

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 :

LEMAOUI AFAF

THEME

**Activités antioxydante et anticoagulante des huiles
essentielles des graines de *Nigella sativa*.L Algérienne**

Devant le jury:

* Benboubetra Mustapha	Prof. à l'Université de Sétif	Président
* Belattar Noureddine	Prof. à l'Université de Sétif	Rapporteur
* Djabi Farida	Prof. à l'Université de Sétif	Examineur
* Belhattab Rachid	M.C.à l'Université de Sétif	Examineur

2010-2011

Remerciements

Je remercie tout d'abord Allah qui m'a donné la santé et le courage pour terminer cette thèse.

*Je tiens à présenter ma profonde gratitude et mes sincères remerciements au Professeur **Belattar Noureddine** qui m'a fait bénéficier de son savoir et de ses conseils éclairés afin de perfectionner ce travail.*

*Mes sincères remerciements vont également aux membres du jury (**Benboubetra M, Belhattab R, Djabi F**) d'avoir accepté de juger mon travail.*

Que toute personne ayant participé de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail, trouve ici l'expression de mes très vifs remerciements.

Dédicaces

En guise de reconnaissance, je dédie ce travail

à mes chers parents, à ma famille

ainsi qu'à tous mes amis.

Résumé

L'objectif de cette étude est l'évaluation des pouvoirs antioxydant et anticoagulant des huiles essentielles obtenues des graines de la nigelle Algérienne cultivée dans la région de Magra (M'sila) et d'une huile fixe commerciale de la nigelle (huile d'El-Baraka).

L'analyse qualitative des deux huiles essentielles par CCM a révélé la présence de nombreux constituants, parmi lesquels la thymoquinone, le carvone, le thymol et/ ou le carvacrol.

Le pouvoir antioxydant de ces huiles essentielles a été évalué *in vitro* par le test du DPPH[•], le test du blanchissement de β -carotène et le test du pouvoir réducteur. Des résultats obtenus, il ressort que ces huiles ont une grande capacité de piéger le radical DPPH[•] avec des CI_{50} de 88,01 et 88,65 $\mu\text{g/ml}$ pour les huiles essentielles commerciale et Algérienne respectivement. Cette capacité antioxydante est confirmée par les tests du blanchissement de β -carotène et du pouvoir réducteur. En effet, ces huiles sont aussi capables d'inhiber la peroxydation lipidique avec des pourcentages appréciables de l'ordre de 56,13% pour l'huile essentielle de Magra et 66,72 % pour l'huile essentielle commerciale et elles possèdent un très grand pouvoir réducteur avec des CE_{50} de 132,56 et 133,37 $\mu\text{g/ml}$ respectivement.

L'activité anticoagulante des huiles essentielles de la nigelle a été également évaluée *in vitro* en utilisant les tests du temps de céphaline-kaolin (TCK) et du temps de Quick (TQ). Les temps de coagulation obtenus sur un plasma normal en présence des ces huiles indiquent qu'elles exercent une activité anticoagulante sur les deux voies de la coagulation mais cette activité est plus marquée sur la voie endogène que sur la voie exogène.

Mots clés: *Nigella sativa* L, la nigelle cultivée, les huiles essentielles, les espèces réactives
activité antioxydante, activité anticoagulante.

Summary

The objective of this study is the evaluation of the antioxidant and anticoagulant activities of essential oils obtained from the seeds of Algerian *Nigella sativa* L cultivated in the area of Magra (M'sila) and from commercial fixed oil of *Nigella sativa* (oil of El-Baraka).

The qualitative analysis of two essential oils by TLC revealed the presence of many components, among which: thymoquinone, carvone, thymol and/or carvacrol.

The antioxidant capacity of these essential oils was evaluated *in vitro* by three different tests: DPPH[•] free radical scavenging assay, β -carotene bleaching test and reducing power assay. The essential oils demonstrated a great capacity to trap the DPPH[•] radical with an IC₅₀ equal to 88,01 and 88,65 μ g/ml for the commercial and Algerian essential oils respectively. This antioxidant capacity is confirmed by the β -carotene bleaching assay and the reducing power test. Indeed this oils are also able to inhibit lipid peroxydation with respectable percentages of about 56,13% for the essential oil of Magra and 66,72 % for commercial essential oil and they have a great reducing power with an EC₅₀ of 132,56 and 133,37 μ g/ml respectively.

The anticoagulant activity of *Nigella sativa* essential oils was also evaluated *in vitro* by using two tests: 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 oils indicate that they carry an anticoagulant activity on the two pathways of coagulation but this activity is highly marked on the endogenous pathway than on the exogenous pathway.

Key words: *Nigella sativa* L, essential oils, reactive species, antioxidant activity, anticoagulant activity.

المخلص

هذه الدراسة تهدف إلى تقدير النشاطات المضادة للأكسدة و التخثر الدموي للزيوت الأساسية المستخلصة من بذور الحبة السوداء الجزائرية المزروعة بمنطقة مقرة-ولاية مسيلة- و أيضا من الزيت الثابت التجاري لهذه البذور (زيت البركة).

التحليل النوعي للزيتين الأساسيين بكروماتوغرافيا الطبقات الرقيقة أظهر وجود العديد من المركبات منها: التيموكنون، الكارفون، التيمول و/أو الكارفاكول.

النشاطية المضادة للأكسدة لهذه الزيوت الأساسية تم تقديرها في الزجاج بإستعمال إختبارات DPPH، إبيضاض البيتا-كاروتان، و القدرة الإرجاعية. من خلال النتائج المتحصل عليها يتضح بأن هذه الزيوت الأساسية تملك قدرة عالية على إلتقاط الجذر الحر DPPH[•] و ب CI_{50} تعادل 88,01 و 88,65 ميكروغرام/مل بالنسبة للزيت التجاري و الجزائري على التوالي. هذه النشاطية المضادة للأكسدة تم تأكيدها بإختبارات إبيضاض البيتا-كاروتان و القدرة الإرجاعية، إذ أن هذه الزيوت قادرة أيضا على تثبيط الأكسدة الليبيدية و بنسب معتبرة تعادل % 56,13 بالنسبة للزيت الجزائري و 66,72% بالنسبة للزيت التجاري ، و من جهة أخرى هذه الزيوت تملك قدرة إرجاعية عالية تظهر من خلال CE_{50} تعادل 132, 56 و 133,37 ميكروغرام/مل على التوالي.

النشاطية المضادة للتخثر للزيوت الأساسية للحبة السوداء تم تقديرها أيضا في الزجاج بإستعمال إختبارين: إختبار زمن Céphaline-kaolin (TCK) و إختبار زمن كويك (TQ).

ازمنة التخثر المتحصل عليها في بلازما عادية بوجود هذه الزيوت تظهر بأن مواد الأيض هذه تمارس نشاطية مضادة للتخثر على كلا مسريا التخثر الدموي وبأن هذه النشاطية تكون أكثر فاعلية على المسرى الداخلي مقارنة مع المسرى الخارجي.

الكلمات المفاتيح: *Nigella sativa.L*، الحبة السوداء، الزيوت الأساسية، الأنواع النشطة، النشاطية المضادة للتأكسد، النشاطية المضادة للتخثر.

Liste des abréviations

A : Absorbance

BHA :butylated hydroxyanisole

BHT: butylated hydroxytoluene

CCM : chromatographie sur couche mince

CE₅₀ : concentration effective à 50%

CI₅₀ : concentration inhibitrice à 50%

CPG/ SM: Chromatographie en phase gazeuse/ Spectre de masse

DMSO : dimethyl sulphoxide

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

ERO : espèces réactives oxygénées

ERN : espèces réactives azotées

GP_x : Glutathion peroxydase

GR : glutathion réductase

GSH : Glutathion

4-HNE: 4-hydroxynonenal

HE : huile essentielle

HPLC: High performance liquid chromatography

IPP: isopentenyl pyrophosphate

MDA : Malonate dialdehyde

mg : milligramme

min : minute

ml : millilitre

NOS : nitric oxyde synthase

PI : pourcentage d'inhibition

p/p : poids/poids

RF : rapport frontal

rpm : rotation par minute

Sec : seconde

SOD : superoxyde dismutase

t : temps

TCA : Trichloro-acetic acid

TCK : temps de céphaline kaolin

THQ : Thymoquinone

TQ : temps de Quick

TLC : Thin layer chromatography

UV : Ultra violet

V : volume

% : Pourcentage

Liste des figures

Figure 1 : Les différentes espèces réactives impliquées dans les systèmes biologiques	8
Figure 2 : Déroulement de l'athérosclérose et la formation de l'athérombose	18
Figure 3 : Formation d'une phlébite au niveau des veines de jambe	19
Figure 4 : La cascade de la coagulation dans la voie endogène et la voie exogène	23
Figure 5 : Structure de quelques composés rencontrés dans les huiles essentielles	28
Figure 6 : Aspect morphologique de la plante <i>Nigelle sativa</i> L.....	32
Figure 7 : Extraction des huiles fixes par Soxhlet.	38
Figure 8 : Le système d'hydrodistillation.....	39
Figure 9 : Structure de DPPH et mécanisme de sa réduction par un antioxydant.....	42
Figure 10 : Chromatographie sur couches minces des huiles essentielles de la nigelle.....	49
Figure 11 : Activité antiradicalaire des huiles essentielles et de certains de leurs constituants. ...	52
Figure 12 : La transformation des % d'inhibition de DPPH par le modèle logistique	53
Figure 13 : Cinétique du blanchissement de β -carotène en présence des huiles essentielles et de certains de leurs principaux composés	56
Figure 14 : Les pourcentages d'inhibition de la peroxydation lipidique.....	56
Figure 15 : Pouvoir réducteur des huiles essentielles et de certains de leurs constituants.....	59
Figure 16 : La transformation par le modèle logarithmique.....	60
Figure 17 : Effet du temps d'incubation des huiles essentielles avec le plasma sur le TCK	63
Figure 18 : Effet des principaux constituants d'huile essentielle de la nigelle sur le TCK.....	65
Figure 19 : Effet du temps d'incubation des huiles essentielles avec le plasma sur le TQ.....	67
Figure 20 : Effet des principaux constituants d'huile essentielle de la nigelle sur le TQ	70

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les principales affections liées au stress oxydant.....	15
Tableau 2 : Rapports frontaux des spots des huiles essentielles de la nigelle et des témoins utilisés	50
Tableau 3 : Effet de la concentration des huiles essentielles sur le TCK.....	64
Tableau 4 : Effet de la concentration des huiles essentielles sur le TQ.....	68

Sommaire

Introduction générale	1
-----------------------------	---

Rappels bibliographiques

I)- Radicaux libres, systèmes antioxydants et stress oxydatif	3
I-1) Les radicaux libres	3
I-1-1) Nature et sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène (ERO).....	3
- L'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$	4
- Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2	4
- Le radical hydroxyle $\cdot OH$	5
- L'acide hypochloreux HOCL	6
- L'oxygène singulier 1O_2	6
I-1-2) Nature et sources cellulaires des espèces réactives de l'azote (ERN).....	7
I-1-3) Rôle physiologique des ERO et ERN	8
I-2) Les systèmes de défense antioxydants	9
I-2-1) Les systèmes antioxydants enzymatiques.....	9
I-2-1-1) La superoxyde dismutase	9
I-2-1-2) La catalase	9
I-2-1-3) Les glutathion peroxydases	10
I-2-1-4) La glutathion réductase.....	10
I-2-2) Les systèmes antioxydants non enzymatiques	10
I-2-2-1) Les antioxydants endogènes	10
I-2-2-2) Les antioxydants exogènes.....	11
I-3) Le stress oxydatif	12
I-3-1) Définition.....	12
I-3-2) Conséquences biologiques du stress oxydatif	13
I-3-2-1) L'oxydation des lipides.....	13
I-3-2-2) L'oxydation des protéines	14
I-3-2-3) L'oxydation de l'ADN	14
I-3-3) Implication pathologiques du stress oxydatif.....	14

II)-Les thromboses.....	16
II-1) Les thromboses artérielles	16
II-1-1) Mécanisme physiopathologique	16
II-2) Les thromboses veineuses.....	19
II-2-1) Mécanisme physiopathologique	20
II-3) Traitement des maladies thrombotiques	23
III)-Les huiles essentielles.....	26
III-1) Composition chimique	26
III-1-1) Les terpènes.....	26
III-1-2) Les composés aromatiques	27
III-2) Biosynthèse et rôle biologique.....	28
III-3) Procédés d'extraction.....	30
III-4) Propriétés pharmacologiques et toxicologiques	30
IV)- La plante : <i>Nigella sativa</i> L.....	32
IV-1) Description de la plante.....	32
IV-2) Phytochimie de la graine.....	33
IV-3) Propriétés pharmacologiques de la graine	34

Partie expérimentale

I)-Matériels et méthodes.....	37
I-1) Matériels	37
I-1-1) Matériel végétal.....	37
I-1-2) Produits chimiques	37
I-2) Méthodes	38
I-2-1) Extraction des huiles essentielles des graines de la nigelle	38
➤Extraction des huiles fixes	38
➤Hydrodistillation des huiles fixes	39
I-2-2) Caractérisation qualitative des huiles essentielles	40
I-2-3) Activité antioxydante des huiles essentielles	41
I-2-3-1) Test du DPPH.....	41
I-2-3-2) Test du blanchissement de β -carotène	43
I-2-3-3) Test du pouvoir réducteur.....	44

I-2-4) Activité anticoagulante des huiles essentielles	45
I-2-4-1) Préparation du plasma pool déplaquettés	45
I-2-4-2) Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène.....	45
I-2-4-3) Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène.....	46
I-2-5) Analyses statistiques	47
II)-Résultats et discussion	48
II-1) Extraction des huiles essentielles des graines de la nigelle.....	48
II-2) Caractérisation des huiles essentielles	49
II-3) Activité antioxydante des huiles essentielles	51
II-3-1) Test du DPPH'	51
II-3-2) Test du blanchissement de β -carotène.....	55
II-3-3) Test du pouvoir réducteur	58
II-4) Activité anticoagulante des huiles essentielles	62
II-4-1) Activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène.....	62
II-4-2) Activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène.....	67
Conclusion et perspectives	71
Références bibliographiques	

Introduction générale

Les utilisations très vastes des plantes médicinales depuis des siècles par l'homme pour traiter les différentes pathologies courantes ont poussé les chercheurs à étudier les activités pharmacologiques des différents métabolites végétaux pour confirmer ses propriétés thérapeutiques d'une part et d'autre part pour identifier les principes actifs à l'origine de ces vertus et par conséquent l'usage de ces médicaments naturels à bon escient dans les systèmes de soins primaires.

Parmi les métabolites végétaux extensivement étudiés figurent les polyphénols, les huiles essentielles et les alcaloïdes qui possèdent de nombreuses propriétés pharmacologiques telle que la propriété antioxydante qui a attiré l'attention de nombreux laboratoires et chercheurs dans le cadre de la recherche d'antioxydants naturels utilisés dans les industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques d'une part et d'autre part pour valoriser l'effet préventif de ces métabolites contre les différentes pathologies liées au stress oxydatif.

Par ailleurs, les maladies thrombotiques artérielles ou veineuses constituent actuellement un problème de santé majeur et l'une des causes principales de la mortalité dans le monde [1] c'est pour ça plusieurs études sont focalisées sur la recherche des anticoagulants naturelles pour traiter ces pathologie vasculaires.

