respectively. The results show that the two extracts are also able to inhibit lipid peroxidation with respectable percentages of about 73% for the ED and 84,67 % for the EnD and a great reducing power with EC₅₀ of 3,35 and 5,13 µg /ml, respectively.

The anticoagulant activity of these extracts was also evaluated *in vitro* by using the test of the cephalin-kaolin time, and the test of Quick time. The times of coagulation obtained on normal plasma in the presence of these extracts indicate that they carry an anticoagulant effect on the two pathways of coagulation with highly marked effect on the endogenous pathway than on the exogenous pathway and more important for the EnD than the ED.

Key words: *Nigella sativa* L., phenolic compounds, antioxidant activity, anticoagulant activity.

الملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقدير النشاطية المضادة للأكسدة و النشاطية المضادة للتخثر الدموي للمستخلصين الفينوليين المنزوع الدسم وغير المنزوع الدسم المتحصّل عليهما من بذور الحبة السوداء المزروعة بمنطقة مقرة (ولاية مسيلة). أظهر التحليل النوعي للمستخلصين بطريقة كروماتوغرافيا الطبقات الرقيقة وجود العديد من المركبات منها الكرسيتين و الكمفيرول. أما التحليل الكمي للمستخلصين الفينوليين المنزوع الدسم وغير المنزوع الدسم بطريقة Folin-Ciocalteu فكشفت عن غنى المستخلصين بالمركبات الفينولية حيث قدر المحتوى ب 1544 و 1450 ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك/مل مستخلص، على التوالي. في حين أن محتوى المستخلصين من الفلافونات فهو 523 و 578,8 ميكروغرام مكافئ روتين/مل مستخلص، على التوالي.

النشاطية المضادة للأكسدة للمستخلصين تم تقديرها مخبريا باستعمال اختبارات مختلفة (DPPH، البيتا-كاروتان-حمض اللينولييك، القدرة الارجاعية). أوضحت الدراسة قدرة عالية للمستخلصين على التقاط الجذر الحر ب CI_{50} تعادل 7,08 و 6,5 ميكروغرام/مل بالنسبة للمستخلصين المنزوع الدسم وغير المنزوع الدسم، على التوالي. كما أوضحت النتائج قدرة المستخلصين على تثبيط الأكسدة الليبيدية بنسبة تعادل 73% و 84,67%، على التوالي. أما القدرة الارجاعية للمستخلصين فكانت جد معتبرة حيث قدرت CE_{50} ب 3,35 و 5,13 ميكروغرام/مل، على التوالي.

النشاطية المضادة للتخثر الدموي للمستخلصين تم تقديرها أيضا مخبريا و هذا باستعمال اختبار زمن سيفالين كاولين واختبار زمن كويك. أزمنة التخثر المحصّل عليها في بلازما عادية في وجود المستخلصين تبين أن هذين الأخيرين يمارسان نشاطية مضادة للتخثر على كلا مسريا التخثر الدموي و أن هذه النشاطية تكون أكثر فعالية على المسرى الداخلي مقارنة مع المسرى الخارجي و أكثر فعالية بالنسبة للمستخلص غير المنزوع الدسم مقارنة مع المستخلص المنزوع الدسم.

الكلمات المفاتيح: الحبة السوداء، المركبات الفينولية، النشاطية المضادة للأكسدة، النشاطية المضادة للتخثر الدموي.

Liste des figures

Figure 1: Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les EOR.....	06
Figure 2: Les trois étapes de la peroxydation lipidique.....	07
Figure 3: Déroulement de l'athérosclérose et la formation de l'athérombose.....	12
Figure 4: Les voies de la coagulation.....	14
Figure 5: Voies de production des espèces réactives et leurs détoxification enzymatique.....	15
Figure 6: Représentation simplifiée de la voie de biosynthèse des polyphénols végétaux.....	17
Figure 7: Structure générale du noyau des flavonoïdes.....	18
Figure 8: Aspect morphologique de la plante <i>Nigella sativa</i> L.....	23
Figure 9: Etapes d'extraction des composés polyphénoliques des graines de <i>Nigella sativa</i> .	30
Figure 10: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	32
Figure 11: Courbe d'étalonnage de la rutine.....	33
Figure 12 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.....	33
Figure 13: Chromatographie sur couches minces des extraits des graines de <i>Nigella sativa</i> .	38
Figure 14 : Activité antiradicalaire des extraits des graines de <i>Nigella sativa</i> , de certains de leurs principaux composés et de BHT.....	42
Figure 15: Cinétique de blanchissement du β -carotène à 490 nm en présence des extraits des graines de <i>Nigella sativa</i> , de certains de leurs principaux composés et de BHT.....	44
Figure 16: Pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique des extraits des graines <i>Nigella sativa</i> , de certains de leurs principaux composés et de BHT.....	45
Figure 17 : Le pouvoir réducteur des extraits des graines de <i>Nigella sativa</i> , de certains de leurs principaux composés et de BHT.....	47
Figure 18 : Temps de céphalin-kaolin des extraits des graines de <i>Nigella sativa</i> , de certains de leurs principaux composés et de l'héparine.....	49
Figure 19: Temps de Quick des extraits des graines de <i>Nigella sativa</i> , de certains de leurs principaux composés et de l'héparine.....	51

Liste des tableaux

Tableau I: Les principales espèces réactives générées dans les systèmes biologiques	04
Tableau II: Les principales affections liées au stress oxydant.....	09
Tableau III: La composition chimique de graines de <i>Nigella sativa</i> en huiles fixes.....	25
Tableau IV: Rapports frontaux des spots issus de la séparation des deux extraits polyphénoliques des graines de <i>Nigella sativa</i> ainsi que ceux des témoins utilisés	39
Tableau V: Teneur des polyphénols totaux dans les graines de <i>Nigella sativa</i>	40
Tableau VI: Teneurs en flavonoïdes dans les extraits des graines de <i>Nigella sativa</i>	40
Tableau VII : Activité antiradicalaire des extraits polyphénoliques des graines de <i>Nigella sativa</i> , de certains de leurs principaux composés et de BHT	41
Tableau VIII : Le pouvoir réducteur des extraits des graines de <i>Nigella sativa</i> , de certains de leurs principaux composés et de BHT	46
Tableau IX : Temps de céphaline-kaolin des extraits des graines de <i>Nigella sativa</i> , de certains de leurs principaux composés et de l'héparine	48
Tableau X: Temps de Quick des extraits des graines de <i>Nigella sativa</i> , de certains de leurs principaux composés et de l'héparine	50

Liste des abréviations

AGPI:	Acide gras polyinsaturé
BHT:	Butylated hydroxytoluén
DPPH:	1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl
ED:	Extrait délipidé
EnD:	Extrait non délipidé
EAG:	Equivalent d'acide gallique
ER :	Equivalent de rutine
ERO:	Espèces réactives oxygénés
ERN:	Espèces réactives azotés
CAT:	Catalase
CE ₅₀ :	Concentration effective à 50%
CI ₅₀ :	Concentration inhibitrice de 50%
GPx:	Glutathion peroxydase
GR :	Glutathion réductase
G6PD:	Glucose 6 phosphodéshydrogénase
HPLC:	High performance liquid chromatography
IL-1 β :	Interleukin-1 β
LDL:	Low density lipopoeins
NADPH:	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NK:	Naturel killer
p/v:	Poids/volume
Rf:	Rapport frontal
SD :	Standard deviation
SOD:	Superoxyde dismutase
TCK:	Temps de céphaline-kaolin
TNF α :	Tumor necrosis factor

TQ: Temps de Quick
TXA₂: Thromboxane A₂
v/v: Volume /volume
rpm : Rotation par minute

SOMMAIRE

Introduction	01
--------------------	----

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. STRESS OXYDATIF	03
I.1. Définition	03
I.2. Les radicaux libres	03
I.2.1. Sources des espèces réactives	03
➤ Sources endogènes.....	04
➤ Sources exogènes.....	05
I.2.2. Rôle physiologique des espèces réactives.....	05
I.3. Conséquences biologiques du stress oxydatif	06
I.4. Pathogénie du stress oxydatif.....	08
I.4.1. Athérosclérose.....	09
I.4.1.1. Définition	09
I.4.1.2. Facteurs de risque.....	09
I.4.1.3. Athérogénèse.....	10
I.6. Systèmes de défenses antioxydants.....	14
II. LES POLYPHENOLS	16
II.1. Généralités	16
II.2. Localisation et rôle biologique des polyphénols.....	18
II.3. Propriétés biologiques des polyphénols.....	19
II. 3.1. Propriétés antioxydantes des polyphénols	19
II.3.2. Propriétés pro-oxydantes des polyphénols	20

II.3.3. Propriétés antithrombotiques des polyphénols	20
II.3.4. Propriétés cardioprotectrices.....	21
II.3.5. Propriétés anti-inflammatoires et immunologiques	21
II.3.6. Propriétés antivirales et antibiotiques	22
II.3.7. Propriétés antinéoplasiques.....	22
III. LA PLANTE <i>Nigella sativa</i> L.....	23
III.1. Généralités	23
III.2. Composition chimique des graines de <i>Nigella sativa</i>	24
III.2.1. Les protéines et les carbohydrates	24
III.2.2. Les huiles fixes	24
III.2.3. Les huiles essentielles.....	25
III.2.4. Les Polyphénols.....	25
III.3.5. Les vitamines et sels minéraux	25
III.3. Propriétés pharmacologiques des graines de <i>Nigella sativa</i>	26
III.3.1. Activité antioxydante.....	26
III.3.2.Activité antimicrobienne	27
III.3.3.Effets anti-inflammatoire et analgésique.....	27
III.3.4.Effets anticancéreux et antimutagène	28
III.3.5.Effets sur le système immunitaire	28

PARTIE EXPERIMENTALE

I. MATERIEL ET METHODES	29
I.1. Matériel	29
I.2. Méthodes	29
I.2.1. Préparation des extraits	29
I.2.1.1. Préparation de l'extrait phénolique non délipidé	29

I.2.1.2. Préparation de l'extrait phénolique délipidé	30
I.2.2. Caractérisation des extraits.....	30
I.2.2.1. Caractérisation qualitative.....	30
I.2.2.2. Caractérisation quantitative.....	31
I.2.3. Activités antioxydantes	33
I.2.3.1. Test du radical DPPH.....	33
I.2.3.2. Test du β -carotène-acide linoléique	34
I.2.3.3. Test du pouvoir réducteur	35
I.2.4. Activités anticoagulantes.....	36
I.2.4.2. Activité anticoagulante vis-à-vis la voie endogène.....	36
I.2.4.3. Activité anticoagulante vis-à-vis la voie exogène.....	36
II. RESULTATS ET DISCUSSION	38
II.1. Caractérisation des polyphénols des graines de <i>Nigella sativa</i>	38
II.1.1. Caractérisation qualitative	38
II.1.2. Caractérisation quantitative	39
II.2. Activités biologiques des extraits	41
II.2.1. Activités antioxydantes.....	41
II.2.1.1. Test du radical DPPH	41
II.2.1.2. Test du β -carotène-acide linoléique.....	44
II.2.1.3. Test du pouvoir réducteur	46
II.2.2. Activités anticoagulantes	48
II.2.2.1. Activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène.....	48
II.2.2.2. Activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène.....	50
Conclusion et perspectives	53

Références bibliographiques	54
-----------------------------------	----

INTRODUCTION

Le stress oxydatif est impliqué dans l'apparition de plusieurs maladies secondaires à sa grande capacité d'endommager presque tous les types de constituants cellulaires dans l'organisme notamment les LDL (low density lipoprotein) (Pincemail *et al.*, 2002 ; Martinez-Cayuela, 1995 ; Sorg, 2004).

L'athérosclérose est une pathologie inflammatoire chronique, caractérisée par la formation d'une lésion dans la paroi des moyennes et grosses artères, dont les LDL oxydées sont impliquées dans la formation de la plaque athéromateuse (Beaudeau *et al.*, 2006). Les complications majeures de l'athérosclérose surviennent lors de sa rupture et des phénomènes de thrombose qui sont à l'origine des infarctus et des accidents cardio ou neurovasculaires, premières causes de mortalité (Han *et al.*, 2012).

L'augmentation de l'apport nutritionnel en antioxydants naturels, dépourvus des effets néfastes des antioxydants synthétiques, s'avère très utile dans la prophylaxie et le traitement des maladies dans lesquels le stress oxydant est incriminé (Favier, 2003). D'autre part plusieurs études sont focalisées sur la recherche des anticoagulants naturels pour traiter les maladies thrombotiques sans effets secondaires des traitements anticoagulants synthétiques (les héparines et les anti-vitamines K) (Pawlaczyk *et al.*, 2011). 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 de nombreuses pathologies telles que l'hypertension, le diabète, la fièvre, l'inflammation...etc (Raza *et al.*, 1999). Plusieurs études ont été réalisées sur la composition chimique de ces graines en corrélation avec leurs propriétés pharmacologiques (anti-inflammatoire, antioxydante, antidiabétique, anticancéreuse, antimicrobienne) (Salem, 2005), mais très peu de recherche sont menées sur les polyphénols; principes actifs probablement responsables de ces activités pharmacologiques.

Dans ce contexte s'inscrit ce présent travail dont l'objectif essentiel consiste à évaluer l'activité antioxydante et anticoagulante des extraits polyphénoliques des graines de *Nigella sativa*.

Ce travail a été réalisé en trois étapes :

- La première étape correspond à l'extraction de deux extraits phénolique (extrait délipidé et extrait non délipidé) à partir des graines de *Nigella sativa* L. cultivée dans la région de Magra (M'sila), et la caractérisation qualitative par chromatographie sur couches minces et quantitative du contenu en polyphénols et en flavonoïdes.

- La deuxième étape consiste à l'évaluation de l'activité antioxydante, *in vitro*, des deux extraits en utilisant différents tests: test de radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl), test de potentiel réducteur, test de blanchissement de β -carotène)

- La troisième étape correspond à la détermination de l'activité anticoagulante des deux extraits polyphénoliques vis-à-vis de la voie endogène et la voie exogène de la coagulation à travers les tests du temps de céphaline-kaolin et du temps de Quick respectivement.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. STRESS OXYDATIF

I.1. Définition

Le stress oxydant est communément défini comme un déséquilibre entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydantes d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire (Barouki, 2006 ; Roberts et Sindhu, 2009). Ce déséquilibre peut avoir diverses origines telles que la surproduction endogène d'agents pro-oxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, herbicides, ozone, amiante, métaux toxiques) (Kocchilin-Ramonatxo, 2006).

I.2. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe, cet état leur confère un degré considérable de réactivité (Singh *et al.* , 2008).

Les radicaux libres qui proviennent de l'O₂ sont appelés espèces réactives oxygénés (ERO) incluant essentiellement l'anion superoxyde (O₂^{•-}) et le radical hydroxyle (OH[•]). Les radicaux libres qui sont générés de la réaction de l'oxygène avec l'azote sont appelés espèces réactives azotés (ERN) notamment le monoxyde d'azote (NO[•]) et le dioxyde de nitrogène (NO₂[•]) (Boots *et al.* , 2008 ; Wang *et al.* , 2011). Ces espèces réactives oxygénées et azotées regroupent non seulement des radicaux libres mais également des dérivés non radicalaires qui sont très réactives et peuvent être des précurseurs des radicaux libres, parmi ces dérivés non radicalaires on distingue: l'oxygène singulier (¹O₂), l'ozone (O₃), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), l'acide hypochlorique (HOCl) et le peroxydinitrite (ONOO⁻) (Tableau I) (Favier, 2003 ; Kohen et Nyska, 2002).

I.2.1. Sources des espèces réactives

Les ERO et les ERN sont produites dans l'organisme par de nombreux mécanismes tant endogènes qu'exogènes.

Tableau I : Les principales espèces réactives générées dans les systèmes biologiques.

Nom	Symbole
Espèces radicalaires	
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot -}$
Radicale hydroxyle	OH^{\cdot}
Monoxyde d'azote	NO^{\cdot}
Dioxyde de nitrogène	NO_2^{\cdot}
Espèces non radicalaires	
Oxygène singulier	1O_2
Ozone	O_3
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Acide hypochlorique	$HOCl$
Peroxynitrite	$ONOO^-$

➤ Sources endogènes

Au cours du métabolisme normale et notamment lors du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, l'anion superoxyde est produit. Si usuellement cette production de radicaux superoxydes reste faible et ne concerne qu'un faible pourcentage de l'oxygène utilisé par la respiration (environ 2%) elle peut s'amplifier avec l'augmentation du volume de l'oxygène consommé dans certaines situations tel que l'augmentation de l'intensité respiratoire (effort physique, hyperoxie) et lors des désordres inflammatoires ou nutritionnels (Favier, 2003 ; Bonnefont-Rousselot, 2007).

Au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, la chaîne de transfert d'électron fait intervenir des cytochromes P450 qui peuvent produire des ERO au cours des réactions de détoxification des drogues et d'autres produits métaboliques toxiques. Ces réactions prennent lieu principalement au niveau du foie (Barouki, 2006).

L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits directement par les cellules phagocytaires activées qui sont le siège d'un phénomène appelé explosion oxydative consistant en l'activation du complexe de la NADPH oxydase, enzyme capable d'utiliser l'oxygène moléculaire pour produire de grandes quantités d'anions superoxydes au niveau de la membrane cellulaire (Martinez-Cayuela, 1995).

La xanthine oxydase est une enzyme qui joue un rôle important dans le catabolisme des purines. Elle génère des ERO lors de l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine, et de la xanthine en acide urique (Harrison *et al.*, 2003).

L'activation des phospholipases induit la libération de l'acide arachidonique des phospholipides membranaires. L'acide arachidonique est métabolisé par la cyclo-oxygénase et la lipo-oxygénase en prostaglandines et leucotriènes respectivement. Cette voie implique un transfert d'électrons qui pourrait initier la formation des ERO, principalement de superoxyde (Adibhatla et Hatcher, 2006).

➤ Sources exogènes

Les rayonnements sont par différents mécanismes des sources de radicaux libres, qu'il s'agisse des rayons ionisants X ou gamma, ou des rayons ultraviolets capables de produire des anions superoxydes, de l'oxygène singulier, de radicaux hydroxyle et de peroxyde d'hydrogène (Kohen et Nyska, 2002).

L'ingestion d'alcool est suivie de la formation de radicaux libres selon divers mécanismes impliquant principalement la xanthine oxydase et l'aldéhyde oxydase qui peuvent oxyder le métabolite principal de l'éthanol, l'acétaldéhyde, avec production de superoxyde. L'éthanol stimule également la production d'anion superoxyde par induction de la transcription des NADPH oxydase, NADPH cytochrome réductase et du cytochrome P450 (Milane, 2004).

Une large variété de xénobiotiques (toxines, pesticides et herbicides) et médicaments (antibiotiques et anticancéreux) peuvent contribuer à la production des ERO qui se forment comme produits de leur métabolisme *in vivo* (Martínez -Cayuela, 1995).

I.2.2. Rôle physiologique des espèces réactives

La production des ERO et des ERN est permanente et physiologique, elle n'est pas limitée aux conditions pathologiques, car ces espèces réactives participent à de nombreuses fonctions biologiques (Kocchilin-Ramonatxo, 2006). A titre d'exemple le NO[•] est une espèce réactive très répandue qui agit comme une molécule de signalisation dans divers phénomènes physiologiques notamment la vasodilatation des cellules musculaires lisses, la régulation de la pression artérielle, la neurotransmission et les mécanismes de défense (Favier, 2003 ; Valko *et al.*, 2006 ; Singh *et al.*, 2008 ; Boots *et al.*, 2008). Ces espèces réactives (O₂^{•-}, H₂O₂, NO[•], ONOO⁻, HOCl) participent aussi à la différenciation cellulaire, l'apoptose, l'immunité et la défense contre les micro-organismes (Favier, 2003 ; Roberts et Sindhu, 2009) et la régulation de nombreux facteurs de transcription tels que l'AP-1 (Activator protein-1) et le HSF-1 (heat

shock factor-1) qui activent des gènes dits protecteurs pour la cellule. Ces gènes régulent l'expression de molécules de défense telles que les antioxydants ou les HSP (heat shock protein) qui contribuent aux processus de réparation et de régénération cellulaire. Les ERO participeraient également à l'amélioration du captage musculaire du glucose et à la reconstitution des stocks en glycogène musculaire (Kocchilin-Ramonatxo, 2006).

I.3. Conséquences biologiques du stress oxydatif

L'accumulation des ERO 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 (Singh *et al.*, 2008) (Figure 1).

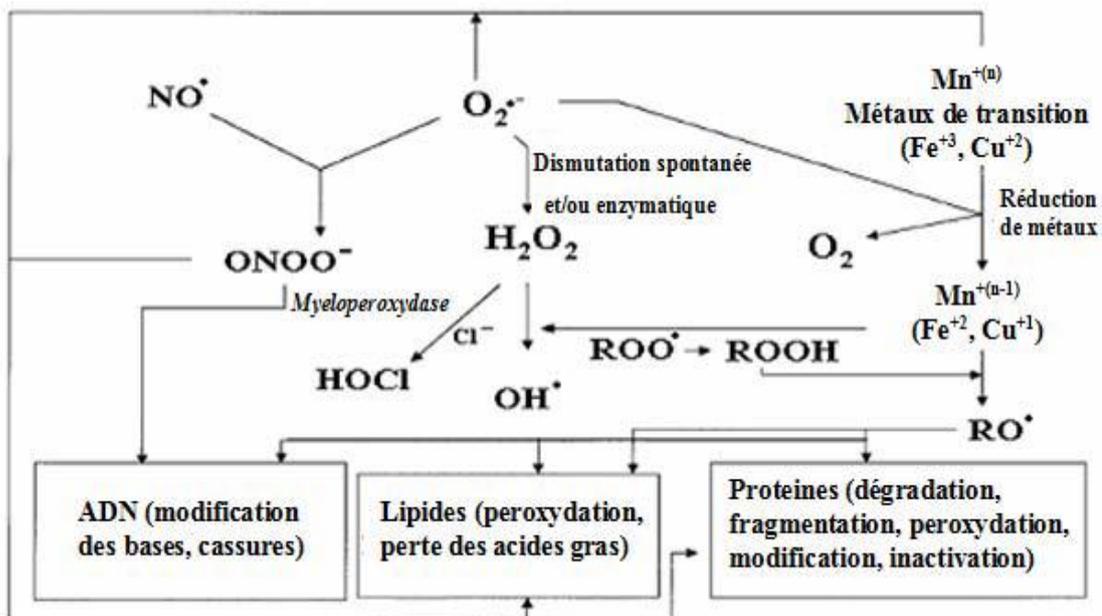


Figure 1 : Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les ERO

(Kohen et Nyska, 2002).

Les lipides et particulièrement les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont la cible privilégiée des ERO en raison de leurs hydrogènes bis allyliques facilement oxydables. Comme ces derniers sont les constituants majeurs des membranes cellulaires et des lipoprotéines, on comprend leur vulnérabilité particulière (Kohen et Nyska, 2002). L'oxydation lipidique connue généralement sous le nom de « la peroxydation lipidique » se déroule en trois phases (Figure 2) :

➤ **L'initiation** : caractérisée par une attaque de l'hydrogène d'un AGPI (LH) par une espèce réactive libérant un radical acide gras (L^\bullet). En présence d' O_2 le radical acide gras (L^\bullet) est transformé en radical peroxyde (LOO^\bullet) (Baudin, 2006 ; Martínez-Cayuella, 1995).

➤ **La propagation** : le radical peroxyde (LOO^\bullet) enlève un hydrogène à un nouvel AGPI voisin qui à son tour produira un radical acide gras (L^\bullet) puis un radical peroxyde (LOO^\bullet), une réaction en chaîne s'installe, le radical peroxyde est donc converti, par arrachement de l'hydrogène de l'AGPI, en hydroperoxyde (LOOH). 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).

➤ **Terminaison** : consiste à terminer la réaction radicalaire soit par la combinaison de deux radicaux peroxydes pour former un peroxyde (LOOL) relativement stable, soit par la neutralisation des radicaux libres par des antioxydants notamment les flavonoïdes (Kohen et Nyska, 2002 ; Cillard et Cillard, 2006).

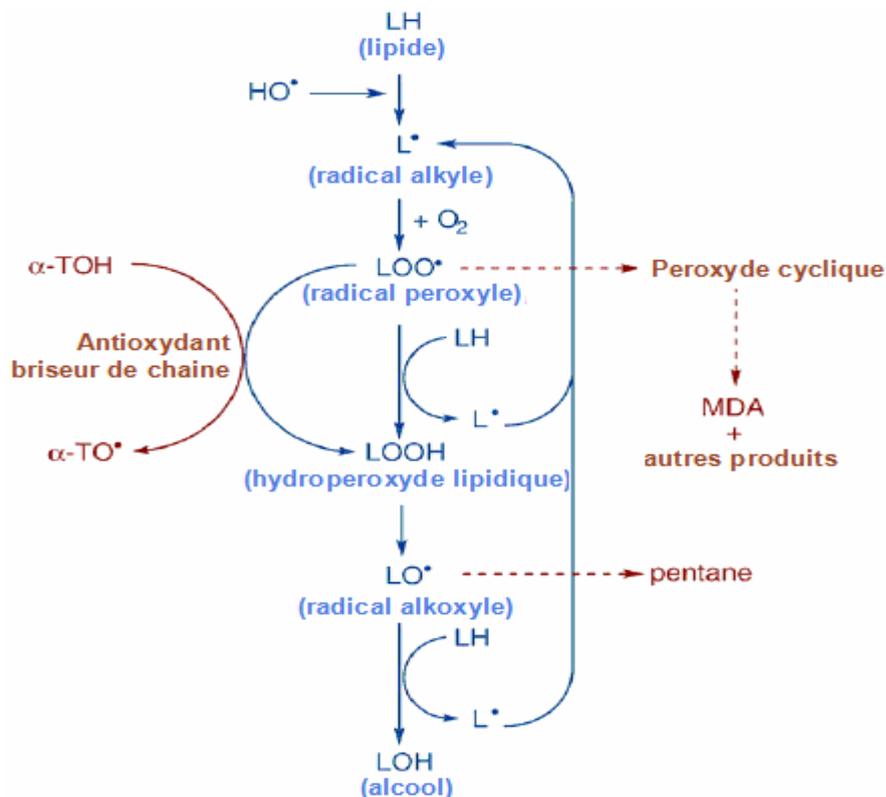


Figure 2 : Les trois étapes de la peroxydation lipidique (Sachdev et Davies, 2008).

MDA : Malondialdéhyde ; $\alpha\text{-TH}$: α -tocophérol.

Les protéines *via* les acides aminés constituent une autre 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 (Valko *et al.*, 2007). Ces modifications oxydatives des protéines conduisent à une

modification de la conformation spatiale et une altération de la fonction biologique de cette protéine (enzyme, récepteur, facteur de transcription) (Favier, 2003 ; Aourousseau *et al.* , 2004 ; Kocchilin-Ramonatxo 2006).

L'ADN nucléaire ou mitochondrial constitue également une cible majeure des ERO et des ERN (Kocchilin-Ramonatxo, 2006). Les bases puriques, pyrimidiques et le désoxyribose sont la cible privilégiée de ces radicaux, ils sont alors transformés en produits de fragmentations et en bases oxydées (Martinez-Cayuela, 1995). Le radical hydroxyle est le plus réactif envers les bases azotées et le désoxyribose (Kocchilin-Ramonatxo, 2006 ; Baudin, 2006), alors que l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène ne sont pas génotoxiques mais leur effet peut être attribué à leur contribution dans la génération du radical hydroxyle et peroxyde d'hydrogène (Kocchilin-Ramonatxo, 2006). Les dommages oxydatifs de l'ADN sont impliqués dans la mutagenèse, la cancérogenèse et le vieillissement (Devasagayam *et al.* , 2004 ; Valko *et al.* , 2006).

I.4. Pathogénie du stress oxydatif

En raison de leur réactivité élevée, les ERO 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 a été démontré (Favier, 2003). En fait, de nombreuses études, tant épidémiologiques que cliniques, indiquent que le stress oxydatif 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 II) (Martinez-Cayuela, 1995 ; Sorg, 2004). En effet, 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 des radicaux libres (Sohal *et al.* , 2002).

Tableau II : Les principales affections liées au stress oxydant.

Pathologie	Références
- Athérosclérose	(Singh et Jialal, 2006)
- Cancer	(Valko <i>et al.</i> , 2006)
- Maladies cardiovasculaires	(Devasagayam <i>et al.</i> , 2004)
- Hypertension artérielle	(Gall <i>et al.</i> , 2006)
- Diabète type II	(Hopps <i>et al.</i> , 2010)
- Pathologies ischémiques et post-ischémiques	(Kohen et Nyska, 2002)
- Arthrite rhumatoïde	(Devi <i>et al.</i> , 2007)
- Maladies respiratoires (broncho-pneumopathies chroniques obstructives, œdème pulmonaire et syndrome de détresse respiratoire aigu)	(Kocchilin-Ramonatxo ; 2006, Favier, 2003)
- Maladies neurodégénératives (la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson idiopathique et la sclérose latérale amyotrophique)	(Desport et Couratier, 2002)
- Maladies de système (lupus érythémateux disséminé)	(Martinez-Cayuela, 1995)
- Cataracte	(Tessier et Marconnet, 1995)

I.5. Athérosclérose

I.5.1. Définition

L'athérosclérose est définie selon l'Organisation Mondiale de la Santé comme « une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibre, consistant en une accumulation locale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôt calcaires; le tout s'accompagnant de modifications de la media » (Bonnet, 2005).

I.5.2. Facteurs de risque

L'athérosclérose est une pathologie multifactorielle qui résulte de la combinaison entre des facteurs de risque non-modifiables que sont l'âge, le sexe masculin et les antécédents familiaux, et des facteurs environnementaux modifiables tels qu'une alimentation riche en graisses et en sucres, l'inactivité et le tabagisme. De telles conditions de vie favorisent l'installation d'une hypertension artérielle, d'un diabète de type II, de dyslipidémies et de l'obésité, pathologies qui accélèrent la formation des plaques et leurs complications (Lusis, 2000).

I.5.3. Athérogénèse

Les mécanismes physiopathologiques de formation et d'évolution des lésions athéromateuses vasculaires sont liés à différents facteurs de risque tels l'hypertension, l'hyperlipidémie, le diabète, le tabagisme... etc. pour lesquels le stress oxydant est retrouvé, à des degrés divers, comme composante des événements cellulaires et moléculaires délétères pour le tissu vasculaire, à la fois dans sa structure et ses fonctions (Beaudeau *et al.* , 2006).

L'implication du stress oxydant dans les pathologies cardiovasculaires a été initialement révélée par l'oxydation des LDL dont la modification biochimique qui en résultait leur confère un pouvoir athérogène (Beaudeau *et al.* , 2006). L'oxydation de ces lipoprotéines représente l'étape initiale de l'athérogénèse, elle entraîne des modifications progressives à la fois des lipides et de la copule protéique (apoprotéine B) de la lipoprotéine (Singh et Jialal, 2006).

La première étape d'athérogénèse consiste en l'accumulation des LDL au niveau de l'intima (première couche la paroi vasculaire en contact avec le sang) suite à un déséquilibre entre leur flux d'entrée caractérisé par une augmentation de leur concentration plasmatique. Par ailleurs, le dysfonctionnement endothélial (augmentation de la perméabilité endothéliale) favorise la fixation de ces lipoprotéines sur les protéoglycanes et le collagène. Les radicaux libres oxygénés libérés par les cellules endothéliales, les macrophages et les cellules musculaires lisses vont ultérieurement oxydées ces lipoprotéines (Duriez, 2004). Les LDL oxydées vont par ailleurs stimuler la surexpression d'enzymes oxydantes (15-lipo-oxygénase) ce qui va aggraver le processus oxydatif des LDL (Galle *et al.* , 2006). L'accumulation de ces LDL oxydées va stimuler les cellules endothéliales à produire de nombreuses molécules pro-inflammatoires telles que les molécules d'adhésion, les protéines chimiotactiques notamment le MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1), et des facteurs de croissance (macrophage colony-stimulating factor) qui conduisent à l'activation de la réaction inflammatoire et le recrutement des leucocytes (monocytes et lymphocyte T) vers l'intima des artères (Schwenke, 1998). Cette infiltration sous endothéliale va favoriser en plus la conversion des monocytes en macrophages dont la mobilité est inhibée ce qui empêche ainsi leur retour vers le compartiment sanguin en les piégeant dans le sous-endothélium (macrophages résidents) (Duriez, 2004). Les LDL oxydées sont ensuite captées rapidement par les macrophages de la paroi artérielle *via* des récepteurs spécifiques dits scavengers et deviennent des cellules riches en lipides nommées les cellules spumeuses (Sorg, 2004 ; Wang, 2011). D'autre part les LDL oxydées provoquent la surexpression de récepteurs scavengers ce qui favorise leurs captation et la formation des cellules spumeuses (Leopold et Loscalzo, 2009). Les cellules spumeuses et les leucocytes activées libèrent par la suite différents médiateurs qui amplifient le processus

inflammatoire d'une part et d'autre part induisent la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses (CML) du média (la deuxième couche de la paroi vasculaire) vers l'intima (Lusis, 2000). Ces cellules encapsulent progressivement le centre lipidique formé de débris cellulaires, de lipides libérés par les cellules nécrotiques, de cellules spumeuses et de quelques CML par une chape fibreuse constituée de collagène de type I et III, de glycoprotéines (fibronectine) et de glycosaminoglycanes, c'est la plaque athéromateuse. Le développement de cette plaque se fait alors aux dépens de la lumière artérielle et conduit à son obstruction progressive (Paul et Baudin, 2009) (Figure 3).

Une plaque est dite instable ou vulnérable lorsqu'elle est susceptible de subir une rupture ou une érosion. Un centre lipidique important diminue la résistance physique de la plaque, d'autant plus que les macrophages qui s'y trouvent sécrètent les métalloprotéases capables de dégrader la chape fibreuse et de diminuer davantage la résistance physique de la plaque (Duriez, 2004). Les LDL oxydés sont capables de fragiliser la plaque *via* la surexpression des métalloprotéases (Beaudeau *et al.*, 2006).

La rupture de la chape fibreuse met en contact le sang avec les éléments thrombogènes du noyau lipidique déclenchant le phénomène de thrombose initié par l'adhésion des plaquettes aux structures sous endothéliales et leurs activation, entraînant l'expression des différents récepteurs et la libération des différents médiateurs notamment l' adénosine diphosphate (ADP) et la thromboxane A₂ (TXA₂), impliqués dans l'activation et le recrutement d'autre plaquettes pour former un clou plaquettaire hémostatique composé des plaquettes reliées entre elles par des molécules de fibrinogènes et à l'aide des récepteurs membranaires glycoprotéiques (GPIIb et GPIIIa). Cet agrégat plaquettaire est rapidement consolidé par un réseau de fibrine formé après l'activation de la cascade de la coagulation (Colvin, 2004) (Figure 3). Les lipides oxydés sont capables de moduler directement les protéines de l'hémostase dans un sens globalement prothrombotique avec une augmentation de production de facteur tissulaire par l'endothélium et de thromboxane par les plaquettes (Berliner et Heinecke, 1996), mais c'est la richesse du cœur lipidique en facteur tissulaire libéré lors de l'apoptose des macrophages et activé aussi par la présence de micro-particules apoptotiques qui est un élément-clé dans le déclenchement de la cascade de la coagulation (Mallat et Tedgui, 2000).

Dans de nombreux cas, le processus thrombotique est spontanément résolutif sans survenue de symptômes ischémiques. Parfois, le thrombus rétrécit la lumière artérielle sans être totalement occlusif ou une partie du thrombus se détache de la paroi provoquant une embolie artérielle dans le territoire en aval. Enfin, la thrombose peut aussi aboutir à une

obstruction complète de l'artère conduisant, s'il n'y a pas de circulation collatérale suffisante, à une ischémie aiguë du territoire d'aval (Weissberg, 2000 ; Packard et Libby, 2008).

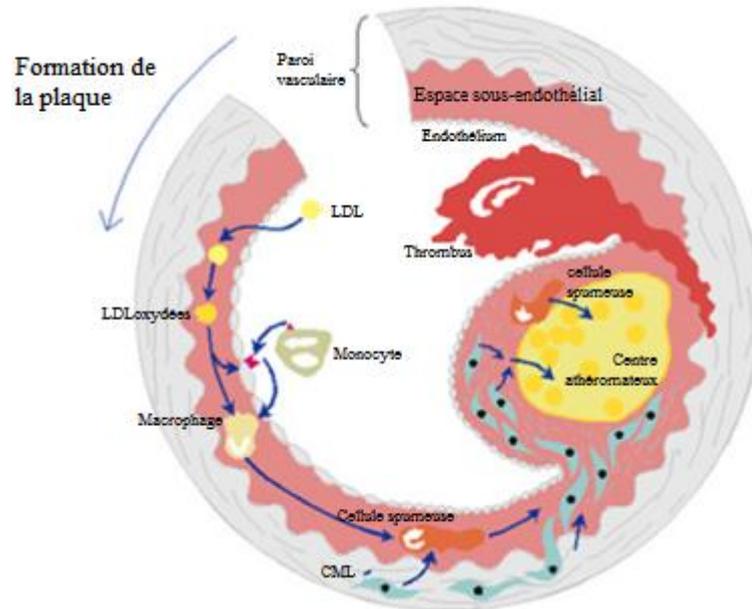


Figure 3 : Déroulement de l'athérosclérose et la formation de l'athéromatose (Cohen, 1997).

Dans les conditions physiologiques, la coagulation est activée lors d'une brèche vasculaire, car les agressions de la paroi vasculaire, en particulier de l'endothélium, démasque les structures localisées dans les cellules endothéliales. Ces différentes structures provoquent l'activation simultanée des plaquettes et des protéines de la coagulation présentes dans le sang circulant, déclenchant une série de réactions interdépendantes, à l'origine de la formation du caillot hémostatique (Samama *et al.*, 2004).

Ce caillot fibrineux est le résultat de transformation du fibrinogène en fibrine non soluble sous l'action de la thrombine. La formation de la thrombine peut se faire selon deux voies, extrinsèque ou exogène, intrinsèque ou endogène, toutes deux aboutissant à l'activation du facteur X. Ce dernier forme avec son cofacteur, le facteur V, les phospholipides plaquettaires (PL) et par l'intermédiaire aussi de calcium le complexe prothrombinase, qui catalyse la transformation de prothrombine en thrombine (Marutsuka *et al.*, 2005) (Figure 4).

Les deux voies impliquent des facteurs de coagulation qui sont des glycoprotéines dont la plupart sont des enzymes protéolytiques, type sérine protéase qui circulent dans le sang à l'état de zymogène et qui nécessitent pour leur fonctionnement des coenzymes. La coagulation est normalement régulée grâce à l'existence de processus de rétroaction positifs et négatifs dans lesquels la thrombine est impliquée d'une part et grâce à la présence des

inhibiteurs physiologiques (antithrombine III, protéine C et protéine S), d'autre part (Simonneau et Huet, 1990).

➤ **La voie endogène:** L'agent déclenchant est constitué par l'activation réciproque du facteur XII en facteur XIIa et de la prékallibréine (PK) en kallibréine au contact d'une surface chargée négativement de la matrice sous-endothéliale (collagène, sulfatides, glycoaminoglycanes) en présence d'un cofacteur, le kininogène de haut poids moléculaire (KHPM) (Simonneau et Huet, 1990 ; Renné *et al.*, 2006). Le facteur XIIa est alors capable d'activer le facteur XI, qui, à son tour, active le facteur IX. Ce dernier se lie à la surface des phospholipides anioniques des plaquettes (F3P) par l'intermédiaire des ions de calcium et forme en présence de son cofacteur, le facteur VIII le complexe tenase qui est responsable de l'activation du facteur X (Colvin, 2004, Vogler et Siedlecki, 2009) (Figure 4).

➤ **La voie exogène:** L'agent déclenchant est le facteur tissulaire dont la libération à l'occasion d'une lésion de l'endothélium vasculaire permet au facteur VII d'acquies la pleine expression de son activité protéolytique. Cette activité protéolytique s'exerce vis-à-vis du facteur IX et du facteur X, le composant protéique du facteur tissulaire jouant le rôle de cofacteur. Les facteurs IXa et Xa ainsi formés activent en retour le facteur VII (Simonneau et Huet, 1990).

La thrombine formée exerce une action protéolytique sur le fibrinogène qui détache des extrémités NH₂-terminales des chaînes A α et B β deux petits peptides A et B. Ce qui reste de la molécule de fibrinogène porte le nom de fibrine. Les monomères de fibrine sont ensuite polymérisés grâce à l'établissement de liaisons hydrogène entre deux monomères voisins puis stabilisés par l'établissement de liaisons covalentes entre différents monomères grâce au facteur XIII, au préalable activé par la thrombine en présence de calcium (Simonneau et Huet, 1990 ; Revel et Doghmi, 2004) (Figure 4).

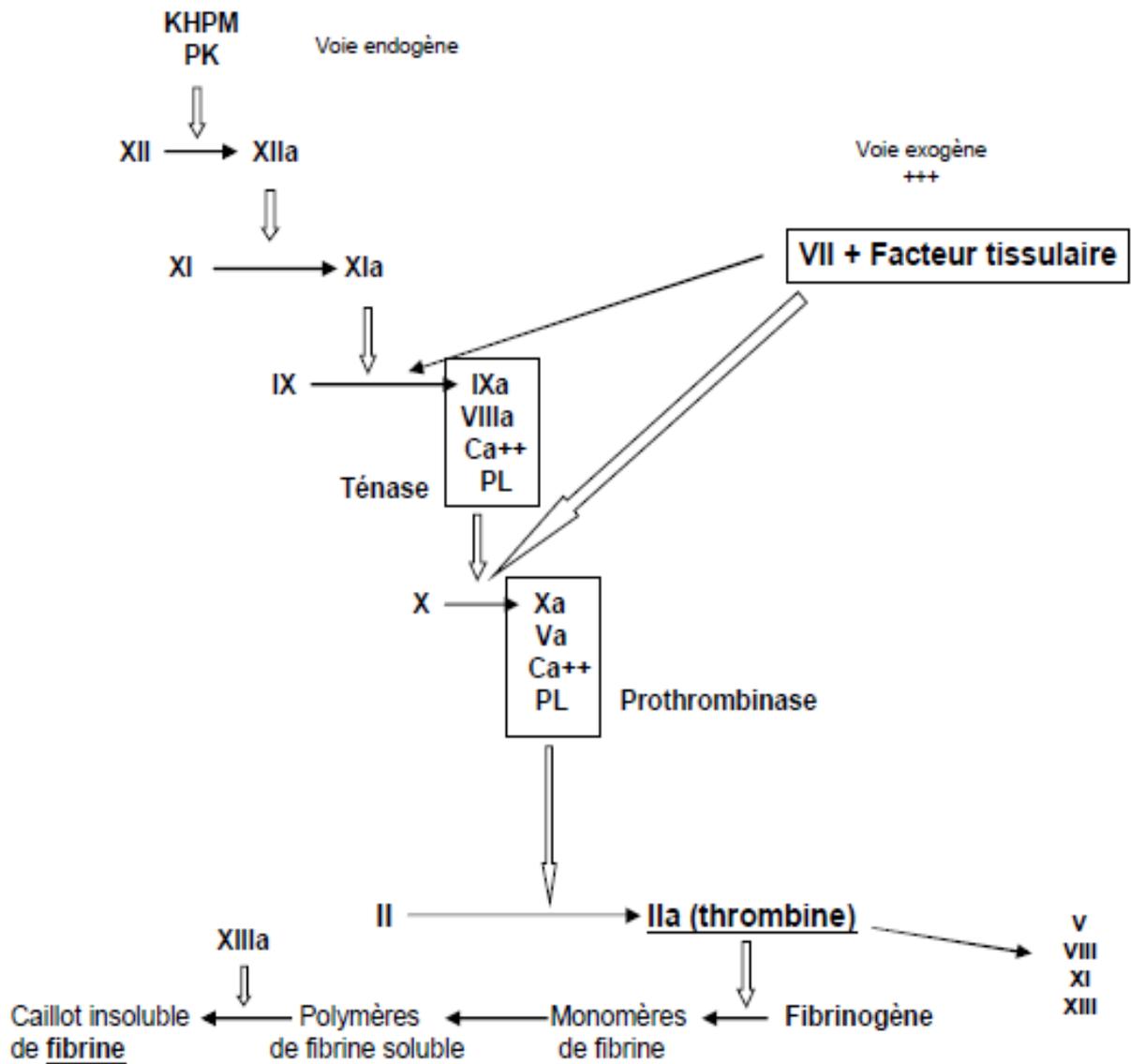


Figure 4 : Les voies de la coagulation (Vogler et Siedlecki, 2009).

KHPM : kininogène de haut poids moléculaire ; PK : prékallicréine ; PL : phospholipides plaquettaires.

I.6. Systèmes de défenses antioxydants

Pour limiter les effets délétères des espèces réactives radicalaires et non radicalaires et leurs conséquences physiopathologiques, l'état rédox intracellulaire est équilibré par des systèmes antioxydants (Leopold et Loscalzo, 2009).

Ces systèmes antioxydants sont soit des enzymes qui catalysent la conversion des molécules pro-oxydantes en molécules stables soit des molécules non enzymatiques qui piègent rapidement les espèces réactives (Valko *et al.*, 2006).

Les enzymes antioxydantes représentent un système très important pour la défense contre l'attaque radicalaire (détoxification enzymatique) et incluent principalement la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx) et la glucose-6-phosphodéshydrogénase (G6PD). 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 (Figure 5) (Oltra *et al.* , 2001 ; Devi, 2007).

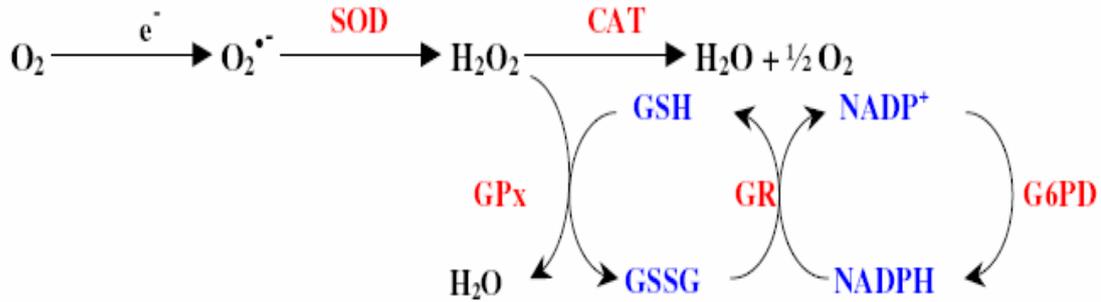


Figure 5 : Voies de production des espèces réactive et leurs détoxification enzymatique (Droge, 2002).