Les graines de *Nigella sativa* L, ou la nigelle cultivée (Sinouj ou Habba sawda) est l'une des sources de plantes médicinales qui occupent une place particulière dans le monde de la médecine traditionnelle à cause de ses utilisations thérapeutiques très vastes par les populations dans les pays Arabe, en Asie et en Europe contre de nombreuses pathologies telles que l'hypertension, le diabète, la fièvre, la migraine, l'inflammation, les problèmes gastro-intestinales...etc [2]. En plus de ces usages, ces graines sont aussi très employées comme épices additionnées à plusieurs préparations culinaires (pain, pates, salades, fromages ...etc.) [3]. Des dizaines d'études ont été réalisées sur la composition chimique de ces graines en corrélation avec leurs propriétés pharmacologiques. Ces recherches ont confirmé *in vivo* comme *in vitro* les propriétés pharmacologiques (anti-inflammatoire, antioxydante antidiabétique, anticancéreuse, antimicrobienne...etc.) des différents extraits de ces graines et ont montré que parmi les principes actifs responsables de ces activités pharmacologiques sont les huiles essentielles [4].

Dans ce contexte s'inscrit cette étude qui vise à évaluer le pouvoir antioxydant et l'activité anticoagulante des huiles essentielles de ces graines.

Ce travail a été réalisé en trois étapes :

- La première étape correspondant à l'extraction des huiles essentielles à partir des graines de la nigelle cultivée en Algérie (Magra, M'sila) et aussi à partir d'une huile fixe commerciale (huile d'El-Baraka), et la caractérisation qualitative de deux huiles essentielles par chromatographie sur couches minces (CCM).

- La deuxième étape consiste à évaluer le pouvoir antioxydant, *in vitro*, de ces huiles en utilisant différents tests (test du radical DPPH, test du blanchissement de β -carotène et test du pouvoir réducteur).

- La troisième étape correspondant à l'évaluation de l'activité anticoagulante de ces huiles vis-à-vis de la voie endogène et la voie exogène de la coagulation à travers les tests du temps de céphaline-kaolin (TCK) et du temps de Quick (TQ) respectivement.

Rappels bibliographiques

I- Radicaux libres, systèmes antioxydants et stress oxydatif

I-1) 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 une instabilité énergétique et cinétique. Ils apparaissent soit au cours de la rupture d'une liaison covalente pendant laquelle chaque atome conserve son électron, soit au cours d'une réaction redox avec perte ou gain d'électron à partir d'un composé non radical.

Du fait de leur instabilité énergétique, les radicaux libres ont tendance à revenir immédiatement à l'état stable en donnant un électron ou en prenant une à une autre molécule ils peuvent donc être réducteurs ou oxydants, c'est-à-dire ils ont la propriété d'être extrêmement réactifs vis-à-vis les molécules environnantes, et ils possèdent un temps de demie vie extrêmement court (de la nano à la milliseconde) [5].

Les radicaux libres qui proviennent de l'O₂ sont appelés « Les espèces réactives de l'oxygène » (**ERO**) alors que les radicaux libres qui sont générés de la réaction de l'oxygène avec l'azote sont considérés comme une sous-classe des radicaux libres appelée « Les espèces réactives de l'azote » (**ERN**) [6].

Ces espèces réactives oxygénées et azotées regroupent non seulement des radicaux libres mais également des dérivés non radicalaires mais ils sont très réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux libres, parmi ces espèces réactives non radicalaires : ¹O₂, H₂O₂, HOCl, et le nitroperoxyde (ONOOH) [7].

I-1-1) Nature et sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène(ERO)

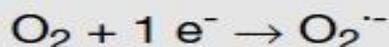
Les ERO ou les formes actives de l'O₂ proviennent du métabolisme de l'oxygène, et sont trouvées dans tous les organismes aérobiques [8] et produites lors des activités cellulaires normales selon différents mécanismes et systèmes enzymatiques [9].

Ces espèces constituent la classe la plus importante des espèces réactives produites dans les systèmes vivants et représentent environ 1-3% de l'oxygène consommé par le corps.

Parmi les ERO prédominantes dans les organismes on distingue l'O₂ ·⁻, l'H₂O₂, l'·OH, l'HOCl et l'¹O₂ [9] [10].

- L'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$

L'anion superoxyde est l'espèce la plus couramment générée par la cellule par une réduction mono-électronique (addition d'un seul e^-) de l'oxygène moléculaire O_2 [11] [12].



C'est un radical relativement faible, qui n'est pas très réactif, dont les effets cytotoxiques sont attribués généralement à leur rôle comme un précurseur des espèces plus agressives comme l' H_2O_2 , l' $\cdot OH$, l' $HOCl$ et le peroxy-nitrite [11] [13] (**Figure 1**).

La source principale de l'anion superoxyde est la mitochondrie, environ de 80% de l' $O_2^{\cdot-}$ provient de la chaîne respiratoire durant la phosphorylation oxydative et le transport des électrons au niveau des cytochromes mitochondriaux pour la production d'énergie (ATP) [14]. 1 à 3% des électrons totales fuient au niveau du complexe I et III de la chaîne respiratoire pour former l' $O_2^{\cdot-}$ au lieu de contribuer à la réduction de l' O_2 en H_2O selon la réaction suivante [10] :



La génération mitochondriale de l' $O_2^{\cdot-}$ représente la source intracellulaire majeure des autres ERO [15].

Lors de la réaction inflammatoire, les neutrophiles et les macrophages activés sont aussi des sources importantes de l' $O_2^{\cdot-}$ qui est formé enzymatiquement par la « NADPH oxydase » pour protéger l'organisme contre toute infection bactérienne [11] [16].

La xanthine oxydase activée lors de l'ischémie/reperfusion [17], et l'activité de cytochrome p 450 durant les réactions de détoxification constituent aussi des sources importantes de l' $O_2^{\cdot-}$ [16].

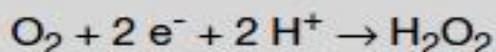
- Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2

Le peroxyde d'hydrogène ou l'eau oxygénée n'est pas un radical (tous ses électrons périphériques sont appariés), mais il est considéré comme un membre dans la famille des ERO à cause de sa capacité de générer des espèces hautement réactives telles que le radical $\cdot OH$, et le $HOCl$ [11] [12].

Le H_2O_2 , relativement toxique [12] est obtenu à partir de $\text{O}_2^{\bullet -}$ soit par dismutation spontanée soit par dismutation catalysée par la «superoxyde dismutase SOD» selon la réaction suivante [16] [18].



Il peut également résulter de la réduction biélectronique de l'oxygène en présence d'oxydase (amino acides oxydases, glycolate oxydase, urate oxydase) qui se trouve principalement dans des organites cellulaires bien individualisés comme les peroxysomes [12].

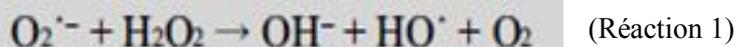


La monoamine oxydase de la membrane mitochondriale externe est aussi capable de générer l' H_2O_2 pendant la désamination oxydative de certaines amines [12] [15].

- Le radical hydroxyle OH^{\bullet}

Le radical hydroxyle est l'espèce la plus réactive et la plus préjudiciable d'une demie de vie très courte de 10^{-9} S [10]. Ce radical est capable de provoquer des lésions oxydatives sur différentes molécules biologiques (ADN, protéines, lipides...) [13].

Il est formé à partir de $\text{O}_2^{\bullet -}$, et de peroxyde d'hydrogène selon la réaction de Haber-Weiss (Réaction 1) [15] et aussi à partir de peroxyde d'hydrogène et en présence des métaux de transitions (Fe^{+2} , Cu^+) selon la réaction de Fenton (Réaction 2) [16].



Le radical hydroxyle peut être formé aussi à partir de l'acide hypochloreux «HOCl» selon une réaction caractérisée par la présence d'un donneur d'électron [13].



- L'acide hypochloreux HOCl

Le HOCl est l'un des oxydants physiologiques les plus forts et un puissant agent antimicrobien [13]. Il a une durée de vie très longue comparée aux autres espèces réactives lui permettant de diffuser à distance [18].

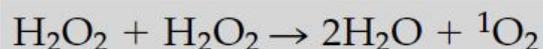
Ce radical est synthétisé par la myéloperoxydase des neutrophiles et des éosinophiles et à partir d' H_2O_2 et de Cl^- selon la réaction suivante [13] [18]

**- L'oxygène singulier $^1\text{O}_2$**

L'oxygène singulier est une forme excitée de l'oxygène moléculaire [20], cette forme n'est pas radicalaire, obtenue par appariement des deux électrons célibataires de l' O_2 , appariement qui nécessite un apport d'énergie considérable et explique que $^1\text{O}_2$ est très énergétique et donc très réactionnel [18]. Il a une durée de vie très courte de l'ordre de 10^{-6} s [20], et réagit comme agent oxydant électrophile qui peut s'attaquer à tous les types de molécules organiques (lipides, protéines, carbohydrates etc....) [18]. Il est formé par la myéloperoxydase des neutrophiles à partir de l' H_2O_2 et HOCl selon la réaction de Mallet :



La génération de $^1\text{O}_2$ peut également se produire pendant la disproportionation spontanée de l' H_2O_2 selon la réaction ci-dessous [20].



La xanthine oxydase et la lipoxygénase sont aussi des sources importantes de l'oxygène singulier [20].

À côté de ces espèces réactives, il existe dans les systèmes biologiques d'autres espèces oxygénées réactives qui résultent des réactions d'oxydation catalysées par les ERO précédentes sur les molécules biologiques, parmi ces espèces dites secondaires on distingue les radicaux hydroperoxyde (HO_2^\cdot), peroxyde (RO_2^\cdot) et alcoxyde (RO^\cdot) [21] (**Figure 1**).

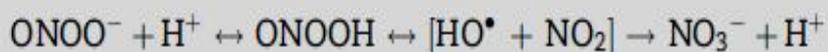
I-1-2) Nature et sources cellulaires des espèces réactives de l'azote (ERN)

Les espèces réactives de l'azote renferment principalement le monoxyde d'azote ($\text{NO}\cdot$), le peroxy-nitrite (ONOO^-), le dioxyde de nitrogène ($\text{NO}_2\cdot$) et le nitrosyl hydride (HNO) [6] (Figure1).

- Le monoxyde d'azote ($\text{NO}\cdot$) est un radical qui possède un seul électron célibataire, il est formé dans les tissus biologiques par la nitrique oxyde synthase « **NOS** » qui oxyde l'arginine en citrulline avec formation de $\text{NO}\cdot$ [10]. Trois isoformes de NOS ont été identifiées dans les tissus des mammifères : la NOS neuronal (NOS1), la NOS endothéliale (NOS 3) et la NOS inductible (NOS 2). La NOS1 et la NOS 3 sont responsables de la production de $\text{NO}\cdot$ de façon constitutive pour des nombreuses fonctions physiologiques, alors que la NOS2 est une enzyme inductible exprimée en réponse à des cytokines, à des produits bactériens ou immunologiques et à d'autres stimulateurs non immunologiques [13]. Le $\text{NO}\cdot$ est un oxydant faible, sa durée de vie est très courte, et la voie de transformation la plus dangereuse du $\text{NO}\cdot$ est sa réaction avec l'anion $\text{O}_2\cdot^-$, cette réaction conduit à la formation de peroxy-nitrite ONOO^- un puissant agent oxydant [18].



- Le peroxy-nitrite (ONOO^-) est capable de réagir avec les fonctions thiols, les lipides, les bases nucléiques et les protéines. C'est un agent nitrant actif qui agit sur les cycles aromatiques (tyrosine et tryptophane) [18]. Quand il est protoné, il conduit à la formation des oxydants très forts comme le $\cdot\text{OH}$ et le $\text{NO}_2\cdot$ [13].



A coté des sources cellulaires des ERO et ERN il existe des facteurs exogènes qui peuvent participer directement ou indirectement dans la génération de ces espèces réactives dans les systèmes biologiques, parmi les quels les radiations ionisantes et non ionisantes, les gaz toxiques comme l'ozone O_3 , les toxines, les drogues [22], les pesticides, les métaux lourds, certains conservateurs alimentaires comme le dioxyde de sulfure, le tabagisme, les alcools...etc [23].

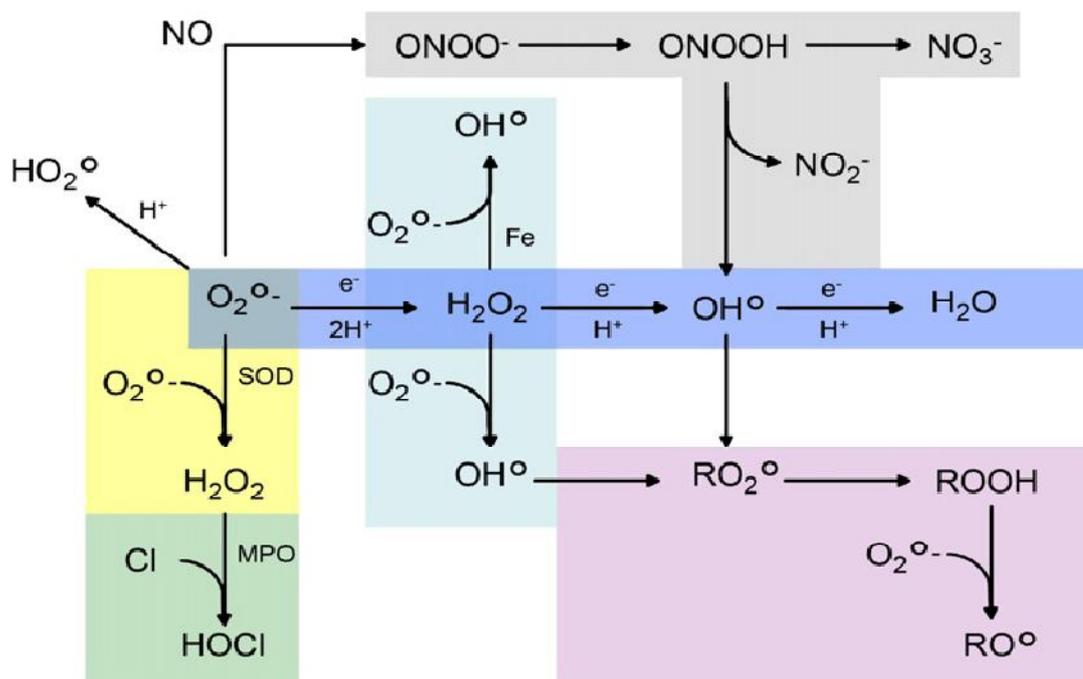


Figure 1 : Les différentes espèces réactives impliquées dans les systèmes biologiques [5]

I-1-3) Rôle physiologique des ERO et ERN

La production des ERO et ERN est permanente et physiologique et n'est pas limitée aux conditions pathologiques, car ces espèces réactives participent dans de nombreuses fonctions biologiques [5]. À titre d'exemple le NO^\bullet joue un rôle dans plusieurs processus physiologiques tel que la protection cardiaque, la régulation de la pression artérielle, la neurotransmission et les mécanismes de défense [6].