Les antioxydants non enzymatiques peuvent être d'origine endogène ou exogène. Parmi les antioxydants endogènes on peut citer le glutathion réduit, les thioredoxines, les glutaredoxines, les métallothionéines, l'acide lipoïque ou les polyamines. 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). Les protéines comme l'haptoglobine, la ferritine, l'albumine et la céruloplasmine agissent en diminuant la disponibilité d'agents pro-oxydants en chélatants les métaux de transition (Fer et cuivre) qui participent dans la génération des espèces très réactives (Cemeli *et al.* , 2009). Par ailleurs, les antioxydant exogènes sont apportées par l'alimentation, telles que les vitamines E (tocophérol), C (acide ascorbique), Q (ubiquinone) et 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). Les oligo-éléments comme le sélénium, le zinc, le manganèse, magnésium et le fer sont aussi considérée comme des antioxydants nutritionnels. Ils servent notamment de cofacteur aux enzymes antioxydants (la glutathion peroxydase, la SOD cytosolique, la SOD mitochondriale, la G6PD et la catalase respectivement) (Berger, 2003 ; Fang *et al.* , 2002). Les polyphénols (flavonoïdes, les tanins et les acides phénoliques) sont aussi des puissants antioxydants nutritionnels capables de complexer les métaux de transition et d'inhiber la propagation de la réaction radicalaire en piégeant différentes espèces réactives (Valko *et al.* , 2006).

II. LES POLYPHENOLS

II.1. Généralités

L'appellation polyphénols ou composés phénoliques regroupe un vaste ensemble de plus de 8000 molécules, divisées en une dizaine de classes, qui présentent dans leur structure commune au moins un cycle aromatique à 6 carbones porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (Aberoumand et Deokule, 2008). Ils peuvent être regroupés en de nombreuses classes suivant la complexité du squelette de base (noyau C6), le degré de modification de ce squelette (oxydation, hydroxylation...etc.) et enfin suivant les molécules auxquelles ils sont associés (glucides, lipides, protéines, autres métabolites). Les formes les plus simples sont représentées par deux principaux groupes dont dérivent de nombreux composés: les acides hydroxycinnamiques et les flavonoïdes. Les formes complexes quant à elles, sont pour la plupart issues de la condensation de certaines formes simples et renferment, entre autre, les tannins et les lignines (Macheix *et al.* , 2005).

Les acides hydroxycinnamiques ou phénylpropanoïdes sont des composés dont le noyau de base est en C6-C3. L'action de la phénylalanine ammonia liase (PAL) sur la phénylalanine libère un ion ammonium et forme de l'acide cinnamique qui est à son tour hydroxylé par la cinnamate 4 hydroxylase (C4H) pour former l'acide p-coumarique qui sera à l'origine de nombreuses molécules notamment l'acide caféique, l'acide férulique et l'acide sinapique. Ces acides sont rarement présents sous formes libres, ils sont en général combinés à d'autres molécules organiques. Les liaisons se font souvent au niveau des fonctions carboxyliques, ce qui conduit à la formation d'ester. L'acide chlorogénique est l'ester de l'acide caféique le plus fréquemment rencontré (liaison avec un acide quinique en C5) (Dewick, 2002) (Figure 6).

les flavonoïdes sont des composés qui ont en commun la structure du diphenylpropane (C6-C3-C6); les trois carbones servant de jonction entre les deux noyaux benzéniques notés A et B forment généralement un hétérocycle oxygéné C (Figure 7) (De Beer *et al.* , 2002 ; Heim *et al.* , 2002). Ils constituent la classe la plus importante des polyphénols avec plus de 5000 composés (Grassi *et al.* , 2010 ; Gómez-Caravaca *et al.* , 2006) qui peuvent être regroupés en quinze familles, dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les flavanonols, les isoflavones, les isoflavanones et les anthocyanes (Pietta , 2000 , Heim *et al.* , 2002). Ils sont issus du p-coumaroyl CoA et de 3 molécules de malonyl-CoA qui forment l'hydroxychalcone comprenant 2 noyaux benzéniques. Cette transformation s'effectue avec une autre enzyme clef la chalcone synthase (CHS). La fermeture de l'hétérocycle central s'effectue par la chalcone isomérase (CHI) (Winkel-Shirley, 2001). Les différentes classes de

flavonoïdes sont d'abord définies par la structure de l'hétérocycle central et son degré d'oxydation. Chaque classe de flavonoïdes est caractérisée par son degré de substitution par des groupements hydroxyles ou méthoxyles. De plus ces composés sont la plupart du temps liés à des sucres, généralement par une liaison glycosidique, qui est dégradable par une hydrolyse acide à chaud. Les conséquences de la glycosylation sont multiples telles que la modification de la couleur des pigments et la modification de la solubilité ou des propriétés biologiques (Macheix *et al.*, 2005).

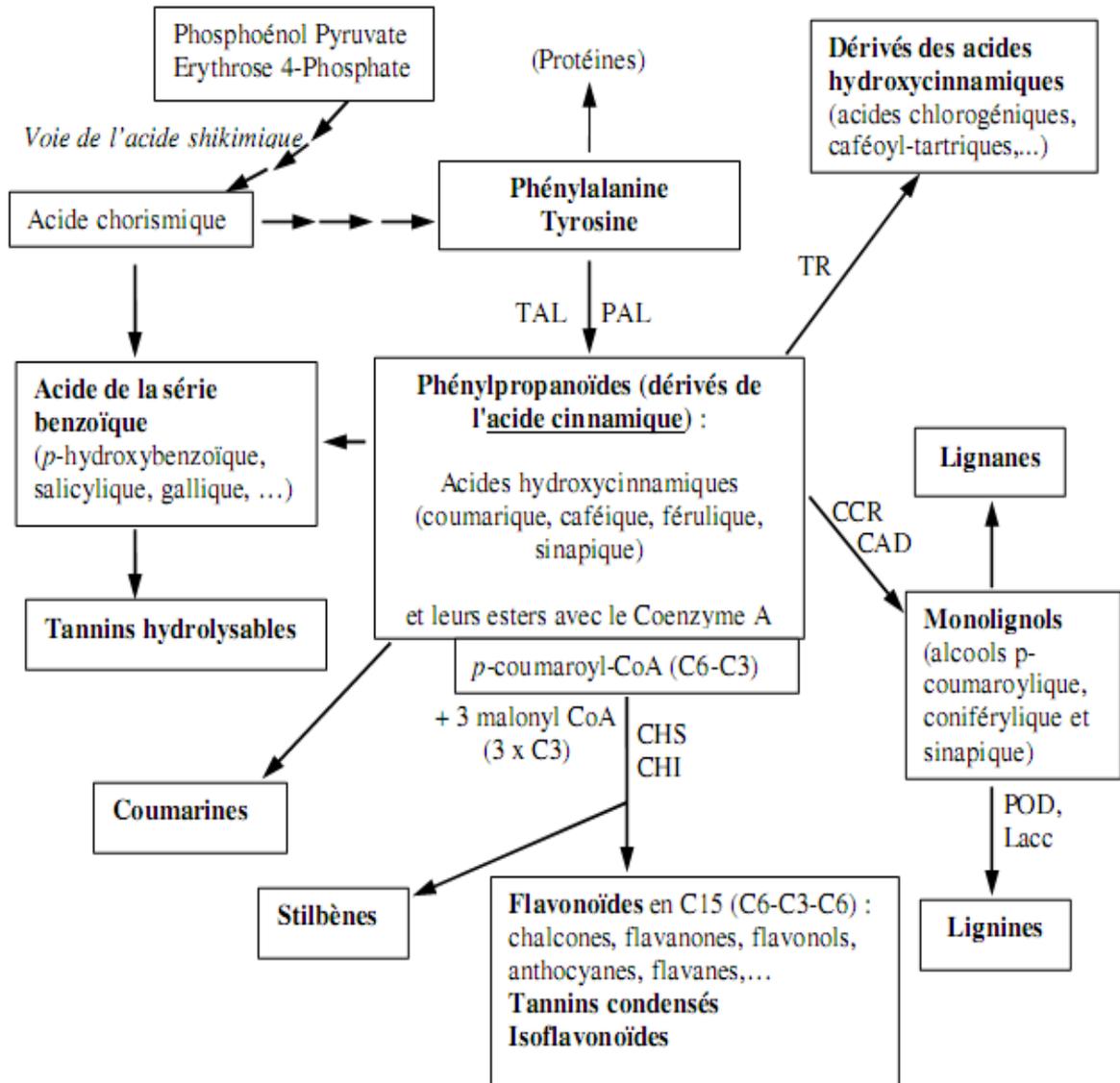


Figure 6 : Représentation simplifiée de la voie de biosynthèse des polyphénols végétaux (Macheix *et al.*, 2005).

PAL : phénylalanine ammonialyase ; TAL : tyrosine ammonialyase ; CCR : cinnamate CoA réductase ; CAD : cinnamyl alcool déshydrogénase ; CHS : chalcone synthase ; CHI : chalcone flavanone ; POD : peroxydase ; Lacc : Laccases ; TR : transférases.

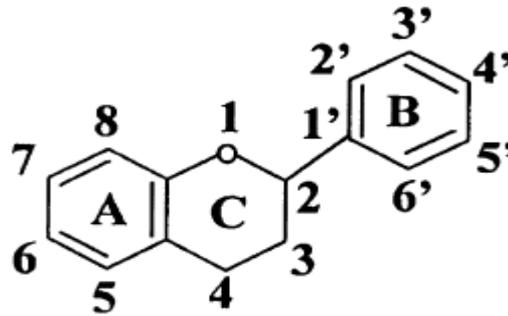


Figure 7 : Structure générale du noyau des flavonoïdes (Heim *et al.* , 2002).

II.2. Localisation et rôle biologique des polyphénols

A l'échelle cellulaire, la répartition des composés phénoliques est très caractéristique et s'accumulent principalement dans deux sites au niveau de la paroi cellulaire ou sont présentes les lignines (et quelquefois certains flavonoïdes et des molécules associées aux lignines comme l'acide férulique) et au niveau de la vacuole ou sont stockés les phénols solubles (acide chlorogénique, anthocyanes, flavonols, tanins ...etc.). Certains flavonoïdes (quercétine, kœmpférol) pourraient également être présents au niveau du noyau et de la membrane plasmique mais toujours à très faible concentration (Peer *et al.* , 2001).

A l'échelle tissulaire, on observe également des répartitions très inégales des différents composés phénoliques. Ainsi les anthocyanes et les pigments de type flavonols sont généralement présents dans les couches cellulaires externes des organes végétaux, en particulier les épidermes des fruits et des feuilles (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

Dans la majorité des cas, les flavonoïdes sont présents sous forme glycosylée dans les plantes car la glycosylation a pour effet de les rendre moins réactifs et plus hydrosolubles permettant alors leur stockage dans les vacuoles des cellules épidermiques des fleurs, de l'épiderme et du mésophylle des feuilles, des parenchymes des tiges et racines (Lhuillier ,2007). On les trouve en abondance dans les familles des Polygonacées, Apiacées, Rutacées, Astéracées, Légumineuses (Milane, 2004).

Enfin, il faut noter qu'une bonne connaissance de la répartition des composés phénoliques dans les différents tissus et organes végétaux est souvent essentielle pour orienter l'utilisation que l'homme souhaite en faire.

Les polyphénols sont indispensables pour les plantes et assurent plusieurs fonctions, notamment :

- Les flavonoïdes sont responsables de la couleur des fleurs, des fruits et des graines et jouent un rôle important dans l'attraction des pollinisateurs et des disperseurs des

graines (insectes ,oiseaux...) participant ainsi à la fertilité de la plante et la germination du pollen (Winkel-Shirley, 2001).

– Les polyphénols protègent les plantes contre la lumière ultraviolet (Harborne et Williams, 2000).

– Les polyphénols agissent comme des molécules signales dans l'interaction plante-microbe (Petti et Scully, 2009).

– Des composés phénoliques sont impliqués lorsque la plante est soumise à des blessures mécaniques. Des phénols simples sont synthétisés et l'activité peroxydasique caractéristique des tissus en voie de lignification est stimulée. Ces réactions aboutissent à la formation au niveau de la blessure d'un tissu cicatriciel résistant aux infections (Bahorun,1997). Les polyphénols jouent aussi un rôle primordial dans la protection de la plante en agissant comme antibactériens, antifongiques, antivirales et insecticides, ainsi leurs concentration augmentent après infection (Harborne et Williams, 2000).

– Les polyphénols protègent aussi les plantes contre les herbivores et les omnivores, plusieurs mécanismes ont été rapportés, les tannins ingérés par les herbivores sont toxiques et provoquent la nécrose de la muqueuse gastrointestinale et l'insuffisance rénale et hépatique (Petti et Scully, 2009).

– Les composés phénoliques déterminent également la saveur des fruits. Les tanins sont à l'origine de la sensation d'astringence des fruits non mûrs, les flavanones sont responsables de l'amertume des Citrus et peuvent donner naissance, par transformation chimique, à des dihydrochalcones à saveur sucrée (Bahorun,1997).

– Les flavonoïdes protègent la plante contre le stress oxydatif par modulation des niveaux des ERO et participent à la croissance et au développement de la plante en influençant le transport de la phytohormone l'auxine (Buer *et al.* , 2010).

– Les flavonoïdes sont des agents allélopatiques en réduisant la compétition des autres espèces des plantes par inhibition de leur germination (Buer *et al.* , 2010).

II.3. Propriétés biologiques des polyphénols

II.3.1. Propriétés antioxydantes des polyphénols

L'activité antioxydante des polyphénols est due à leur capacité de piéger les radicaux libres, à leur potentiel de donner des atomes d'hydrogène ou des électrons, et à leur pouvoir chélateur des métaux (Aberoumand et Deokule, 2008). La position et le degré d'hydroxylation sont les facteurs déterminants de cette activité (Jiménez-Atiénzar *et al.* , 2005). Les flavonoides inhibent les enzymes responsables de la production de l'anion superoxide,

comme la xanthine oxidase et la protéine kinase C. Les flavonoïdes inhibent aussi la cyclooxygénase, la lipoxygénase, la monooxygénase microsomale, la glutathione S-transférase, la succinoydase mitochondriale, et NADH oxydase, qui sont tous impliqués dans la génération d'espèces réactives oxygénées (Pietta, 2000). En agissant comme antioxydants la quercétine, le kœmpférol, la morine, la myricétine et la rutine ont exposé plusieurs effets bénéfiques notamment un effet anti-inflammatoire, anti-allergique, anti-viral aussi bien qu'une activité anticancéreuse. Ils ont aussi été suggérés jouer un rôle protecteur dans les maladies du foie, la cataracte et maladies cardio-vasculaires. La quercétine qui agit comme piègeur des radicaux libres semble exercer un effet protecteur dans la reperfusion du tissu ischémique. L'étude de la stabilisation des lipides de la viande et d'huile de poisson par les flavonoïdes a montré que la morine, la myricétine, le kœmpférol et la quercétine sont les plus efficaces et constituent une alternative aux antioxydants synthétiques (Raj Narayana *et al.*, 2001). La quercétine est le flavonol qui semble être le plus puissant flavonoïde de protéger le corps contre les ERO (Gazdik *et al.*, 2008). La rutine est un puissant agent antioxydant, cela peut être dû à son activité inhibitrice de la xanthine oxidase (Nijveldt *et al.*, 2001).

II.3.2. Propriétés pro-oxydantes des polyphénols

Les polyphénols peuvent avoir un effet pro-oxydant par chélation des métaux de telle manière qu'ils maintiennent ou augmentent leur activité catalytique, de même l'activité prooxydante des polyphénols est le résultat de leur capacité à réduire les métaux (comme le Fe^{+3} pour donner Fe^{+2} lequel réagira avec O_2 ou H_2O_2) ce qui augmente leur pouvoir de génération des radicaux libres (Pereira *et al.*, 2009). A des fortes concentrations les flavonoïdes peuvent agir comme pro oxydants. A titre d'exemple la quercétine à des concentrations supérieures à 100 μM provoque chez les rats une cytotoxicité des muscles lisses de l'aorte par production des ERO qui induisent l'apoptose (Bisht *et al.*, 2010).

II.3.3. Propriétés antithrombotiques des polyphénols

Raj Narayana *et al.* (2001) ont rapporté l'effet antithrombotique des flavonoïdes notamment l'effet antiagrégant de la quercétine, du 3-méthyl quercétine, du dihydroquercétine et des flavones. Cette propriété est liée à leur effet inhibiteur en se fixant aux récepteurs cellulaires des plaquettes (récepteur de l'ADP et récepteur de facteur vonWillebrand). Guerrero *et al.* (2005) ont rapporté que quelques flavonoïdes telle que l'apigénine inhibent effectivement l'agrégation plaquettaire *in vitro* par inhibition du TXA_2 (Arslan *et al.*, 2011). La catéchine et la quercétine inhibe *in vitro* d'une manière synergique la production plaquettaire du peroxyde d'hydrogène (Pearson *et al.*, 2002).

II.3.4. Propriétés cardioprotectrices

Les études épidémiologiques ont démontré qu'une alimentation riche en acides phénoliques et en flavonoïdes (quercétine) diminue le taux de mortalité par les coronaropathies de 65% (Petti et Scully, 2009) et réduit l'incidence de mortalité par crise cardiaque et la mort subite (Frishman *et al.*, 2009). Par le biais de leurs action piègeur des radicaux libres, les flavonoïdes peuvent inhiber *in vitro* l'oxydation des LDL de ce fait ils possèdent un effet préventif vis-à-vis de l'athérosclérose (Nijveldt *et al.*, 2001). D'autre part la catéchine, la quercétine et le révesratrol augmentent la concentration plasmatique de l'apoprotéine A1 de 26%, 22%, et 19% respectivement (Xia *et al.*, 2010). L'effet cardioprotecteur de la quercétine et la quercétine glycosylée est dû à leur pouvoir protecteur des LDL contre les modifications oxydatives (Tapas *et al.*, 2008).

II.3.5. Propriétés anti-inflammatoires et immunologiques

Indépendamment de leur activité antioxydante, les polyphénols peuvent participer à la défense cellulaire par vertu de leur activité anti-inflammatoire (Canali *et al.*, 2000). C'est le cas des flavonoïdes, en particulier la quercétine et la kœmpférol qui possèdent des propriétés anti-inflammatoires *in vivo* et *in vitro* (Dussossoy *et al.*, 2010). Les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T (Cerqueira *et al.*, 2003). L'effet antiprolifératif des flavonoïdes pourraient s'expliquer par leur capacité à inhiber l'activité de certaines protéines kinases (protéine Kinase C ou protéine tyrosine kinase) (Namgoong *et al.*, 1994). Les flavonoïdes sont aussi susceptibles de diminuer la libération d'histamine des basophiles et des mastocytes (Middleton et Drzewiecki, 1984).

Les études ont démontré que les polyphénols diminuent la production des facteurs de l'inflammation et du chimiotactisme par inhibition de la phospholipase A2, la lipo-xygénase et la cyclo-oxygénase (Canali *et al.*, 2000). La quercétine a un effet anti inflammatoire en inhibant la cyclooxygénase et la lipoxygénase, enzymes impliquées dans la synthèse des prostaglandines et des leucotriènes respectivement (principaux médiateurs de l'inflammation) (Middleton et Drzewiecki, 1984).

Les polyphénols peuvent aussi avoir un effet anti-inflammatoire direct par inhibition de l'expression des cytokines pro-inflammatoires, en plus ils peuvent affecter la production du TNF α (tumor necrosis factor), de l'interféron γ et de l'interleukin-1 β (IL-1 β) (Canali *et al.*, 2000). En effet, il a été démontré que le kœmpférol et la quercétine inhibent le TNF α d'une manière dose dépendante (Bisht *et al.*, 2010) et que la quercétine est capable d'inhiber

l'activité des facteurs de transcription impliqués dans les lésions inflammatoires du rein, donc se comporter comme un agent anti inflammatoire (Rodrigo et Bosco, 2006).

II.3.6. Propriétés antivirales et antibiotiques

Les polyphénols notamment la quercétine et la rutine possèdent un large éventail d'activités antibactérienne (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus anthracis*, *Shigella boydii*), antifongique (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Azotobacter vinelandii*, *Fusarium solani*, *Botrytis cinerea*, *Verticillium dahliae*, *Alternaria tenuis*, *Cladosporium herbarum*) et antivirale (*Rabies virus*, *Herpes Virus*, *Para influenza virus*, *Herpes simplex virus type 1*, *Potato virus*, *Influenza virus*, *Herpes simplex virus type 2*, *Respiratory syncytial virus*, *Aujeszky virus*, *Polio virus*, *Mengo virus*, *Pseudorabies virus*) (Raj Narayana *et al.*, 2001). D'après Middleton *et al.* (2000), l'activité antivirale des polyphénols semble être associée aux composés non glycosylés et l'hydroxylation en position 3 est apparemment nécessaire à cette activité comme c'est le cas de la quercétine et de la rutine qui possède une activité antivirale contre 11 types de virus.

Ferrazzano *et al.* (2011) ont supposé que l'action antimicrobienne peut être expliquée par la génération de peroxyde d'hydrogène et l'altération de la perméabilité de la membrane microbienne. Le nombre de groupements hydroxyles et le degré de polymérisation potentialisent l'activité antimicrobienne des composés polyphénoliques.

II.3.7. Propriétés antinéoplasiques

Les polyphénols modulent la prolifération cellulaire d'une manière dose-dépendante, ainsi la quercétine, le kœmpférol et la catéchine inhibent d'une manière dose-dépendante la multiplication cellulaire et la formation des colonies (Xia *et al.*, 2010). A des fortes concentrations les polyphénols possèdent un effet toxique direct et provoquent la mort cellulaire. L'étude rétrospective menée par Schneider *et al.* (2007) montre qu'un régime alimentaire dépourvu de fruits et de légumes et par conséquent pauvre en polyphénols est responsable de 7% et 10% du cancer de l'oesophage chez la femme et l'homme respectivement. Cet effet antiprolifératif des flavonoïdes et des autres polyphénols est dû à l'inhibition des topoisomérase ou de la phosphatidylinositol 3-kinase (Sergediene *et al.*, 1999).

III. LA PLANTE *Nigella sativa* L.

III.1. Généralités

Nigella sativa L. est une plante herbacée annuelle appartenant à la famille « Ranunculaceae ». C'est une herbe originaire de l'Est méditerranéen, du Nord de l'Europe et de l'Ouest de l'Asie, elle est maintenant cultivée dans plusieurs régions du monde (Tulukcu, 2011), elle est reconnue sous différents noms « *cumin noir* » en français, « *black cumin* » en anglais, « *black caraway* » aux U.S.A, « *kalonji* » en Asie, « *Habbet el baraka* » ou encore « *habba sawda* » et « *sinouj* » dans les pays arabe (Ghedira et Le Jeune, 2010).

La plante de *Nigella sativa* L. peut atteindre une hauteur de 30 à 60 cm, les fruits mûrs, constitués de follicules soudés s'ouvrant par une fente interne, renferment de nombreuses graines de couleur noir mat, ovoïdes, mesurant de 2 à 3,5 mm de long et présentant trois ou quatre angles dont la face supérieure est finement granuleuse et réticulée (Ghedira et Le Jeune, 2010) (Figure 8).

Règne : Plantae ;

Sous-règne : Tracheobionta ;

Division : Magnoliophyta ;

Classe : Magnoliopsida ;

Ordre : Ranunculales ;

Famille : Ranunculaceae ;

Genre : *Nigella* ;

Espèce : *Nigella sativa*.

(Ghedira et Le Jeune, 2010).



Fleur



cm 1 2 3

Graines



Capsule

Figure 8 : Aspect morphologique de la plante *Nigella sativa* L.

Les graines de *Nigella sativa* sont connues et utilisées en médecine traditionnelle notamment dans le traitement des affections respiratoires, gastro-intestinales, rénales, urinaires, hépatiques et les désordres du système circulatoire et immunitaire (Salih *et al.*., 2009).

III.2. Composition chimique des graines de *Nigella sativa*

La variation dans la composition nutritive des variétés des graines de *Nigella sativa* d'origines différentes est due à la variation de la région de culture, des conditions du stockage et des conditions géographiques et climatiques (Atta, 2003).

III.2.1. Les protéines et les carbohydrates

Les graines de *Nigella sativa* sont très riches en protéines qui représentent environ 20.8% du poids total (Atta, 2003), avec une composition très diversifiée en acides aminés notamment des acides aminés essentiels (lysine, leucine, isoleucine, valine, glycine, alanine, phénylalanine, cystine, acide glutamique, acide aspartique, proline, sérine, thréonine, tryptophane et tyrosine) (Ramadan, 2007). L'analyse par HPLC (high performance liquid chromatography) de l'extrait acétique de la graine a révélé la présence de plusieurs peptides et protéines dont le poids moléculaire varie entre 5660 et 9602 daltons (Oshchepkova *et al.*., 2009). Les carbohydrates représentent environ 33,7% du poids total (Atta, 2003).

III.2.2. Les huiles fixes

L'analyse chimique de l'huile totale de *Nigella sativa* montre la présence des huiles fixes et des huiles essentielles. Les huiles fixes sont les composés majoritaires (Tableau III) (El-Tahir et Bakeet, 2006).

L'analyse phytochimique 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, l'acide palmitique est l'acide gras saturé majoritaire. D'autres acides gras ; myristoleique, palmitoleique, margarique, arachidique, eicosenoïque, behénique, lignocérique ont été également détectés (Cheikh-Rouhou *et al.*., 2007). Ultérieurement Cheikh-Rouhou *et al.* (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 -stigmastérol, Δ^7 -avenasterol et le cholestérol qui ont été aussi mis en évidence mais à des taux plus faibles.

Tableau III : La composition chimique de graines de *Nigella sativa* en huiles fixes (El-Tahir et Bakeet, 2006).

Constituants	% (p/p)
Acide linoléique	44,7-56
Acide oléique	20,7-24,6
Acide linoléinique	0,6-1,8
Acide arachidique	2-3
Acide palmitoléique	3
Acide eicosadiénoïque	2-2,5
Acide palmitique	12-14,3
Acide stéarique	2,7-3
Acide myristique	0,16
Stérols	0,5

III.2.3. Les huiles essentielles

La teneur des graines de *Nigella sativa* en huiles essentielles est de 0,18-1,4% (Wajs *et al.*, 2008). 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 tels que la thymoquinone(30-48%), le thymohydroquinone, le dithymoquinone, le p-cymène (7-15%), le carvacrol (6-12%), le 4-terpineol (2-7%), le t-anéthol (1-4%) et des sesquiterpènes tel que le longifolène (1-8%).

III.2.4. Les Polyphénols

Les polyphénols sont retrouvés en quantité considérable de l'ordre de 27,8 mg EAG/g d'extrait méthanolique brut dont trois composés ont été identifiés (l'acide hydroxybenzoïque, l'acide syringique et l'acide p-coumarique) (Mariod *et al.*, 2009).

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

D'autres métabolites secondaires, sont aussi détectés dans les graines de *Nigella sativa* comme les alcaloïdes type nigellamines A₁, A₂, A₃, A₄, A₅, B₁, B₂ et C (Morikawa *et al.*, 2004) et les triterpènes dont le glycoside α-hederine saponine qui a été identifié dans les grains délipidés qui aboutit à l'hederagenin (partie aglycone) après hydrolyse acide libérant deux oses (rhamnose et arabinose) (El-Tahir et Bakeet, 2006).

III.2.5. Les vitamines et sels minéraux

La composition en vitamines a été déterminée et révèle la présence des vitamines B₁, B₂, B₆, PP et de l'acide folique (El-Tohamy¹, 1993). Par ailleurs Ramadan et Mörsel (2002)

ont analysé les vitamines liposolubles de *Nigella sativa* et ont pu identifier toutes les classes de vitamine E (α , β , δ , γ -tocophérols), dont l' α -tocophérol et le γ -tocophérol sont les tocophérols majoritaires et constituent 48% et 28% de la totalité de vitamine E. Aussi la provitamine A (β -carotène) et la vitamine K₁ (phylloquinone) ont été également détectées (0,05% et 0,1% d'huile fixe totale).

Des travaux sur la composition minérale des graines de *Nigella sativa* ont montré la richesse qualitative en sels minéraux notamment le potassium, le calcium, le phosphore et le magnésium avec des teneurs de l'ordre de 808, 570, 543, 265mg /100g respectivement. Le sodium, le fer, le manganèse, le zinc et le cuivre ont été aussi détectés (Sultan *et al.* , 2009).

III.3. 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 pharmacologiques biologiques dus aux extraits de ses graines ainsi qu'à ses principaux constituants sur divers systèmes *in vivo* et *in vitro*.

III.3.1. 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). Par ailleurs, le traitement de rats soumis à un régime alimentaire contaminé par l'aflatoxine, avec l'huile de *Nigella sativa*, entraîne une protection importante contre l'hépatonéphrotoxicité et les altérations oxydatives (réduction des taux de la GPx, de la SOD, augmentation de la peroxydation lipidique et des altérations de l'ADN) induites durant l'aflatoxicose. Cet effet protecteur de l'huile de *Nigella sativa* est probablement attribué à leur effet piègeur de radicaux libres (Ghedira et Le Jeune, 2010).

In vitro, Mariode *et al.* (2009) ont établi une activité antioxydante des différents extraits polyphénoliques des graines de *Nigella sativa* via différents tests tels que le test DPPH, de blanchissement de β -carotène et de la peroxydation lipidique non enzymatique. Ils ont pu identifier grâce à la technique d'HPLC trois composés polyphénoliques qui semblent être responsables de ce potentiel antioxydant. 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-anéthol et le 4-terpinéol ont montré une propriété scavenger des radicaux libres remarquable. Cette propriété antioxydante a été confirmée par d'autres tests (DPPH, peroxydation lipidique non enzymatique et l'essai du désoxyribose) (Burits et Bucar, 2000).

III.3.2. Activité antimicrobienne

L'extrait méthanolique possède un effet inhibiteur très considérable sur *Staphylococcus aureus*, *pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* et *Candida albicans* (Sokmen, 1999). L'huile fixe présente un large spectre vis-à-vis de nombreuses souches bactériennes, ainsi l'huile de la nigelle possède un pouvoir inhibiteur supérieur à celui de la gentamicine sur une vingtaine de souches de *Listeria monocytogenes* (Nair *et al.* , 2005). L'huile de *Nigella sativa* possède également un effet antiviral vis-à-vis du virus de l'herpès : cytomégalovirus murin (MCMV) (Salem et Hossain, 2000). L'huile fixe présente aussi une excellente activité antifongique, notamment à l'égard d'*Aspergillus flavus* (Amrouche *et al.* , 2011). Par ailleurs, la thymoquinone exerce une activité inhibitrice vis-à-vis de huit espèces de dermatophytes (Aljabre *et al.* , 2005). Des propriétés anti-cestodales et anti-nématiques (*Entameba histolytica*) de différents extraits de la graine ont été rapportées par Raza *et al.* (1999).

III.3.3. Effets anti-inflammatoire et analgésique

Plusieurs auteurs ont étudié l'éventuelle activité analgésique et anti-inflammatoire d'extraits de *Nigella sativa* ou de certains de ses composés purs. En effet, il a été démontré que les polyphénols et les extraits aqueux et méthanolique des graines de *Nigella sativa* possèdent des propriétés analgésique et anti-inflammatoire (Ghannadi *et al.* , 2005, Ilaiyaraja et Khanum, 2010). Ces propriétés ont été établies chez le rat et la souris dans le test de l'œdème de la pâte induit par le carragénane et dans le test de la formaline et de l'acide acétique (Ghannadi *et al.* , 2005). Les graines de *Nigella sativa* et ses composés actifs particulièrement la thymoquinone inhibent d'une manière dose dépendante la cyclooxygénase et la lipoxigénase, enzymes impliquées dans la synthèse des prostaglandines et des leucotriènes respectivement (principaux médiateurs de l'inflammation) et par conséquent possède un effet anti-inflammatoire notamment vis-à-vis de la colite inflammatoire, l'arthrite inflammatoire, et l'encéphalomyélite allergique (Salem, 2005).

Ghedira et Le Jeune (2010) ont rapporté que l'huile fixe issue des graines est responsable d'une importante activité analgésique due à la présence d'un principe opioïde présent dans l'huile fixe, cette action ayant été antagonisée par la naxolone. 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).

III.3.4. Effets anticancéreux et antimutagène

Des effets, *in vivo*, anti-tumoraux ont été montrés en exposant les cellules MCF-7 de cancer de sein à l'extrait aqueux et alcoolique des graines de *Nigella sativa* (Swamy et Tan, 2000). Salim et Fukushima (2003) ont suggéré que les polyphénols des extraits huileux des graines de *Nigella sativa* (1,744 µg/g) inhibent la prolifération des cellules de la muqueuse colique sans effets secondaires.

Des études, *in vitro*, ont révélé que les extraits d'acétate d'éthyl et de butanol exercent un effet cytotoxique vis-à-vis de plusieurs cellules cancéreuses (Ait Mbarek *et al.*, 2007). De même que les extraits : chloroformique, méthanolique et hexanique provoquent l'apoptose des cellules cancéreuses de l'utérus avec des CI₅₀ très faibles de 0,41-2,28 et 2,2ng/ml respectivement. (Shafi *et al.*, 2009, Raza *et al.*, 1999) ont rapporté aussi que 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.

III.3.5. Effets sur le système immunitaire

L'effet de la plante sur le système immunitaire a été étudié. Ainsi, *in vitro*, les extraits solubles des graines de *Nigella sativa* augmentent la production de l'interleukine-1β par la stimulation directe des macrophages ou via l'interleukine-3 (Haq *et al.*, 1995). L'administration intrapéritonéale de la thymoquinone stimule la production de l'INF-γ et la prolifération des macrophages et des lymphocytes T₄ et entraîne une diminution du nombre et de la fonction des cellules NK (naturel killer) (Salem et Hossain, 2000). 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 lymphocytes T₄ et T₈ et 30% des cellules NK (Haq *et al.*, 1999).

A coté de ces propriétés pharmacologiques, d'autres effets ont été aussi rapporté, notamment des effets hypocholestérolémiant et antiathérogènes (Al-Naqeep *et al.*, 2010), antidiabétiques (Meddah *et al.*, 2009), anti-hypertensifs (Khattab et Nagi, 2007) et antitussifs (Boskabady *et al.*, 2003).

PARTIE EXPERIMENTALE

I. MATERIEL ET METHODES

I.1. Matériel

Les graines de *Nigella sativa* utilisées dans cette étude ont été récoltées au niveau de la région de Magra (Wilaya de M'sila) durant le mois de juin 2009.

Les solvants utilisés (Ether de pétrole, Hexane, éthanol, méthanol, chloroforme, acétate d'éthyle, acide formique) dans les différents compartiments de l'approche (extraction, caractérisation et activités biologiques) sont de grade analytique et ont été fournis par Sigma, Aldrich, Fluka et Riedel-de Haën.

L'acide gallique, le citrate de sodium, le $AlCl_3$ (trichlorure d'aluminium), le Na_2CO_3 (carbonate de sodium), le réactif de Folin-Ciocalteu, l'acide sulfurique, la vanilline et les plaques de silice utilisés dans la caractérisation qualitative (chromatographie sur couche mince) et quantitative (dosage des polyphénols et des flavonoïdes) ont été obtenus auprès de Biochem Chemopharma, Aldrich et Sigma.

Le DPPH (1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl), le β -carotène, le trichlorure d'acide acétique, l'acide linoléique, le tween 20, le $FeCl_3$ (trichlorure de fer), le $K_3Fe(CN)_6$ (potassium ferricyanide), le NaH_2OPO_4 , le Na_2HOPO_4 , BHT (butylated hydroxytoluène), le kœmpférol, la rutine et la quercétine utilisés pour établir l'activité antioxydante sont de grade analytique et proviennent des firmes Fluka, Aldrich et Sigma.

Le citrate de sodium, l'héparine, le $CaCl_2$, le $NaCl$, les kits de temps de céphaline-kaolin (TCK) et de temps de Quick (TQ) utilisés pour déterminer l'activité anticoagulante des extraits ont été fournis par Sigma, prolabo, Biolabo.

I.2. Méthodes

I.2.1. Préparation des extraits

I.2.1.1. Préparation de l'extrait phénolique non délipidé

A un poids donné des graines de *Nigella sativa* préalablement nettoyées et broyées est ajoutée une solution méthanolique à 90% dans un rapport de 1/10 (p/v) sous agitation douce pendant une nuit à température ambiante selon la méthode décrite par Mariod *et al* (2009) (Figure 9). L'extrait méthanolique est récupéré dans un premier temps après filtration du mélange sur verre fritté (N°05) et le solvant est alors éliminé du filtrat par évaporation sous pression réduite dans un rotavapeur (BÜCHI) à 40 °C. Ainsi est obtenu l'extrait des polyphénols non délipidé (EnD) qui sera ensuite filtré (microfiltre de 0,45µm).

I.2.1.2. Préparation de l'extrait phénolique délipidé

Pour préparer l'extrait des polyphénols délipidé (ED), nous avons procédé dans une première étape à une délipidation selon la méthode de Cheikh-Rouhou *et al* (2008). Pour cela, les graines de *Nigella sativa* (pour un poids donné) préalablement nettoyées et réduites en poudre par broyage sont mises à macérer dans l'éther de pétrole dans un rapport de 1/10 (p/v) sous agitation douce pendant quatre heures à température ambiante (Figure 9). L'extrait des polyphénols est préparé à partir du broyat récupéré après filtration du mélange sur verre fritté (N°5) en utilisant du méthanol à 90% de la même manière que précédemment.

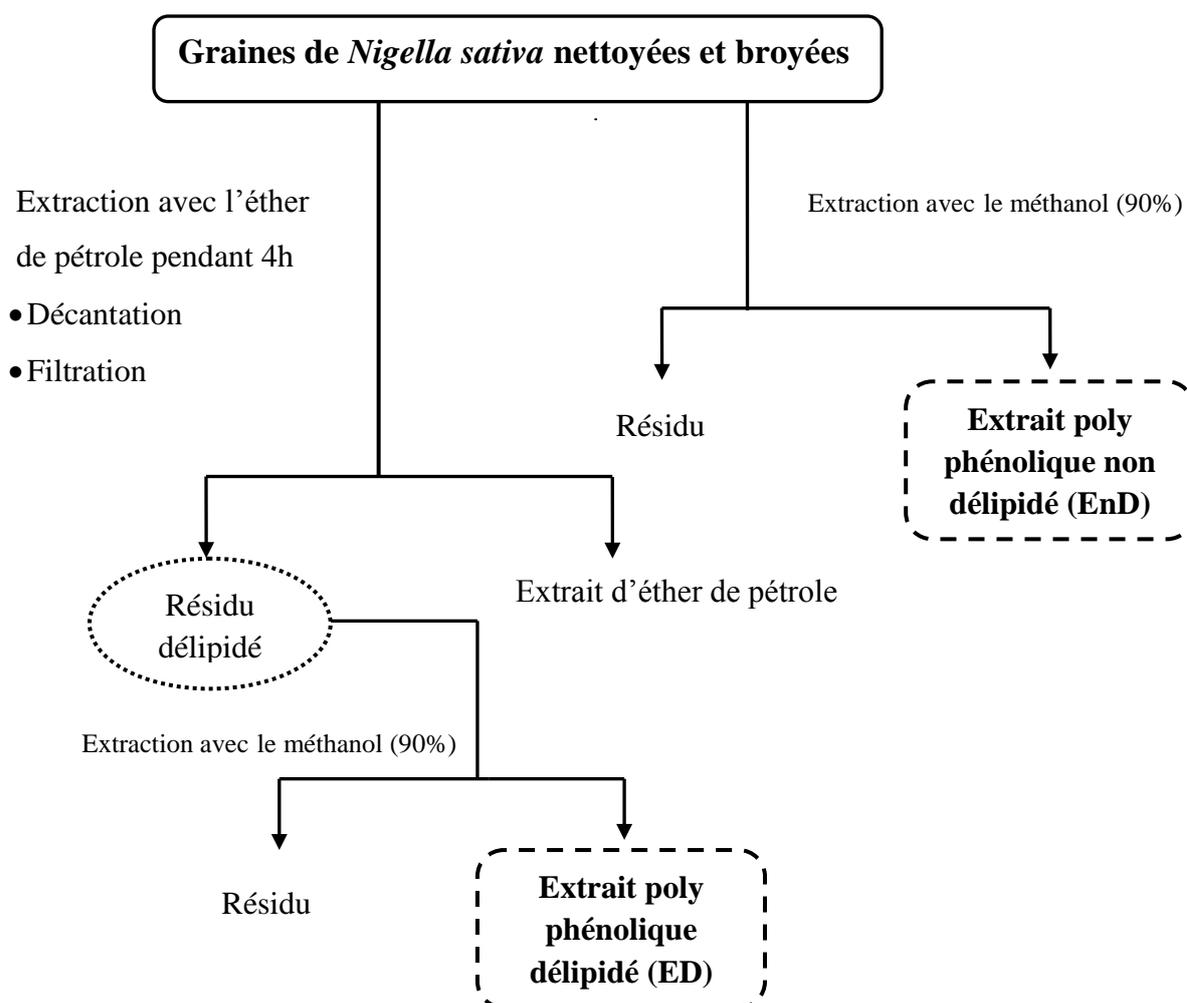


Figure 9 : Etapes d'extraction des composés polyphénoliques des graines de *Nigella sativa*.

I.2.2. Caractérisation des extraits

I.2.2.1. Caractérisation qualitative

Afin d'identifier la nature chimique des différents composés polyphénoliques des extraits préparés, nous avons fait appel à la chromatographie sur couche mince, méthode analytique simple et rapide qui consiste à séparer les constituants d'un mélange complexe par

entraînement à l'aide d'une phase mobile (solvant) le long d'une phase stationnaire (gel de silice) sur la base des phénomènes d'adsorption et de partage. Pour cela, les échantillons ou extraits ainsi que les différentes solutions standards (5 mg/ml) (5 mg/ml) sont déposés sous un faible volume (5µl) sur une plaque de silice prête à l'emploi (20×20 cm) sur laquelle il a été délimité au préalable le front de solvant (10-15 cm). La chromatographie est alors développée dans un chambre de migration préalablement saturée par un système de phase mobile constitué de chloroforme/acétate d'éthyle/acide formique (50 : 40 : 10 v/v) (Goren *et al.* , 1974). Après développement, les plaques sont séchées sous hotte puis à l'aide d'un sèche cheveux afin de visualisées l'emplacement des spots ou taches de migration caractéristiques des extraits et standards en utilisant une révélation physique sous lampe UV à 254 nm et une révélation chimique par pulvérisation d'une solution de vanilline à 1% préparée dans une mélange d'éthanol et d'acide sulfurique (80: 20 v/v).

I.2.2.2. Caractérisation quantitative

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-}) du réactif de Folin-Ciocalteu par les groupement oxydables des composés phénoliques. Cette réduction conduit à la formation d'un produit de couleur bleue qui présente un spectre d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (Macheix *et al.* , 2005). Pour cela, une droite d'étalonnage a été établie au préalable avec l'acide gallique dans une fourchette de concentrations comprise entre 4 et 250 µg/ml selon le protocole suivant :

- A 200 µl des échantillons (préparés à des dilutions convenables) ou des solutions étalons est ajouté 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué 10 fois).
- Après agitation et incubation de 4 min à température ambiante, 800 µl d'une solution de carbonate de sodium (75 mg/ml) sont additionnés au milieu réactionnel.
- L'absorbance est mesurée à 765nm après 2 h d'incubation à température ambiante.

La teneur en polyphénols totaux des deux extraits est exprimée en milligramme équivalent acide gallique par gramme d'extrait (µg EAG/ml d'extrait), et déterminée à partir de cette droite en utilisant l'équation de régression (Figure 10)

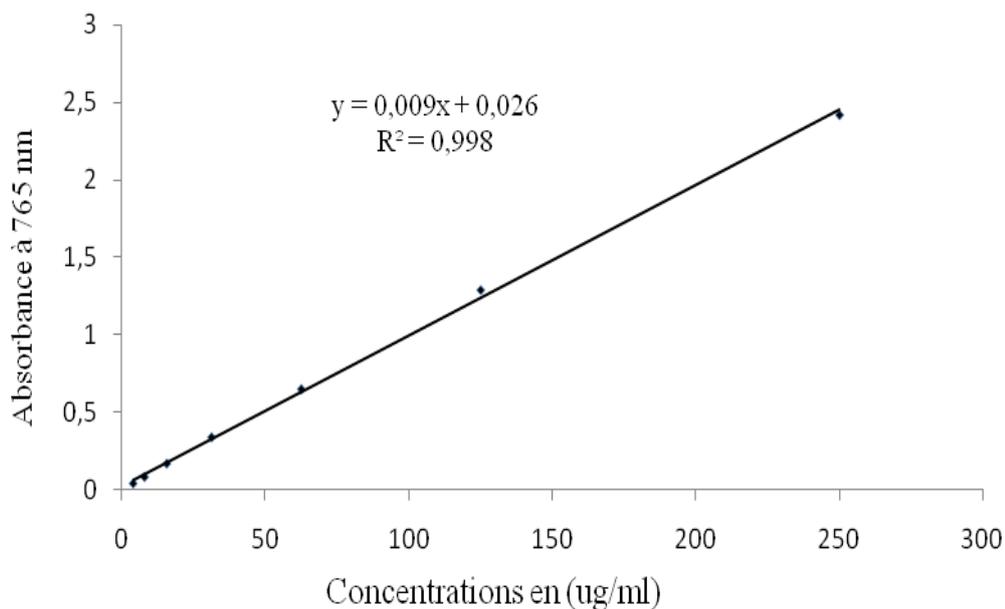


Figure 10: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (les valeurs sont la moyenne de trois essais \pm SD).

En parallèle, la teneur en flavonoïdes des ces mêmes extraits a été évaluée par la méthode du trichlorure d'aluminium (Liu *et al.* , 2007) à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la rutine (1,5-50 $\mu\text{g/ml}$) selon la mode opératoire ci-dessous :

- A 1 ml des échantillons (préparés à des dilutions convenables dans le méthanol) ou des solutions étalons est ajouté 1 ml de la solution d' AlCl_3 (2% dans le méthanol).
- L'absorbance est mesurée à 430 nm après 10 minutes d'incubation à température ambiante.

La concentration en flavonoïdes des extraits, exprimée en microgramme d'équivalent de rutine par millilitre d'extrait ($\mu\text{g ER/ml}$ d'extrait), est calculée à partir de la droite d'étalonnage en utilisant l'équation de régression (Figure 11).

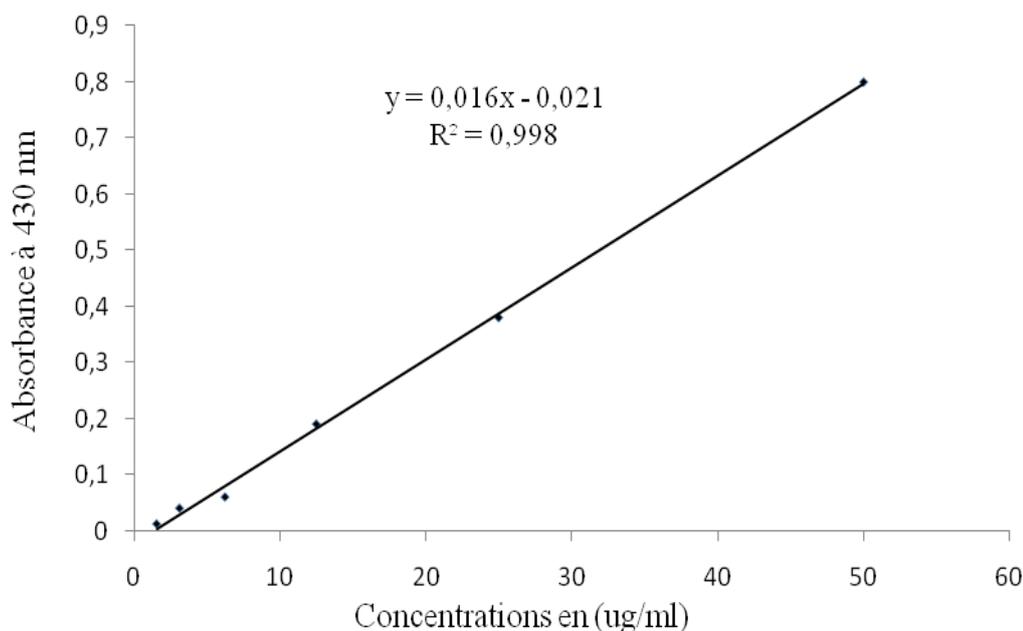


Figure 11 : Courbe d'étalonnage de la rutine (les valeurs sont la moyenne de trois essais \pm SD).