Ces espèces réactives ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , NO^\bullet) interviennent aussi dans la maturation, l'hyperactivation des spermatozoïdes et la fusion de spermatozoïde avec l'ovocyte [8] [23], dans la signalisation cellulaire et la régulation de nombreux facteurs de transcription tel que l'AP1 (Activator protein-1) et HSF1 (heat shock factor 1) qui activent des gènes dits « Protecteur pour la cellule », ces gènes régulent l'expression de molécules de défense telles que les « antioxydants » ou les « HSP » (Heat Shock Protein) contribuant aux processus de réparation et régénération cellulaire [5]. Les espèces réactives oxygénées et azotées participent aussi dans la différenciation cellulaire, l'apoptose, l'immunité et la défense contre les micro-organismes [24].

I-2) Les systèmes de défense antioxydants

Pour limiter les effets délétères des espèces réactives radicalaires et non radicalaires et leurs conséquences physiopathologiques, l'état redox intracellulaire est équilibré par des systèmes antioxydants [17]. Ces systèmes antioxydants sont soit des molécules qui captent rapidement les espèces réactives, soit des systèmes enzymatiques qui catalysent la conversion des molécules pro-oxydantes en molécules stables [25].

Donc selon le mode d'action de ces systèmes, on distingue deux classes d'antioxydants enzymatiques et non enzymatiques [11] [26].

I-2-1) Systèmes antioxydants enzymatiques

Les enzymes antioxydantes représentent un système très important pour la défense contre l'attaque radicalaire, elles incluent principalement : la superoxyde dismutase, la catalase, les glutathion peroxydases et la glutathion réductase.

I-2-1-1) La superoxyde dismutase (SOD)

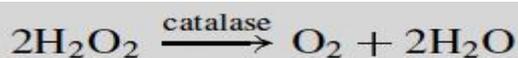
La superoxyde dismutase se trouve dans tous les organismes aérobiques, elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante [11].



Il existe plusieurs isoformes de SOD qui diffèrent entre elles dans leur structure, leur contenu métallique (cofacteur) et leur localisation cellulaire : la SOD intracellulaire (Cu, Zn-SOD), la SOD extracellulaire (EC-SOD) et la SOD mitochondriale (Mn-SOD) [17] [26]. Chez l'homme les taux élevés de SOD sont détectés particulièrement dans le foie, les reins, et la rate [11].

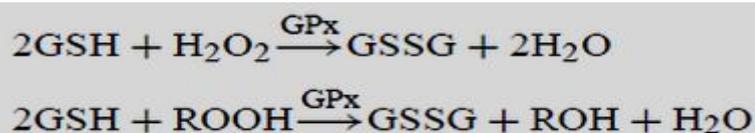
I-2-1-2) La catalase (CAT)

La catalase est présente dans la majorité des organes cellulaires mais particulièrement elle est concentrée dans les peroxysomes du foie, elle catalyse la réduction de peroxyde d'hydrogène en oxygène et eau selon la réaction suivante [27].



I-2-1-3) Les glutathion peroxydases (GP_x)

Les glutathion peroxydases sont des enzymes homo-tétramériques et sélénodépendantes c'est-à-dire qu'elles contiennent dans leur site actif un atome de sélénium (Se) à la place d'un soufre cystéinique [21]. Elles catalysent la dégradation de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et des peroxydes organiques (les hydroperoxydes lipidiques) en H₂O et alcools respectivement dans une réaction qui utilise le glutathion «GSH» comme un co-substrat réducteur selon les réactions ci dessous [17] [16] [28].



Jusqu'à présent 5 formes des GP_x ont été identifiées : cellulaire, gastro-intestinale plasmatique et spermatique [17].

I-2-1-4) La glutathion réductase (GR)

La glutathion réductase participe de façon indirecte dans la défense antioxydante, elle intervient dans la régénération du glutathion oxydé «GSSG » utilisant le NADPH comme un cofacteur selon la réaction suivante [16].



I-2-2) Systèmes antioxydants non enzymatiques

Cette classe d'antioxydants regroupe des composés de faible poids moléculaire qui peuvent être soit d'origine endogènes ou exogènes.

I-2-2-1) Les antioxydants endogènes

Ce groupe de systèmes antioxydants renferme de nombreuses substances parmi lesquelles on peut citer :

Le glutathion "GSH", un tripeptide (glutamique-cystéine-glycine) qui possède un groupement thiol –SH- [26], et considéré comme l'un des constituants majeurs du système antioxydant endogène [13] [29]. Il intervient dans la défense contre l'oxydation *via* leur rôle comme cofacteur de certaines enzymes antioxydantes telles que les glutathion peroxydases et

les glutathion transférases [28]. Il est capable de piéger directement certaines espèces réactives (OH^\cdot , ROO^\cdot , RO^\cdot , HOCl) et d'agir comme un agent chélateur de cuivre [26]. Le glutathion est aussi capable de protéger les groupements $-\text{SH}-$ des protéines contre l'oxydation et de régénérer les antioxydants oxydés comme les vitamines E et C [28].

La mélatonine, une hormone sécrétée par la glande pinéale, possède une capacité antioxydante élevée, elle est capable de neutraliser des différentes espèces réactives probablement par donation d'hydrogène de groupement $-\text{NH}-$. Elle intervient aussi dans l'induction de la synthèse de certains antioxydants enzymatiques [26] [27].

L'acide urique, un déchet cellulaire provient de l'oxydation d'hypoxanthine et de xanthine par la xanthine oxydase et déhydrogénase. Il agit en piégeant des différentes espèces réactives, les radicaux peroxydes, OH^\cdot , $^1\text{O}_2$, O_3 , NO^\cdot et des autres espèces réactives. Il est aussi capable de protéger les protéines contre la nitration et de chélater les ions métalliques [26].

Les protéines chélatrices des métaux comme le transferrine, la ferritine, la céruloplasmine, l'albumine, la métallothionine et la myoglobuline sont aussi considérées comme des antioxydants endogènes très importants, elles agissent en diminuant la disponibilité d'agents pro-oxydants, comme les ions $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ou $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ qui peuvent participer dans la génération des espèces très réactives [8] [27].

I-2-2-2) Les antioxydants exogènes

Toutes les défenses précédentes peuvent être renforcées par des composants exogènes apportés par l'alimentation. Ces antioxydants nutritionnels incluent principalement les vitamines, les caroténoïdes, les composés phénoliques et certains éléments minéraux [5] [30].

La vitamine E ou l' α -tocophérol est un important antioxydant liposoluble présent dans les huiles végétales (huile de tournesol, de soja, de maïs...etc), les noix, les graines, le lait, et les œufs [5] [31]. Il est capable de réagir avec plusieurs radicaux libres (ROO^\cdot , $\text{O}_2^{\cdot-}$, $^1\text{O}_2$) [30], et agit particulièrement en inhibant la peroxydation lipidique [32].

La vitamine C ou l'acide ascorbique est un puissant antioxydant hydrosoluble [32] présent dans les agrumes, les légumes, le poivron, le chou, la fraise...etc [5]. A côté de son rôle dans la régénération de vitamine E, la vitamine C est capable de réduire d'autres biomolécules oxydées et d'agir comme un piègeur direct de radicaux libres [16].

D'autre part les caroténoïdes (l' α et le B carotène, le lycopène, la lutéine, la zéaxanthine, l'astaxanthine...) qui forment une grande famille de polyènes conjugués que l'on trouve en abondance dans les plantes et notamment les fruits et les légumes orangés et vert foncés sont des excellents piègeurs de radicaux peroxydes, d'oxygène singulier, de radical hydroxyle et d'anion super oxyde [5] [27] [28].

Les composés phénoliques tels que les flavonoïdes, les tanins, et les acides phénoliques présents dans tous les fruits, les légumes, le thé, les céréales complètes, les raisins, les lentilles...etc [5] sont aussi des puissants antioxydants nutritionnelles capables de chélater les métaux de transition et d'inhiber la propagation de la réaction radicalaire en piégeant des différentes espèces réactives [28] [27].

Les oligo-éléments comme le sélénium, le zinc, le manganèse, et le fer, sont aussi considérés comme des antioxydants nutritionnels se trouvent dans le poisson, les volailles, les céréales, les légumes verts, les produits laitiers...etc. Ils servent notamment de cofacteur aux enzymes antioxydantes (la glutathion peroxydase, la SOD cytosolique, la SOD mitochondriale et la catalase respectivement) [5] [30].

A coté de ces principaux antioxydants nutritionnels, l'alimentation contient d'autres métabolites aux propriétés antioxydantes, tels que les huiles essentielles [31], les alcaloïdes les acides organiques, les phytates, les dérivés soufrés de l'ail et de l'oignon, les dérivés indoliques du chou...etc [7].

I-3) Le stress oxydatif

I-3-1) 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 [33], il se produit dans la cellule quand la concentration des espèces réactives excède les capacités antioxydantes de cette cellule [24]. Ainsi, le stress oxydant est la conséquence d'une augmentation dans la génération des espèces réactives (dans le cas par exemple des intoxications aux métaux lourds, dans l'irradiation, dans les ischémies/reperfusions [7], tabagisme, les maladies inflammatoires, le stress [5] ...etc) et /ou d'une défaillance dans les systèmes antioxydants [24] à cause soit d'un déficit nutritionnel en antioxydants comme les vitamines ou aux anomalies génétiques responsables d'un mauvais

codage d'une protéine soit enzymatiquement antioxydante, soit synthétisant un antioxydant soit régénérant un antioxydant [7].

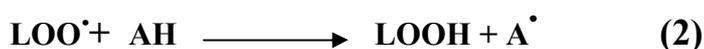
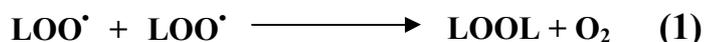
I-3-2) Conséquences biologiques du stress oxydatif

Les radicaux libres et les autres espèces réactives présentent un paradoxe dans leur fonction biologique [9], ils sont indispensables à la vie et responsables de nombreuses fonctions physiologiques d'une part et d'autre part ils constituent des espèces hautement dangereuses susceptibles lors d'un stress oxydant d'endommager par oxydation les différentes molécules biologiques notamment les lipides, les protéines et l'ADN [5] [7].

I-3-2-1) L'oxydation des lipides

Les lipides et particulièrement leurs acides gras polyinsaturés constituent des cibles privilégiées des espèces réactives. L'oxydation des lipides connue généralement sous le nom de la peroxydation lipidique se déroule en 3 phases :

- L'initiation est due à l'attaque d'une espèce réactive (radicaux peroxydes, hydroxydes alcoxydes, $^1\text{O}_2$, peroxyde d'azote...) pour arracher un hydrogène d'un acide gras polyinsaturé (**LH**), conduisant alors à la formation d'un radical acide gras (**L'**) [26] [34].
- La phase de propagation débute lorsque le radical acide gras **L'** réagit avec l' O_2 formant un radical peroxyde **LOO'** qui peut arracher un hydrogène d'un autre acide gras polyinsaturé et créer un nouveau radical libre qui s'oxydera et ainsi de suite [21]. Au cours de cette réaction, le radical peroxyde est converti, par ajout d'hydrogène, en hydroperoxyde (**LOOH**) qui se décompose généralement en produits très toxiques tels que les aldéhydes (Malonaldéhyde, 4-hydroxynonanal...) à partir de la plupart des acides gras polyinsaturés et des isoprénanes à partir d'esters de l'acide arachidonique [21]. Ces hydroperoxydes sont aussi capables de réagir avec les métaux de transition (Fe^{2+} , Cu^+) engendrant des espèces très réactives (radicaux alkoxydes **LO'** et hydroxydes **OH'**) [34].
- La phase de terminaison consiste à terminer la réaction radicalaire soit par la combinaison de deux radicaux peroxydes pour former un peroxyde relativement stable (réaction 1) [21] soit par la neutralisation des radicaux libres par des antioxydants (**AH**) (réaction 2) [35].



I-3-2-2) L'oxydation des protéines

La toxicité des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote s'exerce également sur les protéines, et particulièrement sur leurs acides aminés aromatiques comme le tryptophane, la tyrosine et l'histidine [5]. La cystéine et la méthionine constituent d'autres cibles des espèces réactives qui attaquent les groupements -SH- conduisant à la formation des ponts disulfuriques et par conséquent l'agrégation de plusieurs molécules de protéines [5] [10]. A côté de la capacité de ces espèces réactives de réagir et modifier les acides aminés, elles sont aussi capables de couper les liaisons peptidiques et de former des fragments protéiques en cas d'une agression très forte [5] [7]. Ces modifications oxydatives des protéines conduisent généralement au changement de la conformation spatiale et par conséquent l'altération de la fonction biologique de cette protéine (enzyme, récepteur, facteur de transcription...) [5] [7].

I-3-2-3) L'oxydation de l'ADN

L'ADN qu'il soit nucléaire ou mitochondrial est également une cible majeure des espèces réactives oxygénées et azotées [5] qui sont capables de réagir avec les déoxyriboses de l'ADN mais aussi avec ses bases puriques et pyrimidiques [5] [32] induisant alors des différents dommages comme la modification des bases, la formation des sites abasiques, les cassures de brins, les pontages DNA-protéines, et les réarrangements chromosomales [7] [26] [32]. Le radical hydroxyle OH[•] est le plus réactif envers les bases azotées et le déoxyribose [21] [26], alors que l'anion O₂⁻ et le H₂O₂ ne sont pas toxiques à l'ADN, mais leur génotoxicité peut être attribuée à leur contribution dans la génération du radical hydroxyle et de peroxy-nitrite [26]. Les dommages oxydatifs d'ADN sont impliqués généralement dans la mutagenèse, la cancérogenèse et le vieillissement [36].

I 3-3) Implications pathologiques du stress oxydatif

En raison de leur réactivité élevée, les espèces réactives interagissent avec toute une série de substrats biologiques conduisant à l'altération de l'homéostasie cellulaire de l'organisme. Le dysfonctionnement des systèmes de régulation de l'oxygène et de ses métabolites est à l'origine de phénomènes du stress oxydant dont l'importance dans de nombreuses pathologies comme facteur déclenchant ou associé à des complications lors de leur évolution est maintenant largement démontré [7]. En fait, de nombreuses études, tant épidémiologiques que cliniques, indiquent que le stress oxydant est potentiellement impliqué dans le développement de plus d'une centaine de pathologies humaines différentes allant de

l'athérosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, cardiovasculaires, neurodégénératives et le diabète [7] (**Tableau 1**).

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 de radicaux [37].

Tableau 1 : Les principales affections liées au stress oxydant

Pathologies	Références
Cancer	[28] [32]
Diabète type 2	[10] [38]
L'athérosclérose	[17]
L'hypertension	[24]
Arthrite rhumatoïde	[39]
Maladies d'Alzheimer, de parkinson	[40] [41]
Maladies respiratoires (asthme)	[27]

II- Les thromboses

Les thromboses sont les maladies vasculaires les plus fréquentes [42] qui résultent d'une interaction complexe entre les protéines circulantes de la coagulation, les plaquettes et la paroi vasculaire [1]. Selon le site de leurs formations on distingue deux types des thromboses : thromboses artérielles et thromboses veineuses, deux entités distinctes différent entre elles dans les facteurs de risque, les mécanismes physiopathologiques et les manifestations cliniques [42] [43].

II-1) Les thromboses artérielles

La thrombose artérielle est un caillot ou thrombus blanc constitué d'amas plaquettaire consolidé par un réseau fibrineux et elle se forme habituellement après l'érosion ou la rupture de la plaque athéromateuse liée à l'évolution de l'athérosclérose, cette thrombose est connue sous le nom d'athéromatose [1] [42] [43]. L'athéromatose est considérée actuellement comme la cause principale de la mortalité dans le monde [1] [44], elle est responsable des complications cliniques très dangereuses regroupées en trois catégories : les syndromes coronariens aigus, l'accident vasculaire cérébral et l'ischémie aiguë des membres inférieurs [1] [42] [43].