I.2.3. Activités antioxydantes

I.2.3.1. Test du radical DPPH

L'effet piègeur a été évalué en utilisant le test de DPPH qui est un radical libre stable caractérisé par une couleur violette dans la solution de méthanol. Il présente une forte bande d'absorption à 517 nm. La présence des antioxydants (polyphénols) réduisent un radical libre relativement stable le DPPH (diphényl picryl-hydrazyl) ayant une couleur violette en diphényl picryl-hydrazine de couleur jaune dont l'intensité (Absorbance) est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante (polyphénols) présents dans le milieu (Figure 13) ((Mosquera *et al.* , 2007 ; Koksall *et al.* , 2011 ; Sun *et al.* , 2009).

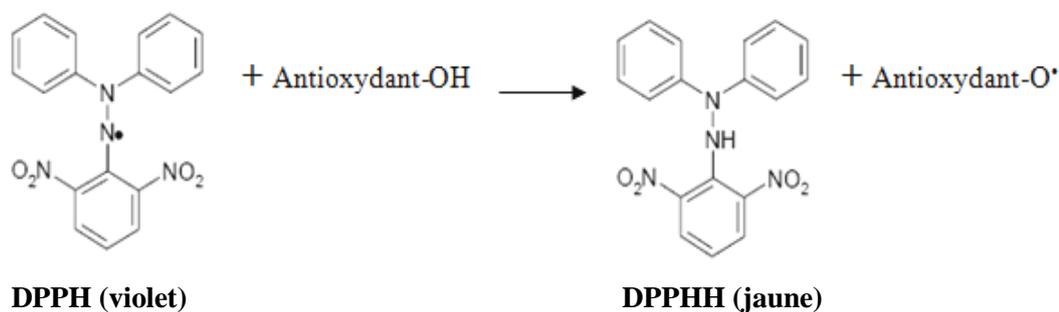


Figure 12 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.

Pour étudier l'activité antiradicalaire des deux extraits polyphénoliques, nous avons opté pour la méthode décrite par Turkmen *et al* (2006).

A 50 µl des extraits (préparés à diverses concentrations) ou de certains de leurs constituants (kæmpférol, rutine et quercétine) préparés dans une gamme de concentrations de 0,1 à 25 µg/ml ou des solutions de BHT (antioxydants standards) préparées à des concentrations comprises entre 2,0-250µg/ml, 1950 µl d'une solution méthanolique de DPPH (2,4 mg/100 ml) sont ajoutés. L'absorbance est alors mesurée à 517 nm. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante et à l'obscurité. Dans les mêmes conditions l'absorbance du contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH est aussi déterminée. L'activité antioxydante des extraits est calculée à partir de ces absorbances selon la relation ci-dessous :

$$\% \text{ PA} = [A_0 - A_e] / A_0 \times 100$$

PA: Pouvoir antioxydant

A₀: Absorbance du contrôle négatif

A_e: Absorbance des échantillons

L'activité antiradicalaire des extraits est alors exprimée en concentration inhibitrice de 50% de DPPH (CI₅₀) à partir de l'équation des courbes du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'échantillon.

I.2.3.2. Test du β-carotène-acide linoléique

Le test β-carotène-acide linoléique est basé sur la décoloration de la β-carotène lors de sa réaction avec le radical libre généré, à températures élevée, par l'enlèvement de l'atome d'hydrogène localisé entre deux doubles liaisons de l'acide linoléique. Ce radical va par la suite oxyder le β-carotène hautement insaturé entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge qui est suivie par spectrophotométrie à 490 nm. La présence d'un antioxydant peut prévenir la dégradation de β-carotène en réagissant avec le radical libre ou tout autre radical qui a été formé dans le milieu réactionnel (Končić *et al.* , 2010). Donc la capacité antioxydante des extraits est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du β-carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique selon la méthode décrite par Esmaili et Sonboli (2010). Au préalable une émulsion de β-carotène /acide linoléique est préparée en mélangeant 25 µl de l'acide linoléique, 200 mg de Tween 20 et 0,5 mg de β carotène solubilisés dans 1 ml du chloroforme. Après évaporation totale du solvant, 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène est ajouté et l'émulsion résultante est agitée vigoureusement. L'évaluation du pouvoir antioxydant des extraits, des divers constituants et du BHT est effectuée sur 350 µl de ces solutions méthanolique (0,5 mg/ml) auxquels sont additionnés 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 120 minutes. L'activité antioxydante des extraits est exprimée en un pourcentage d'inhibition selon la formule suivante (Alén-Ruiz *et al.*, 2009) :

$$\% \text{ d'inhibition} = (\Delta A_{\text{control}} - \Delta A_{\text{échantillon}}) / \Delta A_{\text{control}} \times 100$$

$$\Delta A_{\text{control}} = A_{\text{control}} \text{ à } t=0 - A_{\text{control}} \text{ après 60 min}$$

$$\Delta A_{\text{échantillon}} = A_{\text{échantillon}} \text{ à } t=0 - A_{\text{échantillon}} \text{ après 60 min}$$

I.2.3.3. Test du pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur d'un composé dépend de sa capacité de transférer des électrons et par conséquent peut servir d'un indicateur significatif de son activité antioxydante (Končić *et al.*, 2010). Le pouvoir réducteur des ions ferreux par les deux extraits polyphénoliques des graines de *Nigella sativa* a été évalué par spectrophotométrie en suivant la transformation de la couleur jaune de la solution testée en un chromophore bleu-vert. En présence d'antioxydants (réducteurs) le complexe Fe³⁺/ferricyanide est réduit en Fe²⁺ dont la mesure *via* la formation du bleu Prusse permet de déterminer son pouvoir réducteur (Ferreira *et al.*, 2007 ; Končić *et al.*, 2010). Le pouvoir réducteur des extraits, des différents composés et du BHT est déterminé selon la méthode décrite par Ardestani et Yazdanparast (2007).

Le pouvoir réducteur est mesuré en utilisant la réaction chimique de réduction du Fe (III) en Fe (II) selon le protocole suivant :

A 500µl des extraits préparés à différentes concentrations sont mélangés 1,25 ml de tampon phosphate de sodium (0.2 M, pH 6.6) et 1,25 ml de ferricyanate de potassium [K₃Fe(CN)₆] à 1%. Le mélange est ensuite incubé à 50 C° pendant 20 minutes puis 1,25 ml d'une solution aqueuse d'acide trichloroacétique (10%) sont additionnés. Après centrifugation du mélange pendant 10 min à 3000 rpm, 1,25 ml du surnageant sont mélangés avec 1,25 ml d'eau distillé et 0,5ml de trichlorure du fer [FeCl₃] (0,1%), puis l'absorbance de la couleur bleu verte est mesurée à 700 nm contre un blanc contenant tous les réactifs en absence de l'extrait. Les résultats sont exprimés en concentration effective à 50% (CE₅₀) qui traduit la concentration d'antioxydant nécessaire pour l'obtention d'une absorbance de 0,5 (Tounsi *et al.*, 2009).

I.2.4. Activités anticoagulantes

L'activité anticoagulante des extraits et de leurs principaux constituants a été évaluée *in vitro* vis-à-vis des deux voies de la coagulation (la voie endogène et la voie exogène) sur un pool des plasmas normaux déplaquetés et à l'aide de deux tests chronométrique globaux, le test de temps de céphalin-kaolin et le test de temps de Quick.

I.2.4.2. Activité anticoagulante vis-à-vis la voie endogène

L'évaluation de l'activité anticoagulante des extraits vis-à-vis la voie endogène coagulation a été réalisée en utilisant le Le temps de céphaline-kaolin ou le temps de thromboplastine partielle activé, un test qui permet d'explorer l'activité des facteurs II, V, VIII, IX, X, XI et XII de la voie endogène et la voie commune de la coagulation (Rizzo *et al.* , 2008).

Ce test consiste à mesurer le temps de coagulation d'un plasma pauvre en plaquettes (PPP) en présence de céphaline (substitut phospholipidique du facteur 3 plaquettaire), de kaolin (activateur du système contact et de calcium comme agent de recalcification (facteur déclenchant) (Croizat *et al.* , 1968), selon le protocole décrit par Wang *et al* (2010).

Pour cela, nous avons préparé au préalable un pool de PPP constitué d'un mélange de plasma de 10 volontaires sains non traités âgés entre 24 et 26 ans dont les TCK les TQ sont normaux et comparables. Le sang de chaque volontaire est prélevé par ponction veineuse dans un tube en plastique contenant une solution anticoagulante de citrate de sodium à 3,2% à raison de 1 volume pour 9 volumes du sang.

Le sang est ensuite centrifugé pendant 10 minutes à 3000 rpm pour obtenir un plasma pauvre en plaquettes. Le mélange de ces plasmas (plasma standard) est conservé à basse température (-10C°) jusqu'à son utilisation.

L'activité des extraits et de certains de leurs composés est établie sur 100 µl de ce plasma qui est mélangé avec différents volumes de ces solutions (10, 20, 30 µl) préparées à une concentration donnée. Après 15 min. d'incubation à 37°C, 100 µl céphaline-kaolin est additionné au mélange qui est réincubé durant exactement 3 min sous agitation à 37°C. Le temps de coagulation est alors déterminé à l'aide d'un coagulomètre par ajout de 100 µl de chlorure de calcium (0,025M) préchauffé. En parallèle, un contrôle positif de l'héparine (0,01 mg/ml) et un test contrôle négatif (substitution des échantillons par une solution de NaCl à 0,9%) sont réalisés dans les mêmes conditions. Un allongement du TCK en présence des polyphénols par rapport au contrôle indique un effet anticoagulant au niveau de cette voie.

I.2.4.3. Activité anticoagulante vis-à-vis la voie exogène

L'activité anticoagulante des échantillons et de leurs constituants vis-à-vis la voie exogène de la coagulation a été déterminée en utilisant un test de coagulation appelé le temps

de Quick ou le taux de prothrombine (TP) est le test qui explore les facteurs II, V, VII et X de la voie extrinsèque et la voie commune de la coagulation (Rizzo *et al.* , 2008). La technique originale a été décrite par Quick en 1935. Son principe consiste à mesurer le temps de coagulation du plasma citraté en présence d'un excès de thromboplastine calcique (Croizat *et al.* , 1968).

Ce test consiste à mesurer le temps de coagulation d'un plasma pauvre en plaquettes en présence de thromboplastine calcique (mélange de facteur tissulaire et des phospholipides), selon le protocole décrit par Wang *et al.* (2010). Les facteurs de la voie exogène sont donc activés et le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot est mesuré.

100 µl de plasma pauvre en plaquettes préchauffé durant 2 min à 37°C est mélangé avec différents volumes des extraits et de certains de leurs composés (10, 20, 30 µl), préparées à une concentration donnée. Après 15 min. d'incubation à 37°C, 200 µl de thromboplastine calcique (préchauffée au moins 15 minutes à 37°C) est additionné au mélange et le temps de coagulation est alors enregistré à l'aide d'un coagulomètre. En parallèle, un contrôle positif de l'héparine (0,01 mg/ml) et un test contrôle négatif (substitution des échantillons par une solution de NaCl à 0,9%) sont réalisés dans les mêmes conditions. Tout allongement de ce temps en présence des polyphénols par rapport au contrôle reflète une activité anticoagulante au niveau de cette voie.

II. RESULTATS ET DISCUSSION

II.1. Caractérisation des polyphénols des graines de *Nigella sativa*

II.1.1. Caractérisation qualitative

L'extraction des polyphénols des graines de *Nigella sativa* sans délipidation et après délipidation a permis d'obtenir des extraits de couleur verdâtre et marron foncé respectivement.

Par ses faibles contraintes techniques, son emploi simple et son coût modeste, la CCM est un outil de choix pour l'analyse phytochimique 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 solvants de migration a permis d'avoir une bonne résolution chromatographique et une visibilité acceptable des spots révélés sous observation ultraviolette à 254 nm (Figure 13a), et par pulvérisation d'une solution de vanilline (Figure 13b).

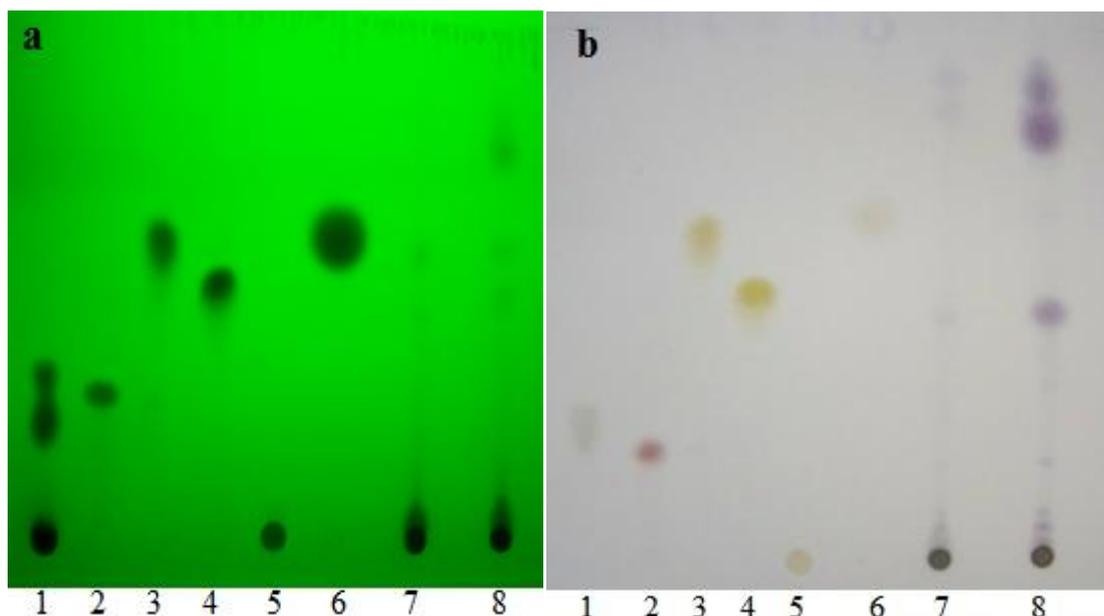


Figure 13 : Chromatographie sur couches minces des extraits des graines de *Nigella sativa*.

a) observation sous lampe UV à 254 nm, b) révélation par une solution de vanilline à 1%.

1; Acide gallique, 2; Catéchine, 3; Kæmpférol, 4; Quercétine, 5; Rutine, 6; Vanilline, 7; ED, 8; EnD.

D'après les rapports frontaux (Rf) des différents échantillons et témoins (Tableau IV), il ressort que le kæmpférol et la quercétine sont probablement présents dans les extraits délipidé (ED) et non délipidé (EnD). En effet, deux spots de ces extraits ont donné lieu à des rapports frontaux similaires à ces deux témoins. Cependant il existe des Rf des spots issus des deux extraits qui ne correspondent à aucun Rf des témoins utilisés. Si on compare les Rf

des spots issus des deux extraits, il s'avère que l'EnD possède un composé qui n'existe pas dans l'ED.

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

Extraits/Témoins	Révélation sous UV (254 nm)	Révélation par la vanilline (1%)
ED	0,09. 0,44. 0,60	0,09. 0,20. 0,44. 0,81. 0,84
EnD	0,09. 0,44. 0,60. 0,78. 0,84	0,09. 0,20. 0,44. 0,60. 0,78. 0,84
Acide gallique	0,26	0,26
Catéchine	0,20	0,20
Kæmpférol	0,60	0,60
Quercétine	0,45	0,45
Rutine	–	–
Vanilline	0,62	0,62

D'après la bibliographie, très peu de travaux se sont intéressés aux flavonoïdes des graines de *Nigella sativa*. Merfort *et al* (1997) ont pu identifier trois flavonoïdes glycosylés dans les graines de la nigelle; quercétine 3-glycosyl (1→2) galactosyl (1→2) glucoside, kæmpférol 3-glycosyl (1→2) galactosyl (1→2) glucoside et quercétine 3- (6-feruloglycosyl) (1→2) galactosyl (1→2) glucoside. Par ailleurs, l'étude analytique par HPLC menée par Mariod *et al* (2009) sur l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux des graines de *Nigella sativa* a permis d'identifier trois composés polyphénoliques ; l'acide hydroxybenzoïque , l'acide syringique et l'acide p-coumarique. Enfin, Bourgou *et al* (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.

II.1.2. Caractérisation quantitative

La teneur des polyphénols totaux dans les extraits des graines du *Nigella sativa* montre que l'ED contient une teneur élevée avec 1544 ± 11 µg EAG /ml d'extrait suivi par l'EnD avec 1450 ± 16 µg EAG/g d'extrait (Tableau V).

Tableau V: Teneur des polyphénols totaux dans les graines de *Nigella sativa*.

Extrait	Teneur des polyphénols (μg EAG/ml d'extrait)	Teneur des polyphénols (mg/100g des graines)
EnD	1450 \pm 16	145 \pm 1,6
ED	1544 \pm 11	92,64 \pm 0,66

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

Si la méthode de Folin-Ciocalteu est simple à mettre en œuvre et très sensible, elle n'est cependant pas spécifique des polyphénols car certains acides aminés tels que la tyrosine et tryptophane des protéines peuvent interférer dans ce dosage. Cependant cette interférence peut être négligée 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 teneur en flavonoïdes dans les extraits des graines du *Nigella sativa* montre que l'EnD contient une concentration légèrement élevée avec 578,8 \pm 3 mg ER /ml d'extrait par rapport à l'ED qui ne contient que 523 \pm 2 mg ER/ml d'extrait (Tableau VI). Ces teneurs constituent un pourcentage de 39,86% et 33,87% pour l'EnD et l'ED respectivement par rapport à la teneur en polyphénols totaux.

Tableau VI : Teneurs en flavonoïdes dans les extraits des graines de *Nigella sativa*.

Extrait	Teneurs en flavonoïdes (μg ER/ml d'extrait)	Teneurs en flavonoïdes (mg ER/100g des graines)
EnD	578,8 \pm 3	57,8 \pm 0,3
ED	523 \pm 2	31,38 \pm 0,12

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

La raison principale pour la quelle on a choisi cette classe de polyphénols, réside dans le fait que les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante, avec plus de 5000 composés déjà décrits (Gomez-Caravaca *et al.* , 2006).

II.2. Activités biologiques des extraits

II.2.1. Activités antioxydantes

II.2.1.1. Test du radical DPPH

Les profils d'activité antiradicalaire obtenus (Figure 14) révèlent que les deux extraits des graines de *Nigella sativa* possèdent une activité antiradicalaire dose dépendante, les CI_{50} des deux extraits ont été déterminées (Tableau VII).

Les résultats obtenus montrent que les deux extraits polyphénoliques des graines de *Nigella sativa* possèdent des effets piègeurs remarquables vis-à-vis du radical DPPH. En effet, l'ED et EnD ont donné des valeurs de CI_{50} très faibles de l'ordre de 7,08 et 6,5 $\mu\text{g/ml}$ respectivement. L'ED qui renferme une teneur légèrement inférieure en flavonoïdes par rapport à l'EnD de *Nigella sativa* possède une activité antioxydante significativement inférieure ($p \leq 0,05$) à celle de l'EnD. Cette différence pourrait être due à la contribution des huiles essentielles ainsi qu'à d'autres composés lipidiques de l'EnD dont l'activité antiradicalaire a été largement étudiée. En effet, le carvacrol, le t-anéthol et le 4-terpinéol aussi bien que la thymoquinone sont de puissants agents réducteurs du radical DPPH et piègeurs du radical hydroxyle (Burits et Bucar, 2000). L'effet antioxydant de ces extraits est comparable à celui de la rutine et du kœmpférol alors que la quercétine est quatre fois plus active que les deux extraits.

Tableau VII : Activité antiradicalaire des extraits polyphénoliques des graines de *Nigella sativa*, de certains de leurs principaux composés et du BHT.

	CI_{50} ($\mu\text{g /ml}$)
EnD	$6,50 \pm 0,01$
ED	$7,08 \pm 0,085$
Rutine	$7,70 \pm 0,02$
Kœmpférol	$4,05 \pm 0,05$
Quercétine	$1,55 \pm 0,00$
BHT	$18,00 \pm 0,00$

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

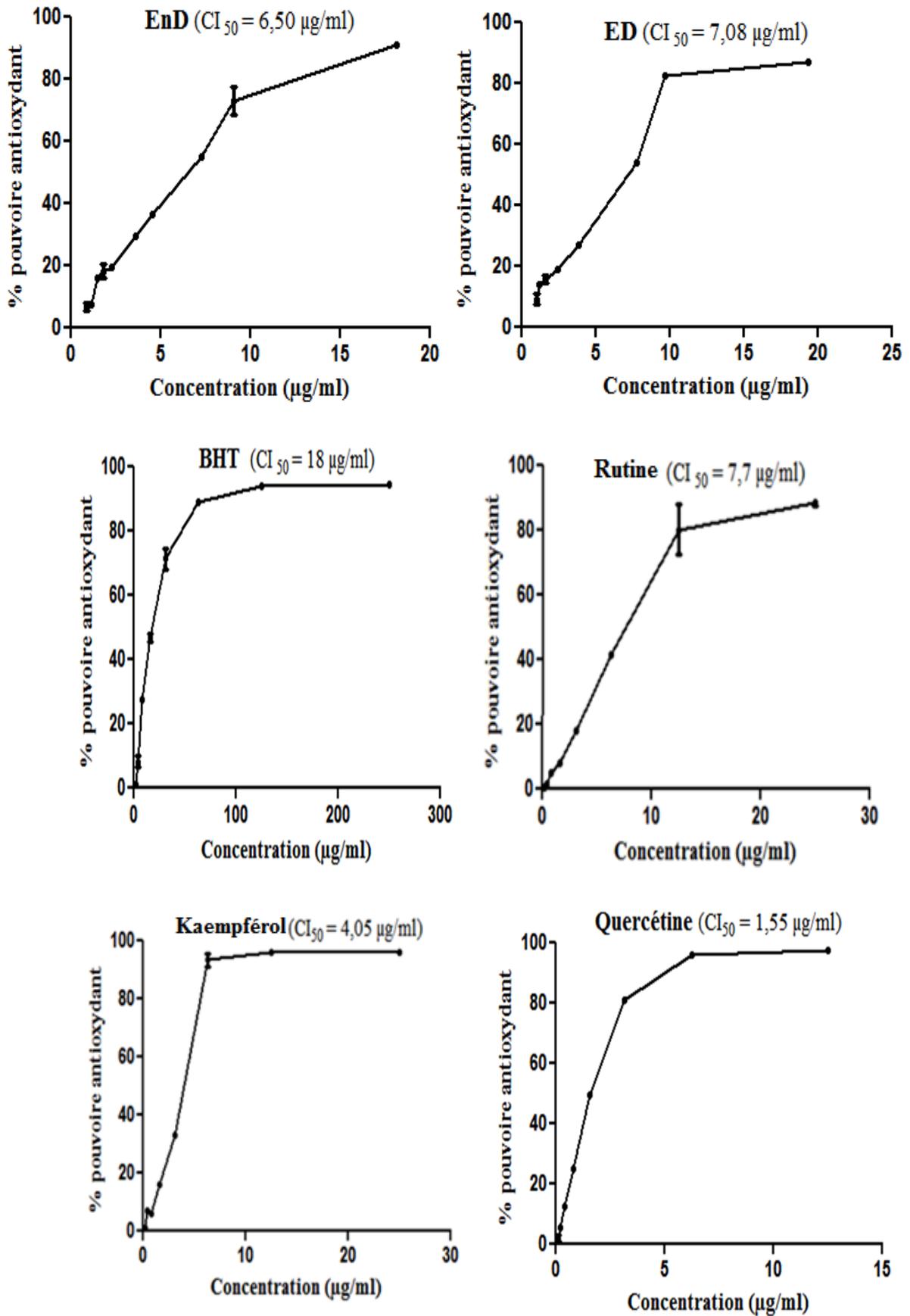


Figure 14 : Activité antiradicalaire des extraits des graines de *Nigella sativa*, de certains de leurs principaux composés et de BHT (les valeurs sont la moyenne de trois essais \pm SD).