II-1-1) Mécanisme physiopathologique

Le générateur principal de la thrombose artérielle est l'athérosclérose, une atteinte inflammatoire chronique qui affecte les artères de gros et de moyen calibre qui sont particulièrement les artères coronaires, périphériques, cérébrales, les carotides, et l'aorte [1] [45]. Selon l'organisation mondiale de la santé, l'athérosclérose est une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibre consistant en une accumulation focale de lipides, de glucides complexe, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaires [44].

Les mécanismes physiopathologiques de formation et d'évolution de l'athérosclérose et par conséquent l'athéromatose sont liés aux facteurs de risque de cette pathologie (tabagisme, alcools, hypertension, hypercholestérolémie, diabète, ...) pour lesquels le stress oxydant est retrouvé, à des degrés divers, comme composant des événements cellulaires et moléculaires délétères pour le tissu vasculaire [47] [46] [21].

L'implication du stress oxydant dans l'athérosclérose a été initialement révélée par l'oxydation des lipoprotéines de basse densité LDL (low density lipoproteins) qui sont les carrières principales du cholestérol dans le plasma [44] [48]. L'oxydation de ces lipoprotéines représente l'étape initiale dans le processus de l'athérogenèse qui génère de nombreuses modifications à la fois des lipides et de la copule protéique (apolipoprotéine B) de la lipoprotéine [44] [47]. La première étape de l'athérogenèse donc est la pénétration des LDL_s dans l'intima du sous endothélium (première couche de la paroi vasculaire en contact avec le sang) et leurs liaison avec les protéoglycanes de la matrice extracellulaire facilite leurs rétention au sein de cette structure cellulaire, où elles sont soumises aux modifications oxydatives par les espèces réactives [21]. Lors de la deuxième étape, les LDL oxydées sont captées rapidement par les macrophages de la paroi artérielle qui deviennent donc des cellules riches en lipides nommées cellules spumeuses [17] [21]. Les LDL_s oxydées ont des récepteurs aussi au niveau des cellules endothéliales qui stimulent l'expression des molécules d'adhésion ce qui conduit à l'activation de la réaction inflammatoire et le recrutement des cellules pro-inflammatoires vers l'intima des artères [44] [47]. Les cellules spumeuses et les leucocytes activées libèrent par la suite des 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) de la média (deuxième couche de la paroi vasculaire qui suite l'intima) vers l'intima [21] [49]. L'accumulation des CML avec les cellules spumeuses et le débris cellulaires et les lipides libérés par les cellules nécrotiques est à l'origine de l'épaississement de l'intima et la formation de la plaque athéromateuse [21] [47] [49], (**Figure 2**) qui souvent va continuer d'évoluer vers la plaque compliquée, l'augmentation de la taille du centre nécrotique ainsi que la rupture de la plaque induite par des métalloprotéases libérés par les macrophages [21]. La rupture de cette plaque cause une altération de la paroi artérielle ce qui conduit à un contact entre les éléments du sang et les structures sous endothéliales entraînant ainsi l'activation de la cascade d'hémostase (adhésion, agrégation plaquettaire et coagulation) et la formation d'une athérothrombose [49] (**Figure 2**).

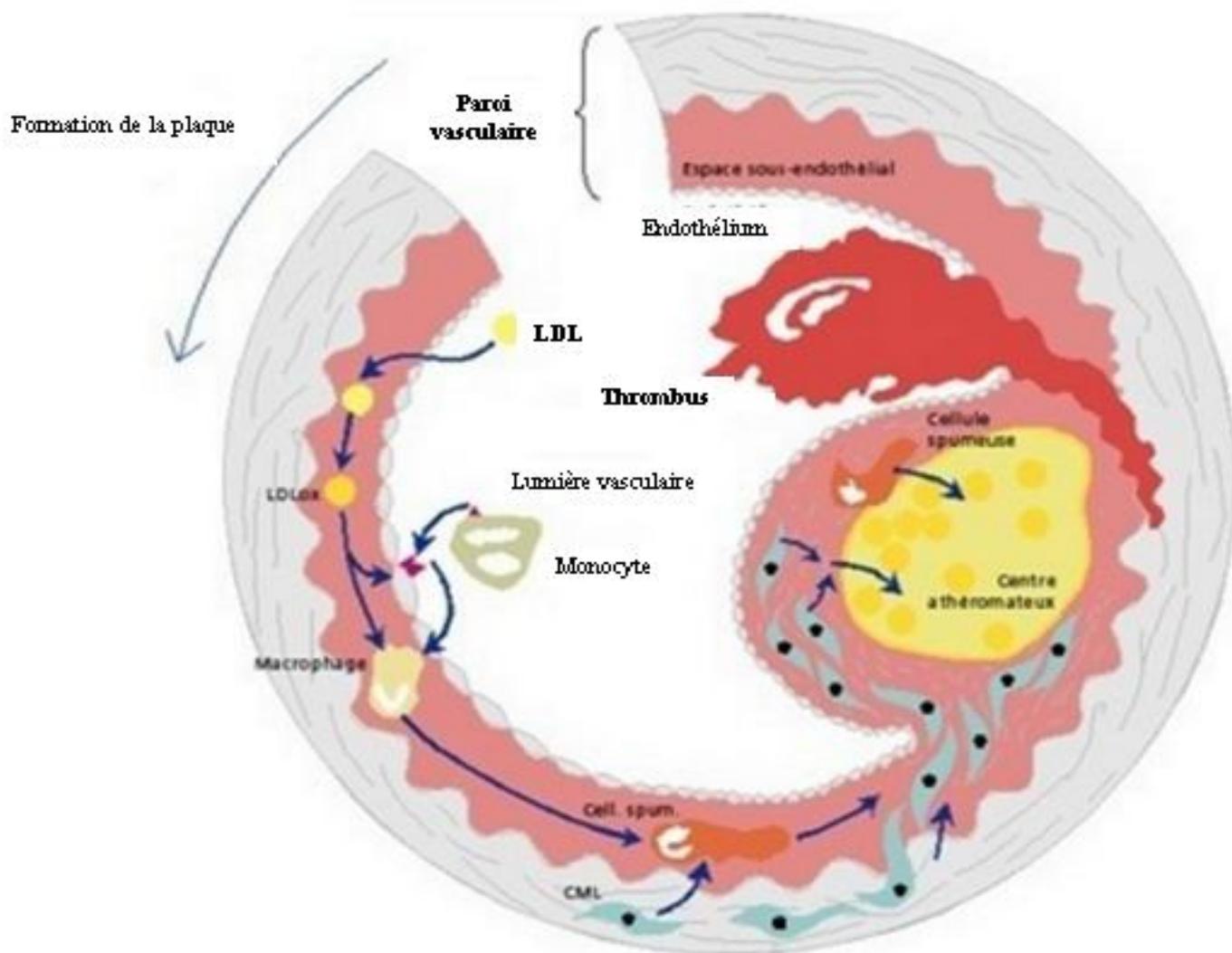


Figure 2 : Déroulement de l'athérosclérose et la formation de l'athérothrombose [50]

L'altération de la paroi artérielle liée à la rupture de la plaque athéromateuse permet l'adhésion des plaquettes aux structures sous endothéliales et leurs activation, entraînant l'expression des différents récepteurs et la libération des différents médiateurs tels que l'ADP, et le 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). Ce caillot plaquettaire est rapidement consolidé par un réseau de fibrine formé après l'activation de la cascade de la coagulation [51] [52] [53].

Ce thrombus formé (caillot fibrino-plaquettaire) est susceptible d'oblitérer la lumière artérielle provoquant alors des accidents ischémiques très dangereux [46] [49] tels que l'infarctus de myocarde, la mort du cœur soudaine, l'accident vasculaire cérébral, l'ischémie aiguë des membres inférieurs (perte de fonction), la gangrène des extrémités, la claudication intermittente...etc. [45] [1] [54].

II-2) Les thromboses veineuses

La thrombose veineuse est la pathologie vasculaire la plus fréquente après l'infarctus de myocarde et l'accident vasculaire cérébral [42] [55]. Cette thrombose est un thrombus rouge constitué principalement d'un réseau de fibrine et de globules rouges avec un peu de plaquettes [55] [56]. La thrombose veineuse est représentée par deux événements cliniques réunis sous le terme de maladie veineuse thromboembolique, la thrombose veineuse profonde et l'embolie pulmonaire [42] [55].

La thrombose veineuse profonde ou la phlébite survient le plus souvent dans une veine des jambes, mais elle peut survenir sur presque toutes les veines de l'organisme (bras, cerveau, tube digestif, reins...etc.). Elle commence souvent dans les veines du mollet au niveau de petites valves ou valvules. le caillot une fois formé peut devenir important, allant jusqu'à boucher toute la longueur des veines d'une jambe [57] entraînant alors une douleur aiguë associée à un œdème (gonflement) et une augmentation de la chaleur du membre avec un aspect rouge de la peau [57] [58] (Figure 3) .

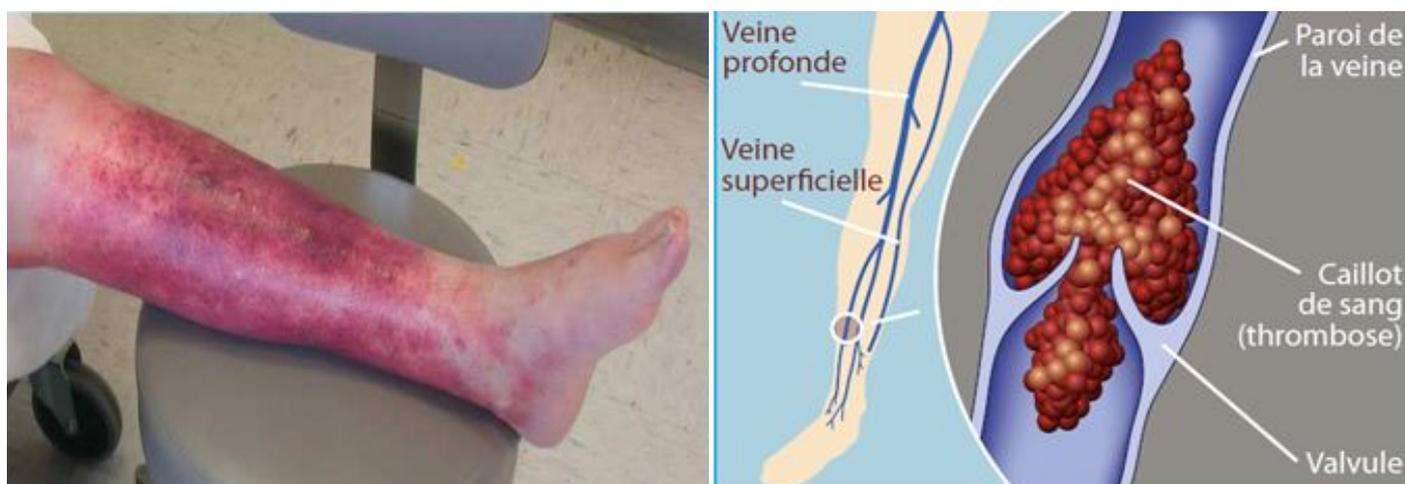


Figure 3: Formation d'une phlébite au niveau des veines de jambe [57]

Le caillot dans la veine de la jambe peut se détacher, remonter dans les veines jusqu'au cœur, le traverser et atteindre les artères au niveau du poumon conduisant alors à l'embolie pulmonaire qui fait toute la gravité des phlébites car si les caillots ayant migré dans les artères du poumon sont nombreux et volumineux peuvent bloquer la respiration et accélérer la fréquence respiratoire (dyspnée) et cardiaque (tachycardiaque) [57] [59].

II-2-1) Mécanisme physiopathologique

La survenue de la maladie veineuse thromboembolique est associée à différents facteurs de risque tels que l'immobilité, le cancer, l'hypercoagulabilité, la chirurgie, les traumatismes et la grossesse [43] [55] [56].

- L'immobilisation prolongée lors de l'activité professionnelle, le voyage lent, l'alitement et la paralysie des membres augmente la stase veineuse [58] qui concentre localement les facteurs d'activation d'hémostase (cytokine et médiateurs inflammatoires), favorise la margination et l'interaction des cellules circulantes avec l'endothélium et elle est responsable d'une hypoxie locale qui conduit à l'activation des cellules endothéliales qui exprime alors un facteur pro-coagulant qui est le facteur tissulaire [55] [56] [60].
- Le cancer est l'un des importants facteurs de risque des thromboses veineuses, il est impliqué dans cette pathologie *via* différents mécanismes. En effet, la masse de la tumeur formée peut créer une stase par compression et invasion des vaisseaux et favoriser la libération du facteur tissulaire par les organes affectés pendant l'expansion et la métastase. Certaines drogues anticancéreuses peuvent provoquer des dommages au niveau des cellules endothéliales et augmenter l'expression de facteur tissulaire par les monocytes et les macrophages induisant une réponse pro-coagulante par les cellules hôtes. La radio ou la chimiothérapie provoque une hépatotoxicité qui peut causer une réduction dans le taux des anticoagulants physiologiques (antithrombine III, protéine C et protéine S) [55] [56] [60].
- L'hypercoagulabilité liée à des déficits congénitaux des inhibiteurs physiologiques de la coagulation comme l'antithrombin III, la protéine C et la protéine S sont très rares mais sont des facteurs de risque très forts pour les thromboses veineuses. Des mutations au niveau de deux facteurs de coagulation, la mutation G1691A dans le facteur V (Leiden) qui le rend résistant à l'inactivation par la protéine C et la mutation G20210A dans la prothrombine (II) sont aussi responsables de l'hypercoagulabilité du sang [55].

Ces déficits congénitaux et ces deux mutations peuvent être aussi impliqués dans la thrombose artérielle mais avec des degrés plus faibles par rapport à la thrombose veineuse [55] [56].

- La chirurgie particulièrement, du cancer, de l'obésité et la chirurgie orthopédique sont thrombogènes car elles s'accompagnent le plus souvent par une immobilisation allongée et donc une stase veineuse. d'autre part le geste chirurgicale lui même peut favoriser des thromboses veineuse car les tissus agressés par la chirurgie libèrent des substances défensives (inflammatoire) qui interfèrent avec la coagulation et donc facilite la constitution d'une thrombose.
- Les traumatismes tel que la fracture de la jambe, le traumatisme de la hanche, entorse grave du genou constituent aussi des facteurs de risque important pour la formation de la thrombose veineuse [59].
- La grossesse est caractérisée par l'augmentation de la concentration des facteurs procoagulants, la diminution de la concentration de certains anticoagulants physiologiques, et la diminution de l'activité fibrinolytique. Ces changements hémostatiques ont pour objectif de maintenir la fonction du placenta pendant la grossesse et diminuer la perte du sang lors d'accouchement augmente le risque de la thrombose veineuse [55].

Tous ces facteurs de risque de thrombose veineuse induisent donc l'activation de la coagulation, une cascade des réactions enzymatiques qui aboutissent à la formation d'un réseau protéique de fibrine insoluble capable d'oblitérer la lumière vasculaire.

Dans les conditions physiologiques normales, la coagulation est activée lors d'une brèche vasculaire, pour consolider l'agrégat plaquettaire a fin de colmater la brèche et arrêter le saignement du sang [61] [62]. La formation de ce caillot fibrineux est réalisée par deux voies, la voie endogène ou intrinsèque et la voie exogène ou extrinsèque, toutes deux aboutissant à l'activation du facteur X, une étape commune aboutit ensuite à la formation de thrombine, une sérine protéase qui catalyse la transformation de fibrinogène en fibrine insoluble [52] (**Figure 4**). Les deux voies impliquant 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. Ces systèmes enzymatiques sont régulés par des coenzymes ou catalyseurs, des réactions de control rétro-actif positives ou négatives et des inhibiteurs physiologiques (antithrombin III, protéine C et protéine S) [63].

- **La voie endogène**, dans la quelle tous les éléments nécessaire de la coagulation sont présents dans le plasma sans apport extérieur. Cette voie est déclenchée par l'activation du facteur XII (Hageman) lors de ce contact aux structures électro-négatives de la matrice sous-endothéliale (collagène, sulfatides, glycosaminoglycanes) [64] [65], une activation qui conduit par la suite à l'activation de pré-kallikréine en kalikriène qui à son tour peut activer le F XII. Le F XII activé catalyse la transformation de la forme zymogène du facteur XI à la forme protéolytique activée qui active par la suite le facteur IX [65]. Ce dernier se lie à la surface de phospholipides anioniques des plaquettes (F3P) par l'intermédiaire des ions calcium et forme, en présence de son co-facteur, le facteur VIII le complexe tenase qui est responsable de l'activation du facteur X (le facteur Stuart). Ce dernier forme avec son cofacteur, le facteur V (pro-accéléline), les phospholipides plaquettaires et par l'intermédiaire aussi des ions de calcium le complexe prothrombinase qui catalyse la transformation de prothrombine (facteur II) en thrombine [61] [66] (Figure 4).

- **La voie exogène** est la voie la plus simple et la plus rapide que la voie endogène, elle fait intervenir un nombre limité de facteurs [66]. Cette voie est activée par un facteur non plasmatique qui est le facteur tissulaire, une glycoprotéine membranaire exprimée sur la surface des cellules endothéliales et les cellules de la matrice sou-endothéliale [61] [65]. Lors d'une brèche vasculaire, le facteur tissulaire devient en contact avec le plasma ce qui permet l'interaction avec le facteur VII (pro-convertine) pour former un complexe enzymatique réactif (Facteur tissulaire-FVII) .Ce complexe est responsable de l'activation de facteur X et aussi de facteur IX et par conséquence de prothrombine en thrombine [61] [53]. La thrombine formée par les deux voies catalyse la conversion de fibrinogène en monomères de fibrine qui s'associent les unes aux autres grâce à des liaisons hydrogène pour former un réseau fibrineux instable, où le facteur XIIIa (le facteur stabilisateur de fibrine) préalablement activé par la thrombine intervient pour la solidification du caillot fibrineux par l'établissement de liaisons covalentes entre les différentes molécules de fibrine [61] [62] (Figure 4).

Le traitement fibrinolytique (streptokinase, urokinase, activateur tissulaire de plasminogène...) a pour but de lyser le thrombus artériel ou veineux et il est associé le plus souvent à un traitement antiagrégant et anticoagulant [67] [68].

Les anticoagulants représentent le traitement principal de la maladie veineuse thromboembolique. De nombreux anticoagulants agissant à différents niveaux de la cascade de la coagulation sont utilisés et ils sont regroupés en trois classes, deux classes des anticoagulants classiques (les héparines et les anti vitamines K) et la classe des nouveaux anticoagulants [69] [70].

-Les héparines

Il existe deux types des héparines utilisables et administrées par voie intraveineuse ou sous cutanée, l'héparine non fractionnée (HNF) et les héparines de bas poids moléculaire (HBMP) [69] [70]. L'héparine non fractionnée est composée d'un mélange hétérogène de chaînes polysaccharidiques sulfatées de taille et de structures différentes extraites de la muqueuse intestinale de porc. Le poids moléculaire varie de 5000 à 35000 daltons alors que les héparines de bas poids moléculaire sont issues de la dépolymérisation des chaînes polysaccharidiques de l'HNF par des procédés chimiques ou enzymatiques, leurs poids moléculaire varient de 3000 à 5000 daltons. L'HNF et les HBPM forment un complexe avec l'anticoagulant physiologique l'antithrombin III potentialisant son effet sur l'inactivation de divers facteurs de coagulation. Le complexe HNF-antithrombin III inactive le plus notamment les facteurs Xa et la thrombine (facteur IIa), mais à un moindre degré les facteurs IXa, XIa et XIIa, alors que le complexe HBPM-antithrombinIII inhibe particulièrement le facteur Xa et à moindre degré la thrombine [70].

-Les anti vitamines K

La vitamine K est un élément nécessaire dans la synthèse au niveau du foie de quatre facteurs de la coagulation, la prothrombine II, la proconvertine VII, le facteur stuart X, et le facteur antihémophilique B (le facteur IX). Elle intervient dans la carboxylation des molécules d'acide glutamique de l'extrémité -N- terminale de la chaîne glycoprotéinique de chacun de ces facteurs. Cette carboxylation est nécessaire pour l'activité biologique et la fixation de ces facteurs sur les surfaces phospholipidiques plaquettaires, et elle nécessite la présence de la forme réduite de vitamine KH_2 .

Ce dernier est transformé après la γ -carboxylation en époxyde de vitamine K qui est régénérée *via* la vitamine K époxyde réductase pour être utilisée dans une autre réaction de carboxylation. Les anti-vitamines K exercent leurs effets anticoagulants en inhibant le recyclage de vitamine K, ce qui conduit à la perte de l'activité enzymatique des facteurs vitamines K dépendants et par conséquent la ralentie de la vitesse de la coagulation [70] [71]. Les anti-vitamines K sont administrées par voie orale et actuellement plusieurs types des anti-vitamines K sont utilisés comme la warfarin, phenindione, acenocoumarol et phenprocoumon [70].

-Les nouveaux anticoagulants

Des nouveaux anticoagulants sont actuellement utilisés à coté des anticoagulants classiques. Ces anticoagulants sont subdivisés selon leur mode d'action en deux catégories,

les inhibiteurs indirects qui agissent en potentialisant l'activité de l'antithrombine III, et parmi les quelles, la fondaparinux et l'idraparinux qui sont des inhibiteurs synthétiques indirects et sélectifs du facteur Xa et ils sont constitués de 5 unités saccharides capables de modifier la conformation en augmentant l'activité inhibitrice naturelle de l'antithrombine III sur le facteur Xa [72] [73].

Les inhibiteurs directs agissent directement sur le facteur Xa ou la thrombine, et parmi les quelles, le DX-9065a, l'hirudin, L'argatroban...etc. Le DX-9065a est un dérivé synthétique de l'acide propanoïque qui inhibe directement le facteur Xa libre et le facteur Xa lié dans le complexe prothrombinase [72] [73] alors que l'hirudin est un peptide de 65 acides aminés extrait de la glande salivaire d'une espèce de ver (*Hirudo medicinalis*) et il inhibe directement et de façon irréversible la thrombine [72]. L'argatroban est un dérivé synthétique d'acide carboxylique qui inhibe directement la thrombine [72].

III-Les huiles essentielles

Les huiles essentielles, les essences ou les huiles volatiles sont des substances naturelles volatiles, ont composition généralement assez complexe, caractérisées par une forte odeur et synthétisées par les plantes comme des métabolites secondaires [74] [75].

Elles représentent une petite fraction dans la composition chimique de la plante et sont responsables de l'odeur distinctive de la plante, et c'est pour cette raison que les plantes qui synthétisent les huiles essentielles sont connus sous le nom de « plantes aromatiques » [76].

Les huiles volatiles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux, les fleurs (Bergamotier, Tubéreuse), les feuilles (Citronnelle, Eucalyptus), les écorces (cannelier), les bois (bois de rose, santal), les racines (vétiver), les rhizomes (curcuma, gingembre), les fruits (Toute-épice, anis), et les graines (muscade, nigelle) [74] [75].

Elles sont liquides à température ambiante, d'un poids moléculaire faible, volatiles et entraînable à la vapeur d'eau ce qui les différencient des huiles fixes, incolores et rarement colorées et sont liposolubles et solubles dans les solvants organiques, leur densité est en générale inférieur à celle de l'eau [75].

III-1) Composition chimique

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de constituants, contiennent 20 à 60 composants avec des concentrations différentes, et elles sont caractérisées généralement par 2 ou 3 composants majoritaires représentent 20-70% d'huile essentielle totale, alors que les autres composés se trouve sous forme des traces [74].

Les constituants des huiles essentielles appartiennent de façon quasi exclusive à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes, le groupe des terpènes d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés de phenyl propane beaucoup moins fréquents d'autre part [75] (Figure 5).

III-1-1) Les terpènes

Les terpènes sont les composants les plus abondants dans les huiles essentielles et sont subdivisés en deux classes, les mono et les sesquiterpènes.

Les monoterpènes représentent la classe la plus simple de la série des terpènes (à l'exception des hémi terpènes qui sont très rares), ils contiennent 10 atomes de carbones résultants du couplage tête à queue de deux unités d'isoprène de 5 atomes de carbones.

Ils constituent un pourcentage important dans la composition des huiles essentielles (80 à 98 % d'huiles essentielle totale) par rapport aux sesquiterpènes. Sur le plan structural les monoterpènes peuvent être: acyclique comme le myrcène et ocimène, monocyclique comme le P-cymène et α terpinène, ou bicyclique comme le pinène, camphène et sabinène. Ils peuvent être aussi fonctionnalisés tel que les alcools (géraniol, linalol, citronellole, menthol, fenchol...), les aldéhydes (géralial, néral), les cétones (tagétone, menthone, carvone), les esters (acétate de citronellyle, acétate de méthyl, acétate d' α -terpinyl), les peroxydes (ascaridole), et les phénols (thymol et carvacrol) [75] (Figure 5).

Les sesquiterpènes sont composés de 15 atomes de carbones et issus de l'assemblage de 3 unités isopréniques. Ils ont aussi diverses structures, des carbures mono ou polycycliques (B-bisabolène, B-caryophyllène et longifolène), des alcools (farnésol, carotol, B-santalol, et patchoulol), des cétones (nootkatone, cis-longipinane-2,7-dione, et B-vétivone), des aldéhydes (sinensal) et des esters (acétate de cédryle) [75] (Figure 5).

III-1-2) Les composés aromatiques

Les composés aromatiques sont des dérivés de phényl propane ($C_6- C_3$), et sont beaucoup moins fréquents que les terpènes. Ils peuvent être des aldéhydes comme le cinnamaldehyde, des alcools comme cinnamique alcool, des phénols comme chavicol, et eugenol, des dérivés de méthoxy comme l'anethol elemicine et estragole et des dérivés de dioxyméthylène comme l'apiole, myristicine, et safrole [74] (Figure 5).

Les huiles essentielles peuvent être également renfermées d'autres constituants qui ne sont pas des terpènes ou des dérivés de phényl propane, comme les composés issus de la dégradation d'acides gras (3Z-hexène-1-ol, 2E-hexanals) et de terpènes (les ionones, et les irones), et les composés azotés et soufrés qui résultent du clivage d'acides aminés ou de ces précurseurs (indole) [75] [77] [78].

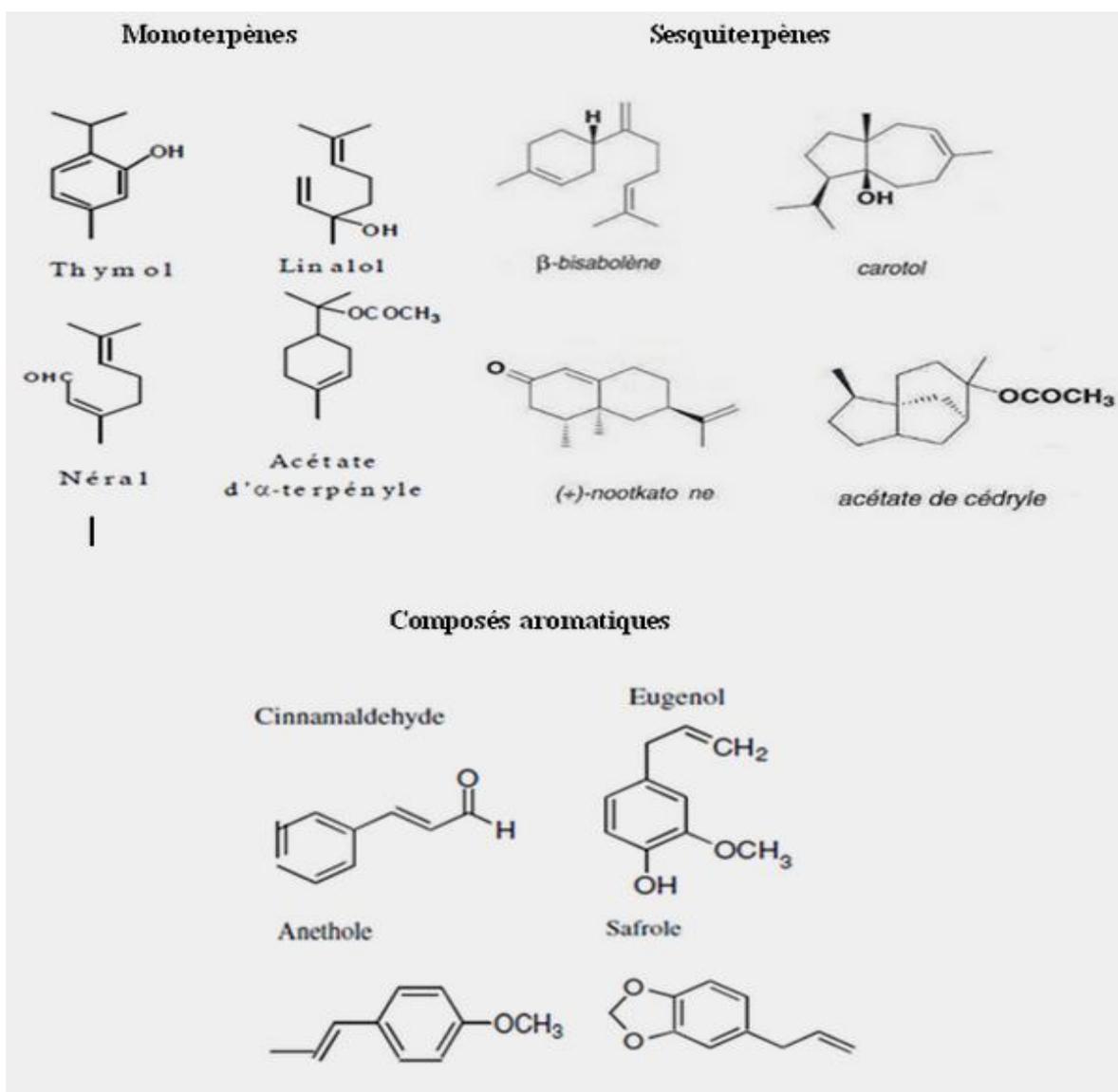


Figure 5 : Structure de quelques composés rencontrés dans les huiles essentielles [75]

III-2) Biosynthèse et rôle biologique

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées (poils sécréteurs, poches sécrétrices, canaux sécréteurs, et trichomes glandulaires) localisées sur ou à proximité de la surface de la plante [75] [77].