En comparaison avec le BHT (antioxydant de référence), les deux extraits s'avèrent trois fois plus actifs. Ce pouvoir est probablement attribué à la richesse de ces extraits en composés polyphénoliques et en flavonoïdes. Etant donné que le pouvoir antiradicalaire est inversement proportionnel à la concentration inhibitrice à 50% (Sonboli *et al.* , 2010), les deux extraits polyphénoliques possèdent un très puissant pouvoir antiradicalaire. Ce pouvoir est plus important que celui de l'extrait brut méthanolique des graines de *Nigella sativa* étudié par El-Agbar *et al* (2008) et Mariod *et al* (2009) qui ont obtenu des CI_{50} de $168,8 \pm 2,1$ et $2260 \mu\text{g/ml}$ respectivement.

D'autre part Zaher *et al* (2008) ont rapporté que l'extrait aqueux des graines de *Nigella sativa* possède une activité antioxydante très importante avec une $CI_{50} = 3 \mu\text{g/ml}$, cette valeur IC_{50} est proche à celle de nous présent travail.

Concernant l'activité antioxydant des trois flavonoïdes ces composés ont montré une activité antiradicalaire très puissante avec des CI_{50} de l'ordre de $4,05 \mu\text{g/ml}$ pour le kœmpférol, de $7,7 \mu\text{g/ml}$ pour la rutine et de $1,5$ pour la quercétine. La CI_{50} de la quercétine est très proche de celle rapportée dans les travaux de Burit et Bucar (2000) ($CI_{50} = 1,31 \mu\text{g/mg}$).

L'activité antiradicalaire des deux extraits des graines de *Nigella sativa* pourrait être attribuée à la présence de composés polyphénoliques. Il a déjà été exposé que les composés polyphénoliques sont responsables de l'activité de piégeage radicale, dû à la facilité de leur donation de l'atome de l'hydrogène à un radical libre actif (Sonboli *et al.* , 2010). Il a été rapporté que l'extrait de mélange acétone /méthanol des feuilles de *Salvinia molesta* possède une activité antioxydante importante avec une CI_{50} de $27,75 \mu\text{g/ml}$, cela est dû à la richesse de cet extrait en flavonoïdes notamment la rutine qui constitue $16,33 \mu\text{g}$ équivalent de quercétine par gramme de poids sec (Chantiratikal *et al.* , 2009). Les autres composés phénoliques mineurs ne devraient pas être négligés car ils peuvent contribuer à cette activité par synergisme (Bourgou *et al.* , 2008). Cependant un contenu polyphénolique important ne correspond pas linéairement à une forte activité antioxydante, parce que le réactif du Folin-Ciocalteu n'est pas spécifique des polyphénols seulement mais à d'autres substances qui peuvent être oxydées avec le réactif (Chantiratikal *et al.* , 2009).

Dans le but d'identifier les sites potentiels au sein des flavonoïdes qui sont responsables de l'effet scavenger vis-à-vis de radical peroxy, plusieurs travaux ont étudié la cinétique et le mécanisme réactionnel des flavonoïdes avec ce radical. Marfak (2010) a rapporté que plusieurs paramètres peuvent influencer la variabilité de l'activité antioxydante d'une plante à une autre et d'un extrait polyphénolique à un autre notamment la position de

la double liaison dans le cycle C du flavonoïde et le nombre et la position relative des groupements OH dans le cycle aromatique.

Jiménez-Atiénzar *et al* (2005) ont mis en évidence la relation structure fonction des flavonoïdes, en confirmant que, en général, les flavonoïdes avec des fonctions di- ou trihydroxyl, notamment en position 3', 4' et 5', ont un effet scavenger plus efficace.

II.2.1.2. Test β -carotène-acide linoléique

La cinétique de blanchissement du β -carotène en absence et en présence des extraits de *Nigella sativa*, de certains de leurs composés et du BHT et les pourcentages d'inhibition de la peroxydation lipidique sont représentés dans les figures 15 et 16.

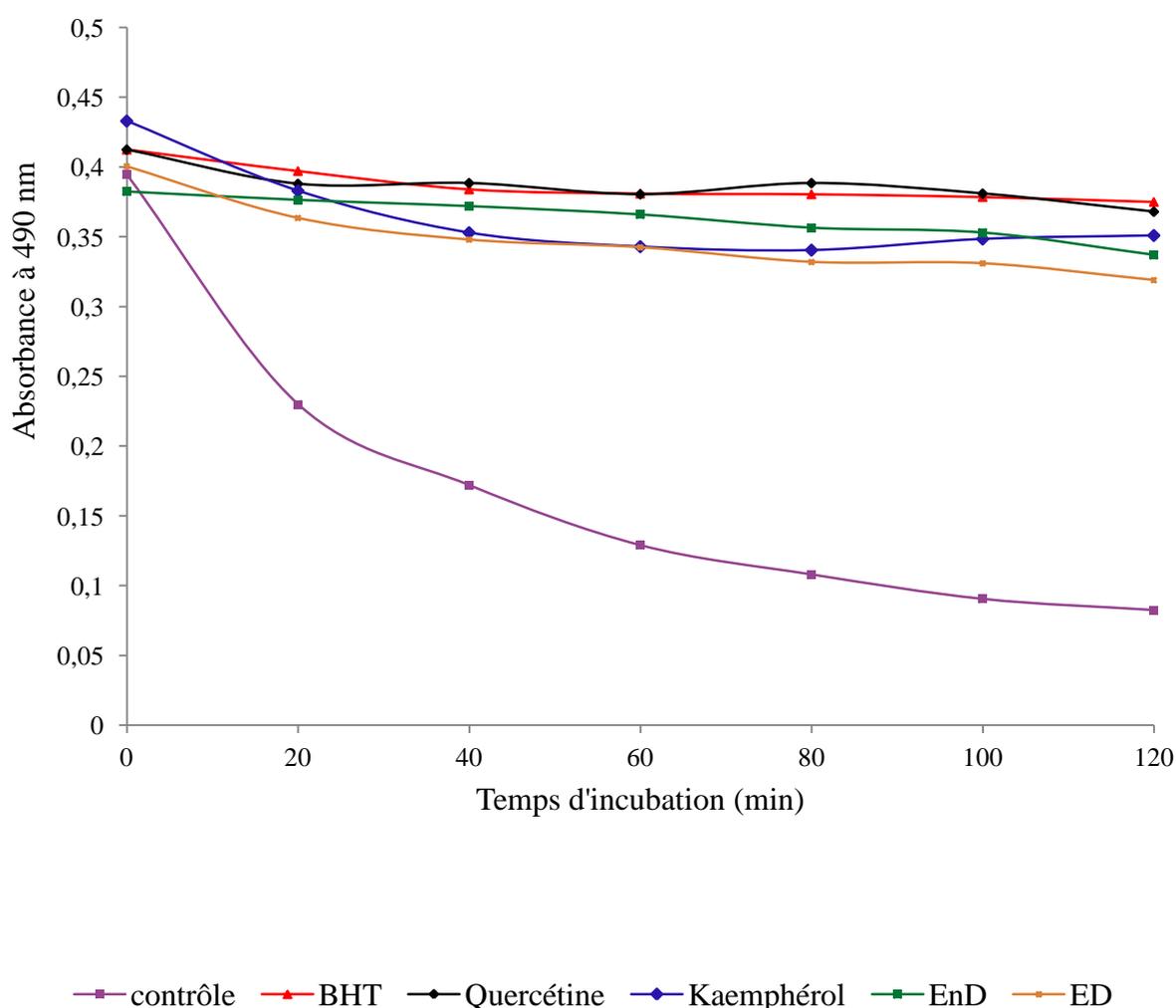


Figure 15 : Cinétique de blanchissement du β -carotène à 490 nm en présence des extraits des graines de *Nigella sativa*, de certains de leurs principaux composés et de BHT (les valeurs sont la moyenne de deux essais).

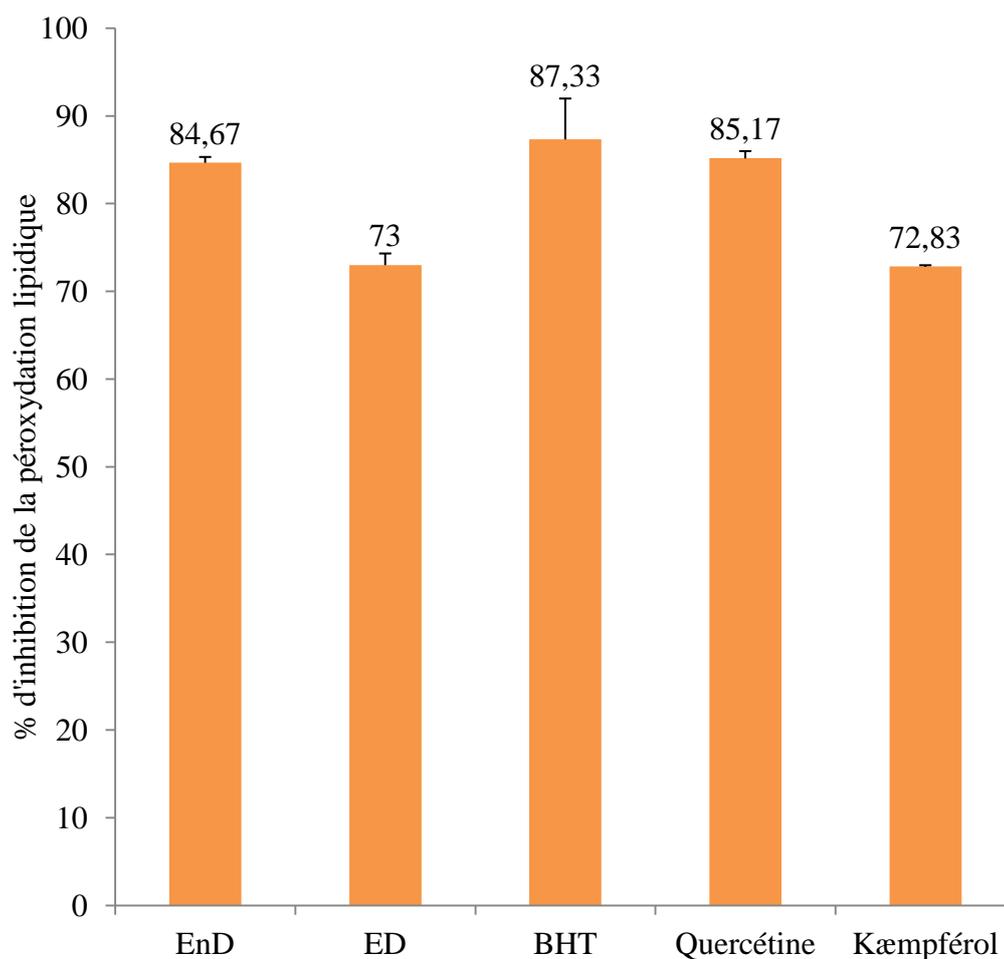


Figure 16 : Pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique des extraits des graines de *Nigella sativa*, de certains de leurs principaux composés et du BHT (les valeurs sont la moyenne de trois mesures \pm SD).

A lumière des résultats obtenus, il ressort que les deux extraits préparés ainsi que les composés testés inhibent d'une manière efficace et significative ($p \leq 0,05$) l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β -carotène par rapport au contrôle négatif (100% de peroxydation). Cette inhibition est légèrement plus élevée pour l'EnD en comparaison avec l'ED. L'activité antioxydante de l'ED (73%) est équivalente à celle du kæmpférol (72,83%) alors que celle de l'EnD (84,67 %), quoique légèrement inférieure, est presque égale à celles de la quercétine et du BHT (87,33) (Figure 16). Cette activité est positivement corrélée avec la teneur en flavonoïdes. En effet il a été démontré que les fractions riches en polyphénols dans les extraits des graines de *Nigella sativa* réduit l'oxydation du β -carotène par les hydroperoxydes (Mariod *et al.*, 2009). La fraction lipophile de l'EnD semble être à l'origine de cette activité plus

élevée par rapport à l'ED du fait de la spécificité de l'essai du blanchissement du β -carotène pour ces composés (Gachkar *et al.*, 2007).

II.2.1.3. Test du pouvoir réducteur

Les profils de pouvoir réducteur obtenus (Figure 17) révèlent que les deux extraits des graines de *Nigella sativa* possèdent une activité antiradicalaire dose dépendante. Les CE_{50} de chacun des deux extraits (ED et EnD) et de certains de leurs constituants (kæmpférol, quercétine, rutine) et du BHT (antioxydant de référence) ont été déterminées (Tableau VIII).

Tableau VIII : Le pouvoir réducteur des extraits des graines de *Nigella sativa*, de certains de leurs principaux composés et du BHT.

	EC ₅₀ (µg /ml)
EnD	5,13 ± 0,07
ED	3,35 ± 0,00
Kæmpférol	5,70 ± 0,02
Rutine	6,15 ± 0,05
Quercétine	1,48 ± 0,02
BHT	4,80 ± 0,01

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

Les valeurs des CE_{50} des deux extraits polyphénoliques ED et EnD des graines de *Nigella sativa* sont 3,35 µg /ml et 5,13 µg /ml respectivement. Etant donné que la CE_{50} est inversement proportionnelle au pouvoir réducteur, l'ED possède un pouvoir réducteur significativement supérieur à celui de l'EnD ($p \leq 0,05$). Cela est dû probablement à la richesse de ces extraits en composés polyphénoliques. L'effet réducteur de l'EnD est comparable à celui du kæmpférol tandis que celle de l'ED est deux fois plus important que celui de la rutine et du kæmpférol mais la quercétine exerce un effet réducteur deux plus que l'ED et trois fois plus que l'EnD. Cette constatation trouve probablement son explication, dans un effet synergique entre les constituants de ces extraits. Ce pouvoir est plus important que celui des extraits méthanoliques des feuilles et des fleurs de *Salvia brachyantha* dont les CE_{50} sont de l'ordre 100 µg/ml (Esmaeili et Sonboli (2010)). Ce pouvoir est attribué à la richesse de ces extraits en flavonoïdes notamment la rutine (2,44mg /kg). En outre, l'investigation de pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique de thé vert a montré que les composés polyphénoliques paraissent comme de très bon donneurs d'électron et d'atome d'hydrogène (Manian *et al.*, 2008). Liyana-Pathirana et Shahidi (2007) ont rapporté que le pouvoir réducteur d'un composé peut être attribué à sa capacité de donner des protons qui neutralisent

les radicaux libres très endommageant en formant des produits stables lors de l'étape terminale de la chaîne des réactions radicalaires.

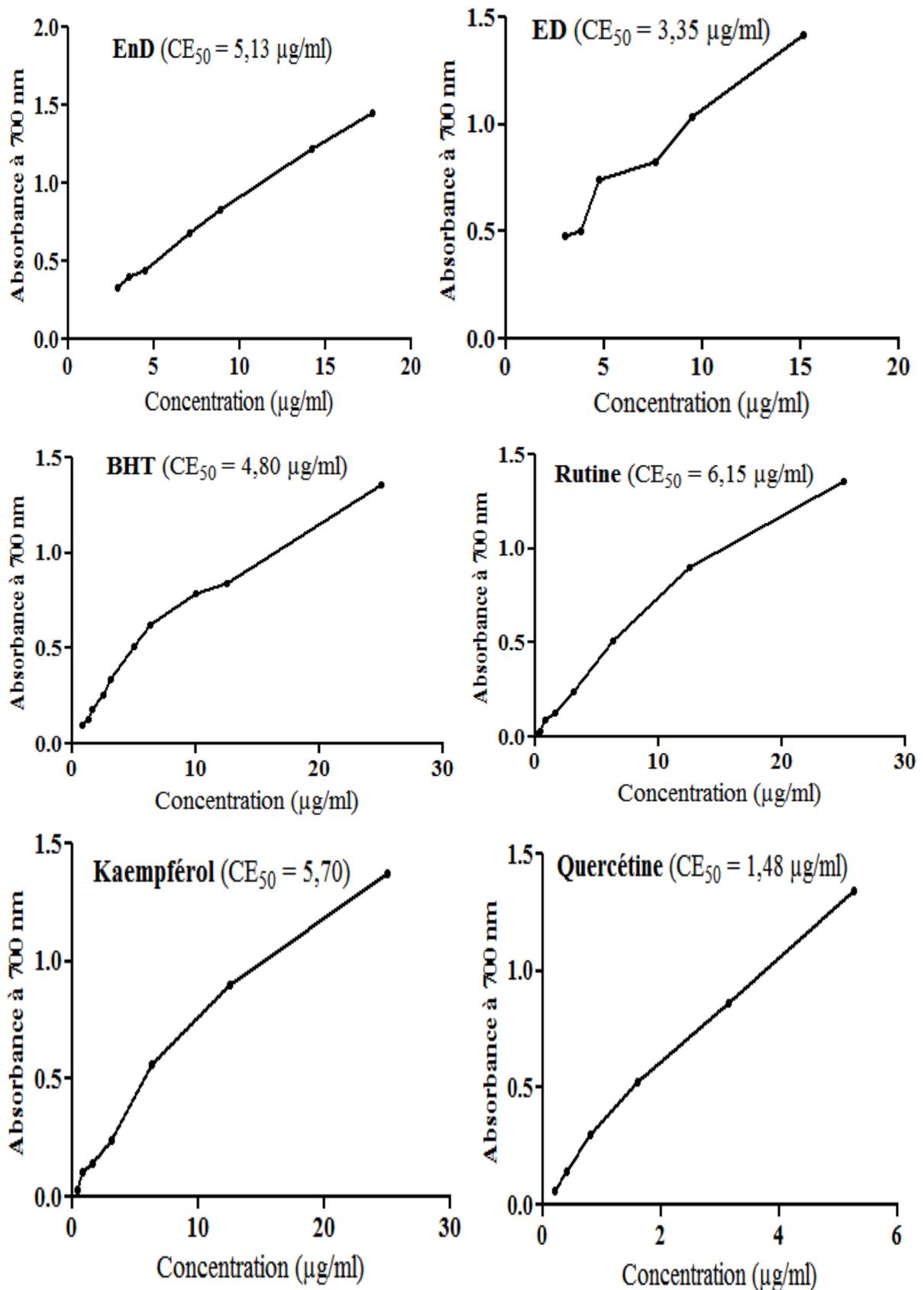


Figure 17 : Le pouvoir réducteur des extraits des graines de *Nigella sativa*, de certains de leurs principaux composés et de BHT (les valeurs sont la moyenne de trois essais \pm SD).

II.2.2. Activités anticoagulantes

II.2.2.1. Activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène

Les résultats de l'activité anticoagulante obtenus (Figure 18) révèlent que les deux extraits des graines de *Nigella sativa* possèdent une activité anticoagulante dose dépendante. Les temps de coagulation (TCK) céphaline-kaolin en présence d'extraits de *Nigella sativa*, de certains de leurs composés et de l'héparine (anticoagulant de référence) ont été déterminés (Tableau IX).

Tableau IX : Temps de céphaline-kaolin des extraits des graines de *Nigella sativa*, de certains de leurs principaux composés et de l'héparine.

Echantillon	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	TCK (10/100)	TCK (20/100)	TCK (30/100)
NaCl	0,9%	30,2 \pm 0,00	31,3 \pm 0,00	31,65 \pm 0,05
EnD	1450	46,5 \pm 0,5	64,85 \pm 5,55	197,9 \pm 4,5
ED	1544	35,9 \pm 0,1	37,9 \pm 0,80	48,3 \pm 0,3
Kæmpférol	5000	33 \pm 0,9	45,1 \pm 0,6	56,25 \pm 5,15
Rutine	5000	31,4 \pm 0,3	43,35 \pm 0,55	146 \pm 2,1
Héparine	10	36,1 \pm 1,1	71,6 \pm 3,9	144,85 \pm 15,25

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

Les résultats de la présente étude montrent que les deux extraits sont capables d'allonger le TCK d'une manière significative ($P \leq 0,01$) et dose dépendante. Cependant, il paraît que l'EnD exerce une activité anticoagulante dose dépendante plus importante que l'ED avec une différence significative ($P \leq 0,01$). Les temps de coagulation obtenus sont de 46,5, 64,85 et 197,9 s pour des concentrations de 145, 290 et 435 $\mu\text{g/ml}$ d'extrait respectivement. L'EnD (435 $\mu\text{g/ml}$) exerce un allongement de temps de coagulation 6,25 fois par rapport au témoin et 1,36 fois supérieur à celle de l'héparine (3 $\mu\text{g/ml}$).

L'étude de l'activité anticoagulante des principaux constituants polyphénoliques des graines de *Nigella sativa* sur la voie endogène de la coagulation a révélé que la rutine à la concentration de 1500 $\mu\text{g/ml}$ exerce un effet similaire à celui de l'héparine à la dose 3 $\mu\text{g/ml}$ avec un ratio de 1,01 et un allongement de 4,61 fois plus par rapport au témoin. A l'opposé, l'activité anticoagulante du kœmpférol est très inférieure à celle de l'héparine (aux mêmes concentrations) avec un rapport de 0,39 seulement mais non négligeable car il provoque un allongement 1,87 fois par rapport au témoin.

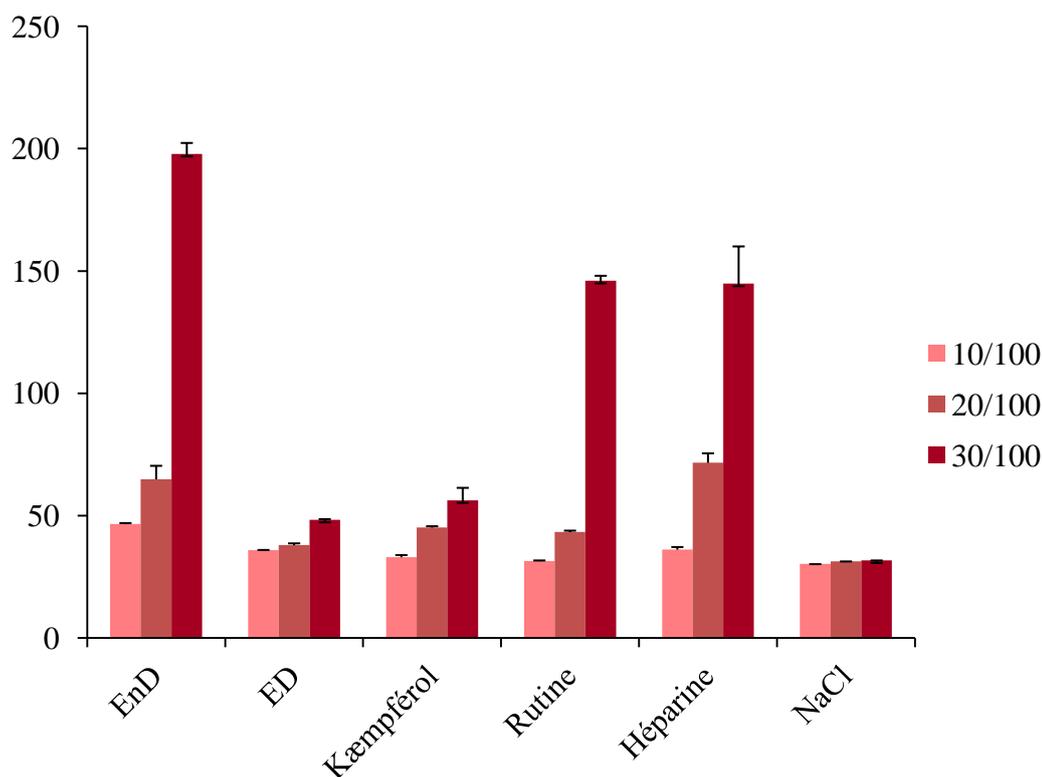


Figure 18 : Temps de céphalin-kaolin des extraits des graines de *Nigella sativa*, de certains de leurs principaux composés et de l'héparine (les valeurs sont la moyenne de deux essais \pm SD).