Les composés terpéniques constituent une famille de composés largement répandue dans le règne végétal et les principaux constituants des huiles essentielles. Ils sont synthétisés à partir d'un précurseur unique appelé l'isopentenyl pyrophosphate (**IPP**) (C_5H_8) [79]. Cette unité isoprénique à 5 atomes de carbone peut être synthétisée dans le cytoplasme *via* la voie du

mévalonate ou dans les plastides *via* la voie non mévalonique (la voie de déoxy xylulose phosphate) [79] [80] [81].

La voie du mévalonate consiste en la condensation de deux molécules d'acetyl CoA pour former l'acetoacetyl CoA qui se transforme après une chaîne des réactions enzymatiques et consommatrices d'énergie en mévalonate 5-diphosphate, puis une réaction de décarboxylation permet de transformer ce dernier en IPP [79] [80].

Alors que pour la voie non mévalonique, la condensation tête à tête de glyceraldehyde3-phosphate avec le pyruvate conduit à la formation de 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate (DOXP) qui subit à une chaîne des réactions enzymatiques aboutissent par la suite à la formation de 1-hydroxy-2-methyl-2(E) butenyl-4PP (HMBPP), qui sous l'action de HMBPP réductase se transforme en IPP [80] [81].

Après la synthèse de l'unité isoprénique, des réactions de condensation tête à queue d'un nombre variable d'unités isopréniques aboutissent à formation des différentes classes terpéniques ; des monoterpènes C₁₀ (issus de la condensation de 2 unités isoprénique), des sesquiterpènes C₁₅ (3 unités isoprénique), des diterpènes C₂₀ (4 unités isoprénique) et des triterpènes C₃₀ (6 unités isoprénique) [79] [80].

Pour chaque classe de terpène, des différentes réactions chimiques, cyclisation fonctionnalisation, réarrangement...etc, permettent de former diverses structures terpéniques à partir d'un précurseur unique [75].

Des différents rôles biologiques sont reconnues aux huiles essentielles, et généralement, - les huiles essentielles jouent un rôle important dans la protection de la plante, puisque elles agissent comme antibactériennes, antifongiques, antivirales et insecticides [74].

-Elles protègent aussi la plante contre les herbivores par son odeur défavorable et inhibitrice de l'appétit de l'animal à cette plante [74].

-Elles réduisent la compétition des autres espèces des plantes par l'inhibition de la germination (agents allélopatiques) [75] [82].

- Les huiles essentielles jouent aussi un rôle important dans l'attraction des pollinisateurs spécifiques (insectes, oiseaux...) qui participent dans la dispersion du pollen et des graines ce qui favorise la reproduction [74] [75] [78].

Elles protègent la plante contre le stress photo-oxydatif et participent aussi dans la croissance et le développement de la plante (des phytohormones comme le gibberelline) [83].

III-3) Procédés d'extraction

Plusieurs techniques sont utilisées pour l'extraction des huiles essentielles parmi les quelles :

L'hydrodistillation, la méthode la plus simple et plus anciennement utilisée [84] qui consiste à immerger le matériel végétale directement dans un récipient rempli d'eau placé sur une source de chaleur. L'ébullition de l'eau entraîne alors les huiles essentielles qui au contact d'un réfrigérant elles se condensent, et se récupèrent sous forme d'une émulsion (eau + huile essentielle) et se séparent par la suite de l'eau par simple différence de densité [75].

L'extraction au CO₂ supercritique qui est une technique récente, consiste à utiliser le CO₂ à pression élevée et à basses températures pour l'obtention des huiles essentielles. Dans ces conditions le CO₂ se trouve à l'état supercritique, il n'est ni liquide, ni gazeux et cela lui confère une bonne diffusibilité dans les solides et un bon pouvoir solvants [75].

L'extraction par micro-ondes est une technique aussi récente, consiste à chauffer la matière végétale placée dans une enceinte close par un rayonnement micro-ondes. Le chauffage de la plante permet la libération des huiles essentielles qui sont entraînées par la vapeur d'eau produite par la matière végétale. Un système de refroidissement à l'extérieur permet la condensation de distillat composé d'eau et d'huile essentielle facilement séparable par simple décantation [75] [85].

III-4) Propriétés pharmacologiques et toxicologiques

Les effets bénéfiques des composés volatiles des huiles essentielles sont utilisés depuis fort long temps par les anciennes civilisations, pas seulement comme des arômes et des conservateurs alimentaires mais aussi pour prévenir et soigner les pathologies courantes [86]. Actuellement de nombreuses études ont démontré que les huiles essentielles exercent des différentes activités biologiques et pharmacologiques, parmi les quelles

L'activité antioxydante, où des différents tests ont confirmé que ces métabolites possèdent des propriétés antioxydantes. L'étude de Sacchetti et al a montré que 11 huiles essentielles de diverses origines exercent une excellente activité antioxydante dans les systèmes du DPPH[•] et de β-carotène/acide linoléique, et que l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* a un pouvoir antioxydant élevé en comparaison à des antioxydants synthétiques BHA et trolox [87]. D'autre part une étude récente a confirmé que l'huile essentielle de *Satureja cilicica* a un grand pouvoir de neutralisation du radical DPPH[•] et de conservation du beurre contre la peroxydation lipidique [88]. Les huiles essentielles de *Origanum vulgare* de *Satureja montana* et de leurs composés majoritaires, thymol et carvacrol inhibent, *in vitro*

la formation de 3-nitrotyrosine et du malonate dialdehyde marqueurs du stress oxydatif induit par le peroxy-nitrite (ONOO⁻) [89].

L'effet anti-inflammatoire des huiles essentielles a été également étudié. En effet les huiles essentielles de *Carlina acanthifolia*, *Citrus aurantium*, *Cyperus esculentus* et *Hedychium coronarium* ont exprimé un effet anti-oedème des pattes chez les rats traités par la carageenan [90] [91], et d'autre part les huiles essentielles de *Salvia albicaulis*, et *Salvia dolomitica* ont montré un grand pouvoir inhibiteur, *in vitro*, à 5-lipo-oxygénase, enzyme clé dans l'activation et l'amplification de la réaction inflammatoire [92].

Des activités anticancéreuses des huiles essentielles ont été établies sur différentes cellules tumorales, ainsi il a été démontré que l'huile essentielle de *Myrica gale* exerce un effet inhibiteur sur la croissance des cellules cancéreuses des poumons (Carcinoma A 549), et du colon (adenocarcinoma DLD-1-) [93]. Dans la même optique l'huile essentielle de *Cymbopogon flexuosus* et son composé majeur « isointermedeol » induisent l'apoptose des cellules cancéreuses du sang (leukemia HL 60) [94].

En plus de ces activités précédemment cités, les huiles essentielles possèdent aussi des propriétés antimicrobiennes vis-à-vis des différents micro-organismes. L'huile essentielle de *Thymus vulgaris*, a montré une grande efficacité vis-à-vis de 8 champignons contaminants les aliments [95] et d'autre part les huiles essentielles de *Foeniculum vulgare*, de *Mentha piperita*, et de *Thymus vulgaris* exercent une excellente activité vis-à-vis des bactéries à gram(+) et à gram (-), des levures, des champignons et des virus [96]. Par ailleurs les huiles essentielles de Garlic, cinnamon, marjoram et thyme possèdent un grand pouvoir antimicrobien vis-à-vis de 4 bactéries pathogènes, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* [97].

Sur le plan toxicologique, les huiles essentielles ont une toxicité aiguë par voie orale faible ou très faible la majorité de celles qui sont couramment utilisées ont une DL₅₀ comprise entre 2 et 5g/kg (Anis, eucalyptus, girofle...etc), ou ce qui est le plus fréquent supérieure à 5g/kg (camomille, citronnelle, lavande, vétiver...etc) [75]. Les huiles essentielles qui sont utilisées en parfumerie peuvent se comporter en irritant des muqueuses respiratoires et favoriser le déclenchement des crises d'asthme pour les asthmatiques [75]. Certaines huiles essentielles peuvent provoquer des réactions allergiques sur la peau comme les huiles essentielles de la menthe, la listée, la mélisse, et le pin [75]. D'autre part l'exposition de certaines huiles comme de *Citrus bergamia* aux rayons ultraviolets ou aux rayons du soleil peut induire le cancer de la peau [74].

IV- La plante *Nigella sativa*. L

IV-1) Description de la plante

Nigelle sativa L, communément appelée nigelle cultivée est une plante herbacée, annuelle qui appartient à la famille « ranunculaceae », elle est connue sous différents noms "Cumin noir" en français "Black cumin" en anglais, "Kalonji" en Asie (Pakistan, Inde, Afghanistan) et "Sanoudj", "habbet es souda" et "habbet el baraka" dans presque tout les pays arabe [98] [99]. Elle est originaire d'Asie mineure, mais elle est cultivée dans presque toute l'Asie, la région méditerranéenne [100] et aussi le sud de l'Europe [101].

Cette plante est caractérisée par sa tige dressée, ramifiée de 30 à 40cm d'hauteur, ses feuilles multifides, les inférieures pétiolées et les supérieures sessiles. Les fleurs sont petites de 2,5cm de diamètre avec pétales ordinairement d'un blanc bleuté et sépales ovales acuminées au sommet. Les fruits murs sont des capsules constituées de follicules soudés s'ouvrant par une fente interne, renfermant de nombreuses graines noires, oblongues, anguleuse et de 3mm de long granuleuse [98] (Figure 6).



Figure 6: Aspect morphologique de la plante *Nigella sativa*.L

Les graines de la nigelle occupent une place spéciale dans le monde de la médecine traditionnelle à cause de sa popularité et ses applications très large , elles sont utilisées comme additifs dans plusieurs plats, les pâtes, les fromages, le riz, le yaourt, les vinaigres, les salades, le thé, le café, et sont consommées extensivement comme un épice [3]. D'autre part, ces graines sont employées aussi traditionnellement pour le traitement et la prévention de nombreuses maladies comme les troubles gastro-intestinales (la diarrhée, la constipation), l'inflammation, l'asthme, l'hypertension, le diabète, les brûlures, la fièvre et les infections [3] [101]. Au regard de ces applications très larges, les graines de la nigelle ont fait l'objet de diverses études dans le but de déterminer sa composition chimique en corrélation avec les activités pharmacologiques qui justifient son usage thérapeutique traditionnel [3].

IV-2) Phytochimie de la graine

Les travaux concernant la composition chimique des graines de la nigelle ont révélé la richesse de ces graines en plusieurs constituants tant de métabolites secondaires que primaires, dont la teneur varie selon les conditions géographiques et climatiques, ainsi que les méthodes d'extraction et de caractérisation pratiquées [102] [103].

L'huile fixe varie de 24 à 39,2% du poids de la graine [102] [104], et constituée de 3 classes lipidiques, lipides neutres, glycolipides et phospholipides. Les lipides neutres représentent 96-97 % d'huile fixe totale dont les triglycérides sont les plus abondants suivis d'acides gras et des stérols, alors que les glycolipides sont retrouvés avec une teneur de 2,59 % des lipides totaux, et le digalactosyl glycérol et le glucocérobroside sont les composés majoritaires de cette classe. Pour les phospholipides la phosphatidyl choline est le composé majeur suivi de la phosphatidyl éthanol amine et la phosphatidyl sérine [104] [105] [106].

L'huile essentielle varie de 0,18 à 1,7% du poids total, elle contient 32 à 48 composants [107] [108] dont la thymoquinone est le composant majeur (30-48%) suivi par le P-cymène, le carvacrol, le 4-terpèneol et le trans anethole respectivement [107]. Par contre une étude concernant la nigelle Algérienne a montré que le P-cymène est le composé dominant (53,83%) suivi par la thymoquinone et l' α -thujène [109].

Les protéines et les carbohydrates représentent 20 à 26% et 32 à 40% du poids total respectivement [102] [110]. L'analyse par HPLC d'extrait acétique de la graine a révélé la présence de plusieurs peptides et protéines dont le poids moléculaire varie de 5660 et 9602 DA [111], avec une composition en différents acides aminés, lysine, leucine isoleucine, valine, glycine, alanine, phénylalanine, cystéine, acide glutamique , acide aspartique, proline, sérine, thréonine, tryptophane et tyrosine [3].

L'humidité est entre 6,4 à 8,65 % du poids total, et les études ont montré la richesse qualitative de la graine en sels minéraux dont les quels le potassium, le calcium, le magnésium sont les plus abondants (783, 572, 253 mg/kg du poids sèche de la graine respectivement). Le phosphore, le sodium, le fer, le cuivre le zinc et le manganèse sont aussi détectés et avec des proportions différentes [103] [110].

Une étude concernant la composition de la graine en vitamines a révélé que tous les types de vitamines E (α , β , δ , γ tocophérols) sont détectés dans l'huile fixe de la graine, le α et le γ tocophérols sont les tocophérols majoritaires représentant 284 et 225 $\mu\text{g/g}$ d'huile fixe respectivement. La provitamine A (B-carotène) et la vitamine K₁ (phyloquinone) sont aussi trouvées avec des proportions importantes (0,05 et 0,1% d'huile fixe totale) [112].

A coté des composants cités précédemment, d'autres constituants sont aussi détectés dans les graines de la nigelle comme les polyphénols qui sont retrouvés avec des quantités considérables 27,8 mg équivalent d'acide gallique/g d'extrait [113], et des alcaloïdes comme les nigellamines A₃, A₄, A₅, et la nigellamine C [114].

IV-3) Propriétés pharmacologiques de la graine

Les applications thérapeutiques traditionnelles très vastes des graines de la nigelle ont poussé de nombreux travaux pour étudier les différentes activités biologiques des différents extraits de la graine sur divers systèmes *in vitro* et *in vivo* à fin de confirmer ses propriétés curatives.

Concernant le pouvoir antioxydant, des différents extraits de la graine ont montré des propriétés antioxydantes dans des différents systèmes. *In vitro* l'huile essentielle de la graine et de ses composés (thymoquinone, carvacrol et trans-anéthol) ont un grand pouvoir de réduire le radical DPPH[•], et d'inhiber la peroxydation lipidique et la dégradation de déoxyribose par le radical hydroxyle [107]. L'extrait méthanolique et ses fractions (hexane, acétate d'éthyle, et la fraction aqueuse) ont montré aussi un pouvoir antioxydant considérable vis-à-vis du DPPH[•], et dans le système de β -carotène /acide linoléique [113]. D'autre part, il a été établi que l'huile fixe brute et ses fractions chromatographiques (Phospholipides, glycolipides et lipides neutres) sont capables de piéger les radicaux libres DPPH[•] et galvinoxyl dans un ordre décroissant respectivement [115]. *In vivo* l'huile essentielle et la thymoquinone exercent des effets antioxydants protecteurs contre les lésions induites par l'ischémie /reperfusion, la toxicité de l'éthanol sur l'estomac, et aussi la toxicité de CCL₄ sur le foie et les globules rouges chez les rats [116-119].