L'allongement de TCK en présence des flavonoïdes de *Nigelle sativa* indique que ces métabolites sont capables d'inhiber les facteurs de la voie endogène et/ou les facteurs communs entre deux voies de la coagulation (Athukorala *et al.* , 2006 ; Zhang *et al.* , 2008).

Awad et Binder (2005) Ont rapporté l'effet anticoagulant des graines de *Nigella sativa* par allongement des temps de coagulation (TCK) cela peut être dû au manque des facteurs impliqués dans la voie exogène et endogène de la coagulation ou la présence des inhibiteurs de ces facteurs.

Bijak *et al* (2011) ont démontré que les extraits des fruits secs de *A. melanocarpa* et des graines de *V. vinifera* riches en polyphénols possèdent un effet anticoagulant dose dépendante avec des TCK de 42,6 et 41,0 s respectivement pour une concentration de 50 μ g/ml d'extrait, ce qui est dû probablement à la richesse de ces extraits en flavonoïdes notamment les flavanols et les flavonols. Par ailleurs Guglielmone *et al* (2002) ont rapporté que l'activité anticoagulante des flavonoïdes peut être due à leur action inhibitrice de la voie endogène de la coagulation.

II.2.2.2. Activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène

D'après les résultats obtenus (temps de Quick) (Tableau X, Figure 19) il ressort que l'EnD des graines de *Nigella sativa* et les deux flavonoïdes étudiés sont capables d'allonger d'une manière significative ($P \leq 0,01$) et dose dépendante le TQ. L'activité anticoagulante de l'EnD (435 µg/ml) sur la voie exogène est importante avec un rapport (test/témoin) de 3,35 et identique à celle du kœmpférol. Cette activité anticoagulante reste faible par rapport à celui vis-à-vis de la voie endogène de la coagulation où un allongement de 6,25 fois de TCK par rapport au témoin a été observé pour la même concentration de l'EnD.

En ce qui concernant l'activité anticoagulante des deux flavonoïdes utilisés, il est établie que le kœmpférol à la concentration de 150 µg/ml exerce un effet similaire à celui de l'EnD avec un ratio de 3,37. On constate que la rutine exerce un allongement de temps de coagulation de la voie exogène de 2,3 fois plus par rapport au témoin et à la même concentration, la rutine possède un effet certes moindre par rapport au kœmpférol (Ratio= 0,68) mais assez important avec un ratio de 2,3.

Tableau X : Temps de Quick des extraits des graines de *Nigella sativa* e, de certains de leurs principaux composés et de l'héparine.

Echantillon	Concentration (µg/ml)	TP (10/100)	TP (20/100)	TP (30/100)
NaCl	0,90%	13,6±0,00	13,3±0,00	13,4±0,05
EnD	1450	15,85±0,5	24,4±0,4	44,9±0,35
ED	1544	14,8±0,0	15,15±0,05	15,85±0,05
Kœmpférol	5000	13,9±0,4	26,6±2,2	45,2±1,00
Rutine	5000	15,01±0,05	19,25±0,15	30,9±0,6
Héparine	10	13,05±0,25	12,4±0,2	13,05±0,05

Les valeurs représentent la moyenne de trois essais ±SD.

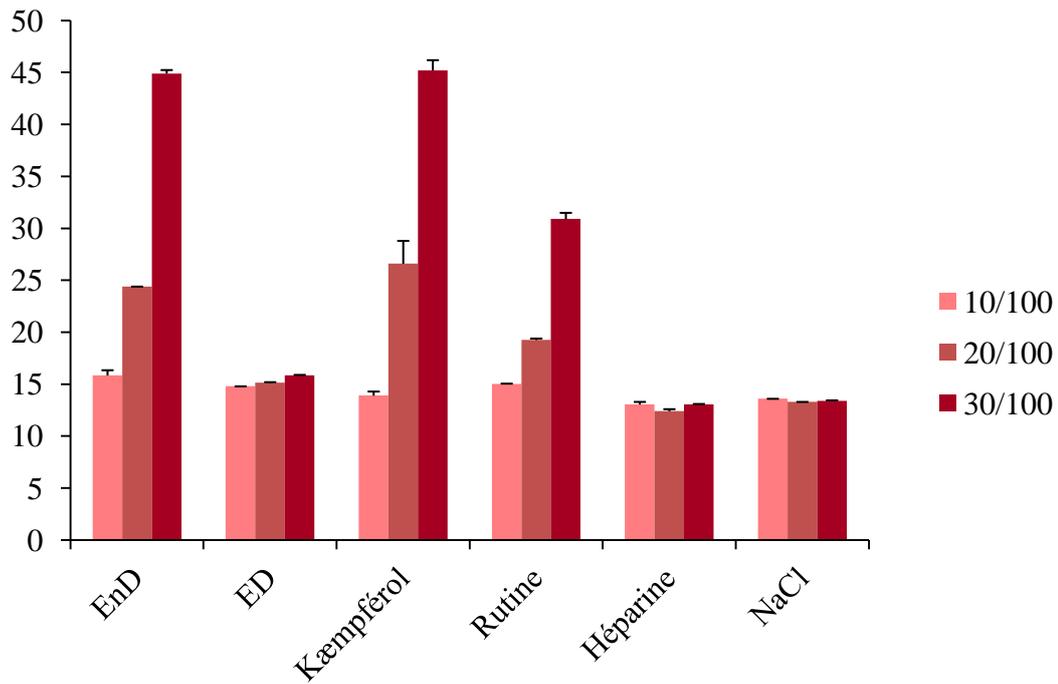


Figure 19 : Temps de Quick des extraits des graines de *Nigella sativa*, de certains de leurs principaux composés et de l'héparine (les valeurs sont la moyenne de deux essais \pm SD).

Par ailleurs, l'héparine paraît sans effet anticoagulant sur la voie exogène avec des temps de coagulation semblable au contrôle négatif de 13,5s. Ce résultat est conforme aux travaux de Tomaru *et al* (2005) qui ont démontré que l'activité anticoagulante de l'héparine résulte de l'inactivation des enzymes de la coagulation de la voie endogène *via* en formant un complexe avec l'antithrombine III. Etant donné que le temps de thromboplastine est un test de coagulation qui explore l'ensemble des facteurs de coagulation de la voie exogène, il est fort probable que l'activité anticoagulante de l'EnD des graines de *Nigella sativa* est des deux flavonoïdes est due à l'inhibition d'un de ces facteurs qui sont activés en cascade.

Au total et à partir des résultats, on peut déduire que l'EnD exerce un effet anticoagulant sur les deux voies de la coagulation d'une manière dose dépendante, et que cette activité est plus marquée sur la voie endogène que la voie exogène de la coagulation.

Hsieh *et al* (2007) ont rapporté que la quercétine sulfate, obtenue à partir de *Flaveria bidentis* (Asteraceae), provoque un allongement significatif des temps de céphalin-kaolin et de Quick. Par ailleurs l'étude récente menée par Kuntić *et al* (2011) a démontré que les solutions aqueuses des deux flavonoïdes la rutine et la hespéridine n'ont aucun effet sur les temps de la coagulation (TP et TCK). Seulement la solution éthanolique de la rutine (830 μ M)

a prolongé les TCK, alors que le TP n'est pas influencé. En utilisant le plasma pauvre en facteurs de la coagulation cette même a démontré l'effet de la solution éthanolique de la rutine sur les facteurs VIII et IX de la coagulation. Il est bien connu que les compose polyphénoliques des plantes peuvent prévenir l'agrégation plaquettaire. L'extrait méthanolique (100%) du lichen *Umbilicaria esculenta* riche en polyphénols montre une activité antithrombotique significative *in vitro* et *in vivo*, cette activité peut être due à l'effet antiplaquettaire plutôt que l'effet anticoagulant (Kim et Lee, 2006). L'étude récente menée par Han *et al* (2012) sur la fraction éthanolique (70%) des feuilles de *Rubus chingii* montre une activité anticoagulante très significative aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* avec un temps de récalcification du plasma de 107,8 et 166,8 s respectivement, cela a été contribué à la présence des flavonoïdes actives notamment le kœmpférol et la quercétine.

Les résultants obtenus par Pawlaczyk *et al* (2009) indiquent que ce n'est pas seulement la présence des groupements sulfate comme dans l'héparine, déterminent l'activité anticoagulante. Elle peut être due aussi aux groupements carboxyliques, bien que l'effet des acides monosaccharidiques ne soit pas très important. L'effet est indubitablement plus important par la composition polymérique des acides monosaccharidiques et les polyphénols. Ultérieurement l'étude récente menée par Pawlaczyk *et al* (2011) a montré que l'activité anticoagulante été due aux polysacchrides aussi bien que aux parties aglycones des polyphénols. Cela est expliqué par la richesse en groupements COOH. Par ailleurs Liu *et al* (2010) ont rapporté que plus le nombre des groupements OH du cycle B d'un flavonol est important plus son activité inhibitrice de la thrombine est significative.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans le présent travail, nous avons évalué l'effet antioxydant et anticoagulant des extraits polyphénolique des graines de *Nigella sativa*.

L'activité antioxydante des deux extraits évaluée *in vitro* par le test de DPPH montre que les deux extraits (ED et EnD) possèdent une grande capacité antioxydante en comparaison avec l'antioxydant de référence le BHT. En outre, le test de β -carotène-acide linoléique permet de conclure que les deux extraits exercent une inhibition de l'oxydation couplé de β -carotène-acide linoléique d'une manière comparable à celle de BHT. Ceci est confirmé par les résultats du pouvoir réducteur.

L'étude de l'effet des deux extraits des graines de *Nigella sativa* sur les deux voies de la coagulation (voie endogène et voie exogène) a permis d'asseoir que deux extraits exercent un effet anticoagulant sur les deux voies de la coagulation avec un effet plus marquée sur la voie endogène que sur la voie exogène et plus important pour l'EnD que pour l'ED.

A la lumière de ces résultats, il ressort que les polyphénols des graines de *Nigella sativa* peuvent être utilisés d'une part pour la prévention des lésions induites par le stress oxydant et comme antioxydants naturels dans les industries alimentaire et cosmétique et pharmaceutique et d'autre part peuvent être comme anticoagulant dans le traitement des maladies thrombotiques.

Cependant des études plus approfondies semblent être nécessaires pour valoriser ce travail notamment une caractérisation qualitative plus fine par des techniques telles que la CPG/SM ou l'HPLC/SM à fin d'établir une relation structure activité, Pour mieux évaluer le pouvoir antioxydant des extraits des graines de *Nigella sativa*. L'évaluation de l'activité antioxydante et anticoagulante *in vivo* seraient intéressante 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 seraient utiles pour la détermination des doses préventives et thérapeutiques.

Références bibliographiques

- Abdel-Fattah, A.F.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.
- Aberoumand, A., Deokule, S.S. (2008) Comparison of phenolic compounds of some edible plants of Iran and India. *Pakistan Journal of Nutrition*, **7**: 582-585.
- Adibhatla, R.M., Hatcher, J.F. (2006) Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free Radical Biology and Medicine*, **40**: 376-387.
- Ait Mbarek, L., Ait Mouse, H., Elabbadi, N., Bensalah, M., Gamouh, A., Aboufatima, R., Benarref, A., Chait, A., Kamal, M., Dalal, A., Zayad, A. (2007) Anti-tumor properties of black seed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **40**: 839-847.
- Alén-Ruiz, F., García-Falcón, M.S., Pérez-Lamela, M.C., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J. (2009) Influence of major polyphenols on antioxidant activity in Mencía and Brancellao red wines. *Food Chemistry*, **113**: 53-60.
- 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-Naqeep, G., Al-Zubairi, A.S., Ismail, M., Amom, Z.H., Esa, N.M. (2010) Antiatherogenic potential of *Nigella sativa* seeds and oil in diet-induced hypercholesterolemia in rabbits. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-9.
- Amrouche, A., Benmehdi, H., Moussaoui, A., Mebarki, K., Chaoufi, A., Saneba, A., Lazouni, H., Chabane Sari, D. (2011) Evaluation of antifungal activity of some oils from Algerian medicinal plants against *Aspergillus flavus* strain produced aflatoxins. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **1**: 48-53.
- Ardestani, A., Yazdanparast, R. (2007) Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chemistry*, **104**: 21-29.
- Arslan, R., Bor, Z., Bektas, N., Meriçli, A.H., Ozturk, Y. (2011) Antithrombotic effects of ethanol extract of *Crataegus orientalis* in the carrageenan-induced mice tail thrombosis model. *Thrombosis Research*, **127**: 210-213.
- Athukorala, Y., Jung, W.K., Vasanthan, T., Jeon, Y.J. (2006) An anticoagulative polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of *Ecklonia cava*. *Carbohydrate Polymers*, **66**: 184-191.
- Atta, M.B. (2003) Some characteristics of nigella (*Nigella sativa* L.) seed cultivated in Egypt and its lipid profile. *Food Chemistry*, **83**: 63-68.
- Arousseau, B., Durand, D., Gruffat, D. (2004) Contrôle des phénomènes oxydatifs pendant la gestation chez les monogastriques et les ruminants. *INRA Productions Animales*, **17**: 339-354.
- Awad, E.M., Binder, B.R. (2005) *In vitro* induction of endothelial cell fibrinolytic alterations by *Nigella sativa*. *Phytomedicine*, **12**: 194-202.
- Bahorun, T. (1997) Substances naturelles actives: La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. *Food and Agricultural Research Council, Reduit, Mauritius*, 83-94.
- Barouki, R. (2006) Stress oxydant et vieillissement. *Médecine sciences*, **3**: 266-272.
- Baudin, B. (2006) Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *Médecine Thérapeutique Cardiologie*, **2**: 43-52.

- Beaudeau, J.L., Delattre, J., Therond, P., Bonnefont-Rousselot, D., Legrand, A., Peynet, J. (2006) Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Immuno-analyse and Biologie spécialisée*, **21**: 144-150.
- Berger, M.M. (2003) Les oligoéléments – Quoi de neuf? *Forum Médical Suisse*, **31**: 720-726.
- Berliner, A.J., Heinecke, W.J. (1996) The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, **20**: 707-727.
- Berlett, B.S., Stadtman, E.R. (1997) Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**: 20313-20316.
- Bijak, M., Bobrowski, M., Borowiecka, M., Podśędek, A., Golański, J., Nowak, P. (2011) Anticoagulant effect of polyphenols-rich extracts from black chokeberry and grape seeds. *Fitoterapia*, **82**: 811-817.
- Bisht, K., Wagner, K.H., Bulmer, A.C. (2010) Curcumin, resveratrol and flavonoids as anti-inflammatory, cyto- and DNA-protective dietary compounds. *Toxicology*, **278**: 88-100.
- Boizot, N., Charpentier, J.P. (2006) Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés polyphénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'Inra*, pp: 79-82.
- Bonnefont-Rousselot, D. (2007) Stress oxydant et vieillissement. *Spectra Biologie*, **157**: 23-26.
- Bonnet, J. (2005) Athérosclérose. *EMC-Cardiologie Angéiologie*, **2**: 436-458.
- Boots, A.W., Haenen, G.R.M.M., Bast, A. (2008) Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, **585**: 325-337.
- Boskabady, M.H., Keyhanmanesh, R., Saadatloo, M.A. (2008) Relaxant effects of different fractions from *Nigella sativa* L. on guinea pig tracheal chains and its possible mechanism. *Indian Journal of Experimental Biology*, **46**: 805-810.
- 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. *Compt. Rendu. Biologies*, **331**: 48-55.
- Buer, C.S., Imin, N., Djordjevic, M.A. (2010) Flavonoïdes: new roles for old molecules. *Journal of Integrative Plant Biology*, **52**: 98-111.
- Burits, M., Bucar, F. (2000) Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy research*, **14**: 323-328.
- Canali, R., Vignolini, F., Nobili, F., Mengheri, E. (2000) Reduction of oxidative stress and cytokine-induced neutrophil chemoattractant (cinc) expression by red wine polyphenols in zinc deficiency induced intestinal damage of rat. *Free Radical Biology and Medicine*, **28**: 1661-1670.
- Cemeli, E., Baumgartner, A., Anderson, D. (2009) Antioxidants and the Comet assay. *Mutation Research*, **681**: 51-67.
- Cerqueira, F., Cordeiro-Da-Silva, A., Araújo, N., Cidad, H., Kijjoa, A., Nascimento, M.S.J. (2003) Inhibition of lymphocyte proliferation by prenylated flavones: Artelastin as a potent inhibitor. *Life Sciences*, **73**: 2321-2334.
- Chantiratikal, P., Meechai, P., Nakbanpote, W. (2009) Antioxidant activities and phenolic contents of extracts from *Salvinia molesta* and *Eichornia crassipes*. *Research Journal of Biological Sciences*, **4**: 1113-1117.

Références bibliographiques

- Cheikh-Rouhou, S., Besbes, S., Hentati, B., Blecker, CH., 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 oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, **21**: 162-168.
- Cillard, J., Cillard, P. (2006) Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oleagineux, Corps gras, Lipides*, **13**: 24-29.
- Cohen, A. (1997) Cardiologie et pathologie vasculaire. Ed. ESTEM. Paris. In Léoni, J. (2001). Physiopathologie de l'athérosclérose, mécanismes et prévention de l'athérotrombose. Thèse de doctorat de l'université de Franche-Comté, Besançon, UFR de Pharmacie, Besançon, France. N°25 01.
- Colvin, B. T. (2004) Physiology of haemostasis. *Vox Sanguinis*, **87**: S43-S46.
- Croizat, P., Favre-Gilly, J., Thouverez, J.P. (1968) Hémostase et coagulation (techniques usuelles). Ed. Tourelle, Saint-Mandé, pp: 97-118.
- De Beer, D., Joubert, E., Gelderblom, W.C.A., Manley, M. (2002) Phenolic compounds: A review of their possible role as *in vivo* antioxidants of wine. *South African Journal for Enology and Viticulture*, **23**: 48-61.
- Desport, J C., Couratier, P. (2002) Stress oxydant et maladies neurodégénératives. *Nutrition clinique et métabolisme*, **16**: 253-259.
- Devasagayam, T.P.A., Tilak, J.C., Bloor, K.K., Sane, K.S., Ghaskadbi, S.S., Lele, R.D. (2004) Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Journal of the Association of Physicains of India*, **52**: 794-804.
- Devi, P R., Kumari, S K., Kokilavani, C. (2007) Effect of *vitex negundo* leaf extract on the free radicals scavengers in complete freund's adjuvant induced arthritic rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, **22**: 143-147.
- Dewick, P.M. (2002) Medicinal natural products: a biosynthetic approach (2^{ème} Ed). Ed. John Wiley and Sons, LTD, Chichester, West Sussex, England, pp: 130.
- Droge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, **82**: 47-95.
- Duriez, P. (2004) Mécanismes de formation de la plaque d'athérome. *La revue de médecine interne*, **25**: S3-S6.
- Dussossoy, E., Brat, P., Bony, E., Boudard, F., Poucheret, P., Mertz, C., Giaimis, J., Michel, A. (2011) Characterization, anti-oxidative and anti-inflammatory effects of Costa Rican noni juice (*Morinda citrifolia* L.). *Journal of Ethnopharmacology*, **133**: 108-115.
- El-Agbar, Z.A., Shakya, A.K., Khalaf, N.A., Al-Haroon, M. (2008) Comparative antioxidant activity of some edible plants. *Turkish Journal of Biology*, **32**: 193-196.
- 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.H., Bakeet, D.M. (2006) The black seed *Nigella sativa* Linnaeus - A mine for multi cures: A plea for urgent clinical evaluation of its volatile oil. *J T U Medical School*, **1**: 1-19.

- El-Tohamy¹, M.M., El-Nattat, W.S., El-kady, R.I. (2010) The beneficial effects of *Nigella sativa*, *Raphanus sativus* and *Eruca sativa* seed cakes to improve male rabbit fertility, immunity and production. *Journal of American Science*, **6**: 1247-1255.
- Esmaeili, M.A., Sonboli, A. (2010) Antioxidant, free radical scavenging activities of *Salvia brachyantha* and its protective effect against oxidative cardiac cell injury. *Food and Chemical Toxicology*, **48**: 846-853.
- Fang, Y.Z., Yang, S., Wu, G. (2002) Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition*, **18**: 872-879.
- Favier, A. (2003) Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.
- Ferrazzano, G.F., Amato, I., Ingenito, A., Zarrelli, A., Pinto, G., Pollio, A. (2011) Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: A Review. *Molecules*, **16**: 1486-1507.
- Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P., Vilas-Boas, M., Barros, L. (2007) Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry*, **100**: 1511-1516.
- Frishman, W.H., Beravol, P., Carosella, C. (2009) Alternative and Complementary Medicine for Preventing and Treating Cardiovascular Disease. *Disease-a-Month*, **55**: 121-192.
- Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh, S.A., Rasooli, I. (2007) Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry*, **102**: 898-904.
- Galle, J., Hansen-Hagge, T., Wanner, C., Seibold, C. (2006) Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells. *Atherosclerosis*, **185**: 219-226.
- Gazdik, Z., Reznicek, V., Adam, V., Zitka, O., Jurikova, T., Krska, B., Matuskovic, J., Plsek, J., Saloun, J., Horna, A., Kizek, R. (2008) Use of liquid chromatography with electrochemical detection for the determination of antioxidants in less common fruits. *Molecules*, **13**: 2823-2836.
- Ghannadi, A., Hajhashemi, V., Jafarabadi, H. (2005) An investigation of the analgesic and anti-inflammatory effects of *Nigella sativa* seed polyphenols. *Journal of Medicinal Food*, **8**: 488-493.
- Ghedira, K., Le Jeune, K. (2010) Huile de nigelle cultivée, *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae). *Phytothérapie*, **8**: 124-128.
- Gomez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. (2006) Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41**: 1220-1234.
- Goren, R., Bukovac, M.J., Flore, J.A. (1974) Mechanism of indole-3-acetic acid conjugation. *Plant Physiology*, **53**: 164-166.
- Grassi, D., Desideri, G., Ferri, C. (2010) Flavonoids: Antioxidants against atherosclerosis. *Nutrients*, **2**: 889-902.
- Guerrero, J.A., Lozano, M.L., Castillo, J., benavente-garcía, O., Vicente, V., Rivera, J. (2005) Flavonoids inhibit platelet function through binding to the thromboxane A2 receptor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **3**: 369-376.
- Guglielmone, H. A., Agnese, A. M., Núñez, M., Susana, C., Cabrera, J. L. (2002) Anticoagulant effect and action mechanism of sulphated flavonoids from *Flaveria bidentis*. *Thrombosis Research*, **105**: 183-188.