Les effets des graines de *Nigella sativa* sur certaines complications du diabète expérimental induit chez les rats ont fait aussi l'objectif de nombreux travaux. Ainsi, il a été rapporté que l'huile essentielle administrée par voie intrapéritonéale (A raison de 50mg/kg) abaisse de façon significative la glycémie chez les animaux normo et hyper glycémique [120]. La thymoquinone exerce aussi un effet antidiabétique via l'inhibition de la synthèse de monoxyde d'azote chez les rats rendus diabétique par le streptozotocine qui provoque la dégénération et la nécrose des cellules B du pancréas [121], et elle inhibe la gluconéogenèse hépatique qui participe aussi dans l'hyperglycémie chez les diabétiques [122]. D'autre part l'extrait aqueux de la graine exerce un effet antidiabétique via l'inhibition de l'absorption intestinale du glucose [123].

L'activité anti inflammatoire de la nigelle a été également étudiée. En effet l'administration de l'huile fixe et la thymoquinone par voie intra-péritonéale chez les rats et les souris respectivement avant le traitement par l'ovalbumine par voie nasale pour induire une allergie pulmonaire, inhibe de façon significative la réaction inflammatoire via l'inhibition de la production des cytokines et l'infiltration des cellules pro-inflammatoires vers le tissu pulmonaire [124] [125]. D'autre part l'étude de Mansour et al [126] a établi que la thymoquinone est capable d'inhiber le 5-lipoxygénase, et le leucotriène C₄ synthase, des enzymes responsables de la synthèse des médiateurs pro-inflammatoires. Par ailleurs, Les polyphénols de la graine exercent un effet anti-inflammatoire via l'inhibition de l'œdème des pâtes induit par le carageenan chez les rats [127].

Des activités antitumorales des extraits ou des composés purs issus des graines de la nigelle ont été aussi mis en évidence. L'huile essentielle présente une importante activité anti proliférative sur le cancer du colon induit chez les rats par le 1,2 dimethyl-hydrazine [128]. Par ailleurs, une étude *in vitro* a révélé que l'huile essentielle, l'extrait d'acétate d'éthyle, et l'extrait du butanol exercent un effet cytotoxique vis à vis de plusieurs cellules cancéreuses [129]. L'extrait chloroformique, l'extrait méthanolique et l'extrait d'hexane provoquent l'apoptose des cellules cancéreuses d'utérus et avec des IC₅₀ très faibles 0,41-2,28 et 2,2ng/ml respectivement [130]. En effet la thymoquinone et la thymohydroquinone ont montré *in vitro* et *in vivo* une importante action cytotoxique sur deux lignées de cellules tumorales humaines (Fibrosarcoma, et Squamous cell carcinoma) [131].

L'activité antimicrobienne constitue un autre volé des activités reconnues à la nigelle et à ses différents extraits et constituants. En effet, il a été rapporté que l'huile fixe possède un grand pouvoir inhibiteur supérieur à celui de gentamicine sur vingtaine de souches de

Listeria monocytogene [132]. D'autre part l'huile essentielle et la thymoquinone présentent une importante action vis-à-vis des bactéries à Gram+ et des levures [133]. Par ailleurs, l'extrait à l'éther et la thymoquinone exercent une activité inhibitrice sur huit espèces de dermatophytes [134].

A coté de ces activités pharmacologiques décrites précédemment, de nombreuses études ont rapporté d'autres effets pharmacologiques des graines de la nigelle sur divers systèmes. La thymoquinone a montré une activité anti hypertensive chez les rats rendus hypertensifs par le L-NAME (N- nitro-L- arginine methyl esters) [135], l'huile essentielle, l' α -pinène et le P-cymene diminuent la pression artérielle et le nombre des battements du cœur chez les rats [136]. D'autre part les graines et leurs huiles fixes ont des propriétés hypocholestérolémique et antiathérogène [137]. Sur le système reproductif, l'extrait aqueux de la graine stimule la spermatogenèse chez les males des rats [138] alors que pour le système respiratoire, l'extrait aqueux exerce un effet antitussive chez les porcs traités par l'acide citrique [139], et d'autre part les extraits méthanolique et dichlorométhanique exercent un important effet broncho-dilatateur [140].

Partie expérimentale

I-Matériels et méthodes

I-1) Matériels

I-1-1) Matériel végétal

Les graines de la nigelle utilisées dans cette étude ont été récoltées durant l'été de l'année 2009 par un herboriste de la région de « Magra » wilaya de « M'sila » qui est caractérisée par son climat sec et chaud dans cette saison.

Après collecte, les graines sont stockées à l'obscurité et à température ambiante jusqu'à l'utilisation.

I-1-2) Produits chimiques

Les solvants utilisés (éther de pétrole, éther diéthylique, hexane, méthanol, et DMSO) lors des différentes étapes d'extraction, caractérisation et évaluation des activités biologiques ont été fournis par Sigma, Aldrich, et Fluka.

Les constituants (standards) d'huile essentielle de la nigelle qui sont utilisés dans cette étude sont : le thymol (5-méthyl-2-isopropyl phénol), et l' α -pinène qui sont achetés du sigma et la thymoquinone (2-isopropyl-5-méthyl-p-benzoquinone), le carvacrol, le carvone et le p-cymène qui sont achetés d'Aldrich.

Le DPPH (2,2-diphényl-1-picryl hydrazyl), le β -carotène et le trichlorure d'acide acétique proviennent de Fluka. L'acide linoléique est obtenue de Sigma, alors que le tween20, le FeCl_3 et le potassium ferricyanide [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] sont achetés d'Aldrich.

Les produits utilisés pour les tests de la coagulation sont les kits du TCK et du TQ qui proviennent de Biolabo (France), le CaCl_2 qui est acheté de Sigma-Aldrich et l'Héparine lithium Salt (178 USP unité/mg) qui provient de Sigma.

I-2) Méthodes

I-2-1) Extraction des huiles essentielles des graines de la nigelle

L'extraction des huiles essentielles des graines de la nigelle a été effectuée selon la méthode décrite par Bucar et al [107], qui consiste à obtenir lors d'une première étape les huiles fixes à l'aide d'un solvant organique, des quelles les huiles essentielles sont extraite par hydrodistillation dans une seconde étape.

➤ Extraction des huiles fixes

Au préalable, les graines sont débarrassées des débris terreux et végétaux puis broyées à l'aide d'un broyeur électrique. Un poids donné (50 g) de ce broyat est disposé dans une cartouche cellulosique, puis la cartouche est introduite dans l'extracteur «soxhlet» équipé à sa base d'un ballon contenant 500 ml d'éther de pétrole. Le solvant est porté à ébullition à l'aide d'un chauffe ballon pendant 3 heures (**Figure7**).



Figure 7 : Extraction des huiles fixes par Soxhlet

Les huiles fixes contenues dans la phase organique sont récupérées après évaporation rotative à température de 40C° puis le rendement d'extraction est calculé par gravimétrie selon la formule suivante

$$\text{Teneur en huile fixe \% (p/p)} = \frac{\text{Poids d'huile fixe obtenue}}{\text{Poids des graines utilisées}} \times 100$$

➤ Hydrodistillation des huiles fixes

Les huiles essentielles des graines ont été obtenues par entraînement à la vapeur d'eau (hydrodistillation) d'huile fixe précédemment préparée. En parallèle et à titre de comparaison un extrait d'huile essentielle a été ainsi préparé de la même manière à partir d'une huile fixe commerciale obtenue par pression à froid (huile de graines de nigelle, El-Baraka, Bir Khadem Alger).

Pour cela, les huiles fixes (70 g) sont placées dans le ballon contenant le l'eau distillé, puis le ballon est porté à ébullition à l'aide d'un chauff ballon pendant 4 heures. Les huiles essentielles volatiles sont entraînée par un flux de vapeur d'eau qui après condensation sont récupérées sous forme d'une émulsion (eau + huile essentielle) avec un débit de 3-4 ml/min (**Figure 8**).



Figure 8 : Le système d'hydrodistillation

La récupération proprement dite des huiles essentielles est effectuée sur l'émulsion par solubilisation à l'aide de l'éther diéthylique.

La phase organique séparée de la phase aqueuse par décantation est récupérée puis débarrassée des traces d'eau en utilisant le sulfate de sodium anhydre. L'élimination du solvant organique par évaporation rotative sous vide et à température de 35C° permet d'obtenir l'extrait des huiles essentielles dont le rendement est déterminé par gravimétrie par rapport à l'huile fixe selon la relation ci-dessous

$$\text{Teneur en huile essentielle \% (p/p)} = \frac{\text{Poids d'huile essentielle obtenue}}{\text{Poids d'huile fixe traitée}} \times 100$$

Cette teneur peut être aussi exprimée en pourcentage (p/p) par rapport aux graines.

I-2-2) Caractérisation qualitative des huiles essentielles

◆ Principe

A fin d'identifier la nature chimique des constituants d'huile essentielle des graines de la nigelle, nous avons utilisé la chromatographie sur couches minces (CCM), une méthode analytique, rapide et simple qui permet de donner une appréciation globale sur les métabolites présents dans un extrait et de contrôler la pureté d'un composé.

Le phénomène séparatif dans cette chromatographie est basé sur l'adsorption, chaque composé de l'échantillon se déplace derrière le front du solvant selon sa vitesse qui dépend des forces de rétention de l'adsorbant (phase stationnaire) et d'une force d'entraînement exercée par une phase mobile [141].

◆ Procédure expérimentale

Dans un premier temps, des couches minces à base de silice d'une épaisseur de 0,25 mm ont été préparé par étalement de 5g de silice dans 10ml de l'eau sur une plaque de 20x20cm. Après activation des couches durant 10 minutes à 110C° et délimitation du front de migration (15 cm), les témoins et les échantillons sont déposés sous un faible volume (2- 4 µl). La chromatographie est alors développée dans une cuve de migration préalablement saturée par une phase mobile constituée de trois solvants, hexane:éther diéthylique : méthanol (40 :10 :1,5) (v/v) [142].

La visualisation des composés séparés des huiles essentielles est effectuée par révélation à l'aide de vapeur d'iode et par pulvérisation d'une solution d'anisaldéhyde /acide sulfurique (5 ml acide sulfurique- 0,5ml anisaldéhyde – 10 ml acide acétique et 85 ml méthanol) suivi d'un chauffage à 100C° pendant 10 minutes pour une visualisation rapide des spots [143].

La nature des composés constituant les huiles essentielles est déterminée par la comparaison des rapports frontaux (RF) des témoins avec les rapports frontaux des spots des échantillons.

$$\text{RF} = \frac{\text{La distance parcourue par le constituant}}{\text{La distance parcourue par le front de l'éluant}}$$

I-2-3) Activité antioxydante des huiles essentielles

Le pouvoir antioxydant de deux huiles essentielles et de leurs principaux constituants a été évalué *in vitro* en utilisant trois tests, le test du DPPH, le test du blanchissement de β -carotène et le test du pouvoir réducteur.

I-2-3-1) Test du DPPH

◆ Principe

Le DPPH (2,2 diphenyl-1-picryl hydrazyl) est un radical stable qui possède un électron célibataire sur l'atome d'azote, caractérisé par une couleur violette et un pic d'absorption spectral maximal à 517nm. En présence d'antioxydant l'électron célibataire devient apparié, ce qui conduit à la décoloration de DPPH du violet (forme radicalaire DPPH) au jaune (forme réduite DPPH-H) (**Figure 9**).

Cette décoloration représente donc la capacité d'échantillon de piéger ce radical [144].

I-2-3-2) Test du blanchissement de β -carotène

◆ Principe

Ce test consiste à mesurer à 490 nm la décoloration d'une solution de β -carotène, qui résulte de son oxydation par les radicaux libres produits par l'oxydation de l'acide linoléique sous l'effet de la chaleur. La présence d'antioxydant induit un retard de la cinétique de décoloration de cette solution, ce qui se traduit par une absorbance élevée indiquant que l'échantillon a un grand pouvoir antioxydant [146].

◆ Procédure expérimentale

L'évaluation du pouvoir antioxydant de deux extraits et de leurs composés essentiels en utilisant le test du blanchissement de β -carotène a été réalisée selon la méthode décrite par Dapkevicius et al [147].

Dans un premier temps, au préalable, une émulsion de β -carotène/ acide linoléique a été préparée en mélangeant 25 μ l d'acide linoléique, 200mg de tween 20 et 0,5mg de β -carotène solubilisé dans 1ml de chloroforme, et après l'évaporation du solvant sous faible pression et à température de 40C°, 100ml de l'eau saturé en oxygène est ajouté.

À 350 μ l d'échantillon testé préparé à une concentration de 2g/l dans le DMSO, 2,5 ml d'une émulsion de β -carotène / acide linoléique sont additionnés.

L'absorbance de la solution de β -carotène est mesurée à 490 nm toutes les 20 minutes durant 2 heures d'incubation dans un bain marri à 50C° et contre un blanc constitué de l'émulsion sans β -carotène. Le pouvoir antioxydant est exprimé en pourcentage d'inhibition de l'oxydation de β -carotène selon la formule suivante.

$$\text{PI (\%)} = (\mathring{A}_0 - \mathring{A}_t) - (A_0 - A_t) / (\mathring{A}_0 - \mathring{A}_t) \times 100$$

$\mathring{A}_0, \mathring{A}_t$: Absorbance de β -carotène en absence d'échantillon (contrôle négatif) à t = 0 et t = 2 heures respectivement.

A_0, A_t : Absorbance de β -carotène en présence d'échantillon à t = 0min et t = 2 heures respectivement.

I-2-3-3) Test du pouvoir réducteur

◆ Principe

Le test du pouvoir réducteur consiste à évaluer l'aptitude d'échantillon à donner un électron convertissant le fer de la forme Fe^{3+} à la forme Fe^{2+} qui peut être quantifiée par la mesure de la formation de la couleur bleu (**bleu de Pruss** $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$) à 700 nm. Donc une absorbance élevée indique que l'échantillon possède un grand pouvoir réducteur [148].

◆ Procédure expérimentale

Ce test a été effectué selon la méthode de Prasad et al [149]; 1,25 ml d'une solution de phosphate buffer (0,2M- PH= 6,6) et 1,25 ml de 1% de potassium ferricyanide [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] sont ajoutés à 50 μl des différentes concentrations des échantillons préparés aussi dans le DMSO. Après incubation 20 minutes dans un bain marie à 50C⁰; 1,25 ml d'une solution aqueuse de TCA à 10% sont ajoutés au milieu réactionnel.

Après centrifugation 10 minutes à 3000 rpm, 1,25 ml de l'eau et 250 μl de 0,1% FeCl_3 sont ajoutés à 1,25 ml du surnagent, puis l'absorbance est déterminée à 700nm contre un blanc contenant tous les réactifs en absence de l'échantillon testé.

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

I-2-4) Activité anticoagulante des huiles essentielles

L'activité anticoagulante de deux huiles essentielles de la nigelle et de leurs principaux constituants a été évaluée *in vitro* vis-à-vis les deux voies de la coagulation (la voie endogène et la voie exogène) sur un pool des plasmas normaux déplaquettés et à l'aide de deux tests globaux et chronométriques ; le temps du céphaline-kaolin (TCK) et temps de Quick (TQ).

I-2-4-1) Préparation du plasma pool (standard) déplaquettés

Le plasma pool déplaquettés est un mélange de plasmas déplaquettés de 8 volontaires sains non traités âgés entre 24 à 26 ans dont les TCK et les TQ sont normaux et comparables. Le sang de chaque volontaire est prélevé par ponction veineuse dans un tube en plastique sur une solution anticoagulante de citrate de sodium à 3,2 % et 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 déplaquettés (plasma standard) est conservé à basse température (-10C°) jusqu'à son utilisation [150].