- Han, N., Gu, Y., Ye, C., Cao, Y., Liu, Z., Yin, J. (2012) Antithrombotic activity of fractions and components obtained from raspberry leaves (*Rubus chingii*). *Food Chemistry*, **132**: 181-185.
- 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., Lobob, P.I., Al-Tufailc, M., Ramaa, N.R., Al-Sedairy, S.T. (1999) Immunomodulatory effect of *Nigella sativa* proteins fractionated by ion exchange chromatography. *International Journal of Immunopharmacology*, **21**: 283-295.
- Harborne, J. B., Williams C.A. (2000) Advances in flavonoids research since 1992. *Phyto Chemistry*, **55**: 481-504.
- Harrison, D., Griendling, K. K., Landmesser, U., Hornig, B., Drexler, H. (2003) Role of oxidative stress in atherosclerosis. *The American Journal of Cardiology*, **91**: 7A-11A.
- 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.
- Hopps, E., Noto, D., Caimi, G., Averna, M.R. (2010) A novel component of the metabolic syndrome: The oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, **20**: 72-77.
- Hsieh, C.L., Lin, Y.C., Yen, G.C., Chen, H.Y. (2007) Preventive effects of guava (*Psidium guajava* L.) leaves and its active compounds against α -dicarbonyl compounds-induced blood coagulation. *Food Chemistry*, **103**: 528-535.
- Ilaiyaraja, N., Khanum, F. (2010) *Nigella sativa* L: a review of therapeutic applications. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology*, **4**: 1-8.
- Jiménez-Atiéndzar, M., Escribano, J., Cabanes, J., Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F. (2005) Oxidation of the flavonoïde eriodictyol by tyrosinase. *Plant Physiology and Biochemistry*, **43**: 866-873.
- Khattab, M.M., Nagi, M.N. (2007) Thymoquinone supplementation attenuates hypertension and renal damage in nitric oxide deficient hypertensive rats. *Phytotherapy Research*, **21**: 410-414.
- Kim, M.S., Lee, K.A. (2006) Antithrombotic activity of methanolic extract of *Umbilicaria esculenta*. *Journal of Ethnopharmacology*, **105**: 342-345.
- Koehlin-Ramonatxo, C. (2006) Oxygène, stress oxydant et suppléments anti-oxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, **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.
- Koksal, E., Bursal, E., Dikici, E., Tozoglu, F., Gulcin, I. (2011) Antioxidant activity of *Melissa officinalis* leaves. *Journal of Medicinal Plants Research*, **5**: 217-222.
- Končić, M.Z., Kremer, D., Karlović, K., Kosalec, I. (2010) Evaluation of antioxidant activities and phenolic content of *Berberis vulgaris* L. and *Berberis croatica* Horvat. *Food and Chemical Toxicology*, **48**: 2176-2180.
- Kuntić, V., Filipović, I., Vujić, Z. (2011) Effects of rutin and hesperidin and their Al (III) and Cu (II) Complexes on *in vitro* plasma coagulation assays. *Molecules*, **16**: 1378-1388.
- Leopold, A.J., Loscalzo, J. (2009) Oxidative risk for atherothrombotic cardiovascular disease. *Free Radical Biology and Medicine*, **47**: 16673-1706.

- Lhuillier, A. (2007) Contribution a l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* Hook.f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (Ericaceae), *Tambourissa trichophylla* Baker (Monimiaceae) et *Embelia concinna* Baker (Myrsinaceae). Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse, Sciences des Agroressources, pp: 45.
- 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.
- Liu, X., Dong, M., Chen, X., Jiang, M., Lv, X., Yan, G. (2007) Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*. *Food Chemistry*, **105**: 548-554.
- Liu, L., Ma, H., Yang, N., Tang, Y., Guo, J., Tao, W., Duan, J. (2010) A series of natural flavonoids as thrombin inhibitors: Structure-activity relationships. *Thrombosis Research*, **126**: e365-e378.
- Liyana-Pathirana. C.M., Shahidi. F. (2007) Antioxidant and free radical scavenging activities of whole wheat and milling fractions. *Food Chemistry*, **101**: 1151-1157.
- Lusis, J.A. (2000) Atherosclerosis. *Nature*, **407**: 233-241.
- Macheix, J.J., Fleuriet, A., Jay-Allmand, C. (2005) Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechnique et universitaires romandes Ed. Lausanne, pp: 1-42.
- Mallat, Z., Tedgui, A. (2000) Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance. *British Journal of Pharmacology*, **130**: 947-962.
- Manian, R., Anusuya, N., Siddhuraju, P., Manian, S. (2008) The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L. *Food Chemistry*, **107**: 1000-1007.
- Marfak, A. (2003) Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : Formation de depsides. Thèse de doctorat de l'université de Limoges, biophysique, pp: 30-40.
- Mariod, A.A., Ibrahim, R. M., Ismail, M., Ismail, N. (2009) Antioxidant activity and phenolic content of phenolic rich fractions obtained from black cumin (*Nigella sativa*) seedcake. *Food Chemistry*, **116**: 306-312.
- Martínez-Cayuela, M. (1995) Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*, **77**: 147-161.
- Marutsuka, K., Hatakeyama, K., Yamashita, A., Asada, Y. (2005) Role of thrombogenic factors in the development of atherosclerosis. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, **12**: 1-8.
- Meddah, B., Ducroc, R., Faouzi, M.E., Eto, B., Mahraoui, L., Benhaddou-Andaloussi, A., Martineau, L.C., Cherrah, Y., Haddad, P.S. (2009) *Nigella sativa* inhibits intestinal glucose absorption and improves glucose tolerance in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **121**: 419-424.
- 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., Drzewiecki G. (1984) Flavonoid inhibition of human basophil histamine release stimulated by various agents. *Biochemical Pharmacology*, **33**: 3333-3338.
- 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.

- Milane H. (2004) La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat en Sciences de l'université de Louis Pasteur, Pharmacochimie, pp: 13-36, 155.
- Morikawa, T., Xu, F., Ninomiya, K., Matsuda, H., Yohikama, M. (2004) Nigellamines A₃, A₄, A₅, and C, new dolabellane-type diterpene alkaloids, with lipid metabolism-promoting activities from the Egyptian medicinal food black cumin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **52**: 494-497.
- Mosquera, O.M, Correa, Y.M, Buitrago, D.C, Nino, J. (2007) Antioxidant activity of twenty five plants from Colombian biodiversity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. **102**: 631-634.
- Nair, M.K., Vasudevan, P., Venkitanarayanan. K. (2005) Antibacterial effect of black seed oil on *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, **16**: 395-398.
- Namgoog, S.Y., Lee, C.H., Kim, H.P. (1994) Effets of isoflavoids on Mouse lymphocyte proliferation *in vitro*. *Archives of Pharmacal Research*, **17**: 236-239.
- Nijveldt, R.J., van Nood, E., van Hoorn, D.E.C., Boelens, P.G., van Norren, K., van Leeuwen, P.A.M. (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*, **74**: 418-25.
- Oltra, M.A., Carbonell, F., Tormos, C., Iradi, A., Sáez, T.G. (2001) Antioxidant enzyme activities and the production of MDA and 8-oxo-dG in chronic lymphocytic leukemia. *Free Radical Biology and Medicine*, **30**: 1286-1292.
- Oshchepkova, Y.I., Ragozhin, E.A., Veshkuro, O.N., Egorov, T.A., Salikhov, S.I. (2009) Comparaison of extracts from seeds and spourts of *Nigella sativa*. *Chemistry of Natural Compounds*, **45**: 293-294.
- Packard, R.S.R., Libby, P (2008) Inflammation in atherosclerosis: From vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clinical Chemistry*, **54**:1 24-38.
- Paul, J.L., Baudin, B. (2009) Physiopathologie de l'athérosclérose et marqueurs précoces. *Revue Francophone des Laboratoires*, **409**: 41-51.
- Pawlaczyk, I., Czerchawski, L., Pilecki, W., Lamer-Zarawska, E., Gancarz, R. (2009) Polyphenolic-polysaccharide compounds from selected medicinal plants of Asteraceae and Rosaceae families: Chemical characterization and blood anticoagulant activity. *Carbohydrate Polymers*, **77**: 568-575.
- Pawlaczyk, I., Czerchawski, L., Kuliczkowski, W., Karolko, B., Pilecki, W., Witkiewicz, W., Gancarz, R. (2011) Anticoagulant and anti-platelet activity of polyphenolic-polysaccharide preparation isolated from the medicinal plant *Erigeron canadensis* L. *Thrombosis Research*, **127**: 328-340.
- Pearson, D.A., Paglieroni, T.G., Rein, D., Wun, T., Schramm, D.D., Wang, J.F., Holt, R.R., Gosselin, R., Schmitz, H.H., Keen, C.L. (2002) The effects of flavanol-rich cocoa and aspirin on *ex vivo* platelet function. *Thrombosis Research*, **106**: 191-197.
- Peer, A.W., Brown, E.D., Tague, W.B., Muday, K.G., Taiz, L., Murphy, S.A. (2001) Flavonoid accumulation patterns of transparent testa mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **126**: 536-548.
- Pereira, D.M., Valentão, P., Pereira, J.A., Andrade, P.B. (2009) Phenolics: from chemistry to biology. *Molecules*, **14**: 2202-2211.
- Petti, S., Scully, C. (2009) Polyphenols, oral health and disease: A review. *Journal of dentistry*, **37**: 413-423.
- Pietta, P.G. (2000) Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, **63**: 1035-1042.

- Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.O. (2002) Mécanismes physiologiques de la défense anti-oxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*, **16**: 233-239.
- Raj Narayana, K., Sripal Reddy, M., Chaluvadi, M.R., Krishna, D.R. (2001) Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*, **33**: 2-16.
- Ramadan, M.F., Mörsel, T.J. (2002) Direct isocratic normal-phase HPLC assay of fat-soluble vitamins and β -carotene in oil seeds. *European food research and technology*, 214: 521-527.
- Ramadan, M.F. (2007) Nutritional value, functional properties and nutraceutical applications of black cumin (*Nigella sativa* L.): an overview. *International Journal of Food Science and Technology*, **42**: 1208-1218.
- Raza, A., Asif, R., Yasin, G. (1999) Use of *Nigella sativa* (Ranunculaceae): a traditional medicine. *International Journal of Agriculture and Biologie*, **3**: 184-187.
- Renné, T., Nieswandt, B., Gailani, D. (2006) The intrinsic pathway of coagulation is essential for thrombus stability in mice. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, **36**: 148-151.
- Revel, T.D., Doghmi, K. (2004) Physiologie de l'hémostase. *EMC-Dentisterie*, **1**: 71-81.
- Rizzo, F., Papisoulitis, K., Crawford, E., Dodkin, S., Cue, S. (2008) Measurement of prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT) on canine citrated plasma samples following different storage conditions. *Research in Veterinary Science*, **85**: 166-170.
- Roberts, C.K., Sindhu, K.K. (2009) Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sciences*, **84**: 705-712.
- Rodrigo, R., Bosco, C. Oxidative stress and protective effects of polyphenols: Comparative studies in human and rodent kidney. A review. (2006) *Comparative Biochemistry and Physiology*, **142**: 317-327.
- Sachdev, S., Davies, K.J.A. (2008) Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radical Biology and Medicine*, **44**: 215-223.
- Salih, B., Sipahi, T., Dönmez, E.O. (2009) Ancient nigella seeds from Boyalı Höyük in north-central Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, **124**: 416-420.
- 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.
- Salem, M.L. (2005) Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *International Immunopharmacology*, **5**: 1749-1770.
- 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.
- Samama, M.M., Elalamy, I., Conard, J., Achkar, A., Horellou, M.H. (2004) Hémorragies et thromboses: du diagnostic au traitement. *Ed. Masson, Paris*, pp: 5-8.
- Sarni-Manchado, P., Cheynier, V. (2006) Les polyphénols en agroalimentaire. *Ed. Lavoisier, Paris*, pp: 21.
- Schneider, M., Norman, R., Steyn, N., Bradshaw, D., South African Comparative Risk Assessment Collaborating Group. (2007) Estimating the burden of disease attributable to low fruit and vegetable intake in South Africa in 2000. *South African Medical Journal*, **97**: 717-723.
- Schwenke, C.D. (1998) Antioxidants and atherogenesis. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **9**: 424-445.

- Sergedieneç, E., Jönsson, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Rietjens, I.M.C.M., Čėnas, N. (1999) Prooxidant toxicity of polyphenolic antioxidants to HL-60 cells: description of quantitative structure-activity relationships. *FEBS Letters*, **462**: 392-396.
- Shafi, G., Munshi, A., Hasan, T.N., Alshatwi, A.A., Jyothy, A., Lei, D.K.Y. (2009) Induction of apoptosis in HeLa cells by chloroform fraction of seed extracts of *Nigella sativa*. *Cancer Cell International*, **9**: 29.
- Simonneau, G., Huet, Y. (1990) Embolie pulmonaire et thrombose veineuses profonde. *Ed. Masson*, Paris, pp: 7-10.
- Singh, U., Jialal, I. (2006) Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology*, **13**: 129-142.
- Singh, M., Arseneault, M., Sanderson, T., Murthy, V., Ramassamy, C. (2008) Challenges for Research on Polyphenols from Foods in Alzheimer's Disease: Bioavailability, Metabolism, and Cellular and Molecular Mechanisms. *Journal of agriculture and food chemistry*, **56**: 4855-4873.
- Sonboli, A., Mojarrad, M., Ebrahimic, S.N., Enaya, S. (2010) Free radical scavenging activity and total phenolic content of methanolic extracts from male inflorescence of *Salix aegyptiaca* grown in Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, **9**: 293-296.
- Sohal, R.S., Mockett, R.J., Orr, W.C. (2002) Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free radical biology and medicine*, **33**: 575-586.
- Sokmen, A., Jones, B.M., Erturk, M. (1999) The *in vitro* antibacterial activity of Turkish medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **67**: 79-86.
- Sorg, O. (2004) Oxidative stress: A theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies*, **327**: 649-662.
- Sultan, M.T., Butt, M.S., Anjumi, F.M., Jamil, A., Akhtar, S., Nasir, M. (2009) Nutritional profile of indigenous cultivar of black cumin seeds and antioxidant potential of its fixed and essential oil. *Pakistan Journal of Botany*, **41**: 1321-1330.
- Sun, J., Yao, J., Huang, S., Long, X., Wang, J., García-García, E. (2009) Antioxidant activity of polyphenol and anthocyanin extracts from fruits of *Kadsura coccinea* (Lem.) A.C. Smith. *Food Chemistry*, **117**: 276-281.
- Swamy, S.M.K., Tan, B.K.H. (2000) Cytotoxic and immunopotentiating effects of ethanolic extract of *Nigella sativa* L. seeds. *Journal of Ethnopharmacology*, **70**: 1-7.
- Tapas, A.R., Sakarkar, D.M., Kakde, R.B. (2008) Flavonoids as nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, **7**: 1089-1099.
- Tessier, F., Marconnet, P. (1995) Radicaux libres, systkmes antioxydants et exercice. *Science and Sports*, **10**: 1-13.
- Tomaru, T., Kawano, H.A., Tsujiuchi, Y., Suzuki, J.I., Nakajima, T., Uchida, Y. (2005) Mechanism of antithrombotic effect of heparin and antithrombin in balloon-injured arteries. *Life Sciences*, **77**: 2611-2625.
- Tounsi, S.M., Ouerghemmi, I., Wannas, A.W., Ksouri, R., Zemni, H., Marzouk, B., Kchouk, E.M. (2009) Valorization of three varieties of grape. *Industrial Crops and Products*, **30**: 292-296.
- Tulukcu, E. (2011) A comparative study on fatty acid composition of *black cumin* obtained from different regions of Turkey, Iran and Syria. *African Journal of Agricultural Research*. **6**: 892-895.

- Turkmen, N., Sari, F., Velioglu, Y.S. (2006) Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. *Food Chemistry*, **99**: 835-841.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **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.
- Vogler, A.E., Siedlecki, A.C. (2009) Contact activation of blood-plasma coagulation. *Biomaterials*, **30**: 1857-1869.
- Wajs, A., Bonikowski, R., Kalemba, D. (2008) Composition of essential oil from seeds of *Nigella sativa* L. cultivated in Poland. *Flavour and Fragrance Journal*, **23**: 126-132.
- Wang, J., Zhanga, Q., Zhang, Z., Songa, H., Li, P. (2010) Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica*. *International Journal of Biological Macromolecules*, **46**: 6-12.
- Wang, S., Melnyk, J. P., Tsao, R., Marcone, M.F (2011) How natural dietary antioxidants in fruits, vegetables and legumes promote vascular health. *Food Research International*, **44**: 14-22.
- Weissberg, L.P. (2000) Atherogenesis: current understanding of the causes of atheroma. *Heart*, **83**: 247-252.
- Winkel-Shirley, B. (2001) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*, **126**: 485-493.
- Xia, E.Q., Deng, G.F., Guo, Y.J., Li, H.B. (2010) Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *International Journal of Molecular Sciences*, **11**: 622-646.
- Zaher, K.S., Ahmed, W.M., Zerizer, S.N. (2008) Observations on the Biological Effects of Black Cumin Seed (*Nigella sativa*) and Green Tea (*Camellia sinensis*). *Global Veterinaria*, **2**: 198-204.
- Zhang, H.J., Mao, W.J., Fang, F., Li, H.Y., Sun, H.H., Chen, Y., Qi, X.H. (2008) Chemical characteristics and anticoagulant activities of a sulfated polysaccharide and its fragments from *Monostroma latissimum*. *Carbohydrate Polymers*, **71**:428-434.

Résumé

L'objectif de cette étude est l'évaluation de l'activité antioxydante et anticoagulante des deux extraits polyphénoliques : extrait délipidé (ED) et extrait non délipidé (EnD) obtenus des graines de *Nigella sativa* L. cultivée dans la région de Magra (M'sila). L'analyse qualitative des deux extraits par CCM a révélé la présence de nombreux constituants, parmi lesquels la quercétine et le kœmpfêrol. L'analyse quantitative des deux extraits par la méthode de Folin-Ciocalteu révèle leur richesse en composés phénoliques avec des teneurs de 1544 et 1450 µg EAG/ml d'extrait pour l'ED et l'EnD, respectivement. De même la teneur en flavonoïdes a été évaluée de 523 et 578,8 µg ER/ml d'extrait, respectivement. L'activité antioxydante des deux extraits a été évaluée *in vitro* par différents tests (DPPH, β-carotène-acide linoléique et le pouvoir réducteur). Les deux extraits démontrent une grande capacité à piéger la radical DPPH' avec des CI₅₀ de 7,08 et 6,50 µg /ml pour les l'ED et l'EnD, respectivement. Les résultats ont démontrés que les deux extraits sont aussi capables d'inhiber la peroxydation lipidique avec des pourcentages appréciable de l'ordre de 73% pour l'ED et 84,67 % pour l'EnD et un potentiel réducteur très important avec des CE₅₀ de 3,35 et 5,13 µg /ml, respectivement. L'activité anticoagulante des deux extraits a été également évaluée *in vitro*, en utilisant le test du temps de céphaline-kaolin et le test de temps de Quick. Les temps de coagulation obtenus sur un plasma normal en présence des deux extraits montrent qu'ils exercent un effet anticoagulant sur les deux voies de la coagulation avec un effet plus marquée sur la voie endogène que sur la voie exogène et plus important pour l'EnD que pour l'ED.

Mots clés: *Nigella sativa* L., composés phénolique, activité antioxydante, activité anticoagulante.

Summary

The objective of this study is the evaluation of the antioxydant and anticoagulant activities of two polyphenolics extracts: extract without lipids (ED) and extract with lipids (EnD) obtained from the seeds of *Nigella sativa*.L in the area of Magra (M'sila). The qualitative analysis of the two extracts by TLC revealed the presence of many compounds, among which: quercetin and kœmpferol. The quantitative analysis of the two extracts by Folin-Ciocalteu assay revealed that these were rich in phenolic compounds and the content was 1544 et 1450 µg GAE/ml of extract, respectively. Also the content of flavonoïds was evaluated at 523 and 578,8 µg RE/ml of extract for the ED and the EnD, respectively. The antioxydant activity of the two extracts was evaluated *in vitro* by different tests (DPPH, β-carotene-linoleic acid and the reducing power). The two extracts demonstrates a great capacity to trap the DPPH' radical with IC₅₀ of 7,08 and 6,50 µg /ml for the ED and the EnD, respectively. The results show that the two extracts are also able to inhibit lipid peroxydation with respectable percentages of about 73% for the ED and 84,67 % for the EnD and a great reducing power with EC₅₀ of 3,35 and 5,13 µg /ml, respectively. The anticoagulant activity of these extracts was also evaluated *in vitro* by using the test of the cephalin-kaolin time, and the test of Quick time. The times of coagulation obtained on normal plasma in the presence of these extracts indicate that they carry an anticoagulant effect on the two pathway of coagulation with highly marked effect on the endogenous pathway than on the exogenous pathway and more important for the EnD than the ED.

Key words: *Nigella sativa* L., phenolic compounds, antioxydant activity, anticoagulant activity.

المخلص

تهدف هذه الدراسة إلى تقدير النشاطية المضادة للأكسدة و النشاطية المضادة للتخثر الدموي للمستخلصين الفينوليين المنزوع الدسم وغير المنزوع الدسم المتحصل عليهما من بذور الحبة السوداء المزروعة بمنطقة مقرة (ولاية مسيلة). أظهر التحليل النوعي للمستخلصين بطريقة كروماتوغرافيا الطبقات الرقيقة وجود العديد من المركبات منها الكرسيتين و الكمفيرول. أما التحليل الكمي للمستخلصين الفينوليين المنزوع الدسم وغير المنزوع الدسم بطريقة Folin-Ciocalteu فكشف عن غنى المستخلصين بالمركبات الفينولية حيث قدر المحتوى ب 1544 و 1450 ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك/مل مستخلص، على التوالي. في حين أن محتوى المستخلصين من الفلافونات فهو 523 و 578,8 ميكروغرام مكافئ روتين /مل مستخلص، على التوالي. النشاطية المضادة للأكسدة للمستخلصين تم تقديرها مخبريا باستعمال اختبارات مختلفة (DPPH، البيتا-كاروتان-حمض اللينولييك، القدرة الارجاعية). أوضحت الدراسة قدرة عالية للمستخلصين على التقاط الجذر الحر ب CI₅₀ تعادل 7,08 و 6,5 ميكروغرام/مل بالنسبة للمستخلصين المنزوع الدسم وغير المنزوع الدسم، على التوالي. كما أوضحت النتائج قدرة المستخلصين على تثبيط الأكسدة الليبيدية بنسبة تعادل 73% و 84,67%، على التوالي. أما القدرة الارجاعية للمستخلصين فكانت جد معتبرة حيث قدرت ب CE₅₀ ب 3,35 و 5,13 ميكروغرام/مل، على التوالي. النشاطية المضادة للتخثر الدموي للمستخلصين تم تقديرها أيضا مخبريا و هذا باستعمال اختبار زمن سيفالين كاولين واختبار زمن كويك. أزمة التخثر المحصل عليها في بلازما عادية في وجود المستخلصين تبين أن هذين الأخيرين يمارسان نشاطية مضادة للتخثر على كلا مسريا التخثر الدموي و أن هذه النشاطية تكون أكثر فعالية على المسرى الداخلي مقارنة مع المسرى الخارجي و أكثر فعالية بالنسبة للمستخلص غير المنزوع الدسم مقارنة مع المستخلص المنزوع الدسم.

الكلمات المفاتيح: الحبة السوداء، المركبات الفينولية، النشاطية المضادة للأكسدة، النشاطية المضادة للتخثر الدموي.