I-2-4-2) Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène

◆ Principe

L'évaluation de l'activité anticoagulante des huiles essentielles vis-à-vis de la voie endogène de la coagulation a été réalisée en utilisant le test du temps de céphaline-Kaolin (TCK), un test qui permet d'explorer l'activité des facteurs plasmatiques de la voie endogène (intrinsèque) de la coagulation [66] [151].

Ce test consiste à mesurer le temps de coagulation à 37 C° d'un plasma déplaquettés et citraté mis en présence de phospholipides (la céphaline) substitut du facteur 3 plaquettaire (F3P) d'un activateur du système contact (Prékalikriène, Kininogène de haut poids moléculaire et le facteur XII) qui est généralement le Kaolin et de calcium comme un facteur déclenchant [151]. Un temps de coagulation allongé en présence des huiles essentielles par rapport à celui du contrôle négatif indique que ces huiles exercent une activité anticoagulante vis-à-vis de cette voie de coagulation.

◆ Mode opératoire

L'activité anticoagulante des huiles essentielles et de leurs principaux constituants vis-à-vis de la voie endogène de la coagulation a été évaluée selon la méthode décrite par Athukorala et ses collaborateurs [150].

Dans un premier temps, afin de déterminer le temps d'incubation qui permet d'obtenir une activité anticoagulante optimale, 10µl des huiles essentielles préparées dans le DMSO avec une concentration de 0,091g/ml (dilution 1/10) sont additionnées à 90µl du plasma pauvre en plaquettes qui est ensuite incubé à 37C° durant des temps variables (1, 5, 10 et 15 minutes). Après incubation, 100µl d'une solution de céphaline-Kaolin sont additionnés puis le mélange est réincubé à 37C° pendant 3 minutes et la coagulation est alors déclenchée par l'addition de 100µl d'une solution aqueuse de 0,025M CaCl₂. Le temps de coagulation est alors déterminé à l'aide d'un coagulomètre optique basé sur le changement de la transmission de la lumière depuis d'addition du calcium (déclenchement du chronomètre) jusqu'à la formation du caillot de fibrine (arrêt du chronomètre).

Après la détermination du temps d'incubation permettant d'obtenir une activité anticoagulante élevée, le pouvoir anticoagulant des différentes concentrations des huiles essentielles, de leurs principaux constituants préparés dans le DMSO, et d'héparine comme un anticoagulant standard préparé dans 0,9% NaCl a été évalué dans les mêmes conditions au temps d'incubation optimal.

I-2-4-3) Evaluation de l'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène**◆ Principe**

L'activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène de la coagulation a été évaluée en utilisant un test de coagulation appelé le temps de Quick (TQ) ou le taux de prothrombine (TP) qui permet d'une exploration globale des facteurs de la voie exogène de la coagulation (La proconvertine VII, la prothrombine II, la proaccélélerine V, le facteur stuart X, et aussi le fibrinogène) [151]. Ce test consiste à mesurer le temps de coagulation à 37C° d'un plasma pauvre en plaquettes en présence d'un mélange de facteur tissulaire et des phospholipides (la thromboplastine) et de calcium. Les facteurs de la voie exogène donc sont activés et le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot est mesuré [66] [151].

Un temps de coagulation allongé par rapport à celui du contrôle négatif explique que l'échantillon exerce un effet anticoagulant vis-à-vis de cette voie de coagulation.

◆ Mode opératoire

L'effet des huiles essentielles de la nigelle sur la voie exogène de la coagulation a été évalué selon le protocole décrit par Athukorala et ses collaborateurs [150].

Premièrement, nous avons aussi déterminé l'effet du temps d'incubation des huiles essentielles avec le plasma sur leur pouvoir anticoagulant, pour cela 10µl des huiles essentielles préparées dans le DMSO avec une concentration de 0,091g/ml (dilution 1/10) sont additionnées à 90µl du plasma standard qui est ensuite incubé à 37C° durant des temps différents (1,5, 10 et 15 minutes). Après l'incubation, la coagulation a été déclenchée par l'addition de 200µl de thromboplastine préincubé à 37C° pendant 15 minutes, et le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot fibrineux est alors mesuré automatiquement à l'aide du coagulomètre.

Après la détermination du temps d'incubation optimal pour une meilleure inhibition de la voie exogène de la coagulation, le pouvoir anticoagulant des différentes concentrations des huiles essentielles, et de leurs principaux constituants a été évalué dans les mêmes conditions et au temps d'incubation optimal.

I-2-5) Analyses statistiques

Les courbes et les histogrammes sont tracés par le Microsoft Excel 2003, et les analyses statistiques ont été réalisées par le logiciel SPSS (version 11).

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne ± écart-type de trois essais (n=3) et la normalité des valeurs est testée par la méthode de Kolmogorov Smirnov. L'ANOVA (analyse de la variance) est utilisée pour confirmer l'existence d'une activité et la méthode de la plus petite différence significative (P.P.D.S) est utilisée pour la comparaison entre les échantillons (les moyennes).

Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de confiance 95% ($P \leq 0,05$).

II-Résultats et discussion

II-1) Extraction des huiles essentielles des graines de la nigelle

L'extraction de l'huile fixe de la nigelle Algérienne (de Magra) par soxhlet a permis d'obtenir une huile de couleur brune (brune jaunâtre) avec un rendement de 33,13% (P/P) du poids de la graine. En comparaison avec d'autres écotypes de la nigelle, cette teneur en huile fixe de l'écotype Algérien est comparable à celle de la nigelle Egyptienne (34,78%) [102], élevée par rapport à la nigelle Tunisienne (28,48%), et faible par rapport à la nigelle Iranienne (40,35%) [110].

L'hydrodistillation d'huile fixe Algérienne et d'huile fixe commerciale extraite par pression à froid (Huile d'*El-Baraka*) a donné des huiles essentielles de couleur marron, d'une forte odeur, et d'une densité égale à 0,91 g/ml avec des rendements de 0,51 et 2,2 % (P/P) du poids d'huile fixe respectivement. Pour l'écotype Algérien la teneur en huile essentielle exprimée par rapport au poids de la graine est de l'ordre de $0,16 \pm 0,02$ % (P/P).

En effet, les études concernant la teneur en huiles essentielles des graines de la nigelle ont donné des résultats différents, par exemple l'étude de Bucar et al [107] a révélée que la teneur en l'huile essentielle extraite par la même méthode est entre 0,4-0,44%, alors que l'hydrodistillation directe de la matière végétale a donné un rendement de 0,18%. D'autre par la nigelle du Pologne et de Tunisie ont présenté des rendements considérables en huiles essentielles (1,7 et 0,36% respectivement) [108] [152]. Par ailleurs l'extraction par micro-ondes d'un écotype Algérien cultivé au Sahara a donné un rendement de 0,57% [153].

Donc d'après ces résultats, la teneur en huile essentielle des graines de la nigelle est très variable, et cette variabilité peut être attribuée d'une part à la différence dans la procédure d'extraction et d'autre part à l'influence des autres facteurs comme l'origine géographique, les facteurs écologiques, les pratiques agronomiques, les conditions du stockage, ...etc [102] [152] [154].

II-2) Caractérisation des huiles essentielles

L'analyse qualitative des huiles essentielles de la nigelle par la chromatographie sur couches minces a révélée que les deux échantillons ont presque la même composition qualitative, et contiennent un nombre considérable de constituants visibles sur les profils chromatographiques (**figure10**).

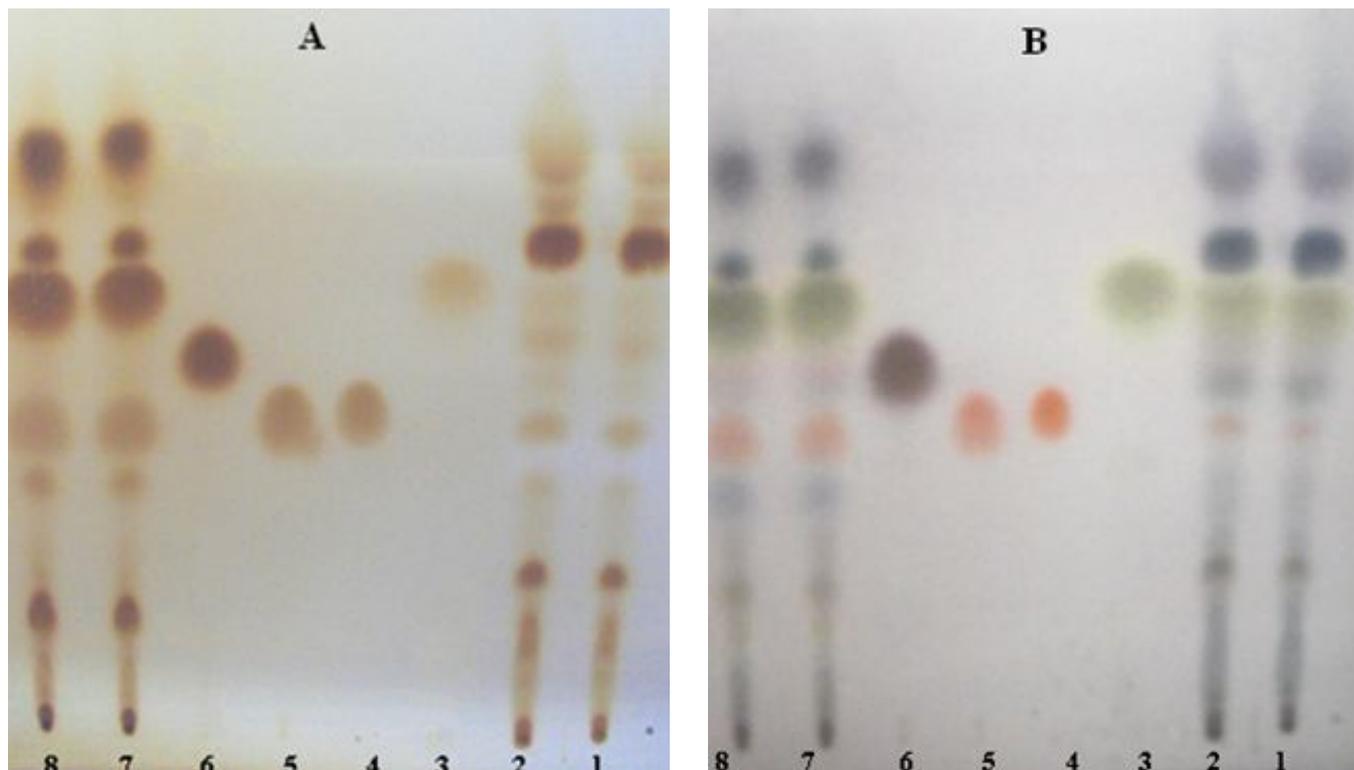


Figure10: Chromatographie sur couches minces des huiles essentielles de la nigelle
(A) : révélation par la vapeur d'iode, **(B)** : révélation par une solution d'anisaldéhyde / acide sulfurique
1 ,2: HE de Magra à différentes concentrations **3-6**: thymoquinone, thymol, carvacrol, carvone
7 ,8 : HE commerciale à différentes concentrations

D'après les rapports frontaux des principaux spots révélés des deux huiles essentielles, et les rapports frontaux des témoins rapportés sur le **tableau (2)**, il ressort que ces huiles essentielles sont constituées de thymoquinone, carvone, thymol et/ ou carvacrol. Le thymol et le carvacrol sont des isomères de monoterpènes phénoliques ayant presque le même rapport frontal et la même couleur, leur distinction s'avère ambigu dans les deux échantillons.

Tableau 2: Rapports frontaux des spots des huiles essentielles de la nigelle et des témoins utilisés

	Révélation par la vapeur d'iode	Révélation par anisaldéhyde / acide sulfurique
Thymoquinone	0,55	0,555
Thymol	0,39	0,39
Carvacrol	0,385	0,385
Carvone	0,46	0,46
HE commerciale	0,725 – 0,615 – 0,54 – 0,37 – 0,305- 0,125	0,725- 0,615- 0,54- 0,455- 0,42- 0,37- 0,305 0,18
HE de Magra	0,725- 0,675- 0,615- 0,545- 0,495- 0,45- 0,38- 0,305- 0,195- 0,12	0,725- 0,615- 0,545- 0,44- 0,38- 0,2

Les chromatogrammes des huiles essentielles étudiés indiquent que la thymoquinone est le constituant majeur de l'huile essentielle commerciale, et constitue une part importante dans l'huile essentielle de Magra au regard de l'aire du spot correspondant. Par ailleurs il semble que l'huile essentielle de Magra est caractérisée par un autre constituant majeur non identifié, dont le rapport frontal est situé au dessus de la thymoquinone. Ce composé peut être dû à la dimérisation de thymoquinone, la dithymoquinone, sous l'effet du traitement de ces huiles par la chaleur. En effet, il a été démontré que le taux de dithymoquinone dans l'huile fixe de la nigelle extraite par pression à froid est très négligeable et que les traitements par la chaleur (lors de l'extraction ou l'exposition à la lumière) sont à l'origine de taux élevé de dithymoquinone [155]. A la lumière des résultats obtenus concernant la composition d'huile essentielle de la nigelle il ressort que ces huiles essentielles contiennent dans des proportions différentes la thymoquinone, carvone, thymol et/ ou carvacrol.

Ces résultats sont similaires aux résultats obtenus par diverses études réalisées sur différentes variétés de la nigelle. L'étude de Bucar et al [107] a rapporté que la thymoquinone est le constituant majeur dans la composition d'huile essentielle de plusieurs variétés, elle représente 27,8 à 57% d'huile essentielle totale, le carvacrol représente aussi un pourcentage important dans la composition d'huile essentielle (7-11%) et le thymol et le carvone sont aussi détectés dans ces huiles essentielles. D'autre par le thymol a été trouvé dans l'huile essentielle

de la nigelle Tunisienne avec une quantité considérable (5,34%) [152], et le carvone est l'un des 3 constituants majeurs dans la composition d'huile essentielle de la nigelle Iranienne (4%) [156]. Par ailleurs l'analyse par CPG/SM d'huile essentielle de la nigelle Algérienne cultivée au Sahara a montré que la thymoquinone, thymol, carvacrol et le carvone représentent les principaux constituants de cette huile [153].

II-3) Activité antioxydante des huiles essentielles

II-3-1) Test du DPPH'

Les méthodes utilisés pour évaluer la capacité antioxydante des extraits végétaux sont très diverses parmi les quelles la méthode du DPPH', une méthode simple, rapide et largement utilisée. L'activité antioxydante des huiles essentielles de la nigelle et de certains de leurs principaux constituants (thymol, carvacrol, thymoquinone, carvone, α -pinène et P-cymène) se manifeste via le changement de la couleur de DPPH' entre l'état oxydé (forme violette) et l'état réduit (forme jaune), ce qui permet de quantifier le pourcentage d'inhibition de ce radical en mesurant les variations de l'absorbance aux différentes concentrations utilisées (**figure 11**). Pour évaluer le pouvoir de ces échantillons de piéger le radical DPPH' nous avons déterminé la concentration inhibitrice à 50% (CI₅₀) en utilisant le modèle logistique selon la relation suivante $[\text{Log}(Y/100-Y)] = F(\text{Log } X)$ (**Figure12**).

À la lumière des résultats obtenus, il ressort que les huiles essentielles ainsi que le thymol et le carvacrol exercent une activité antioxydante importante et dose dépendante alors que la thymoquinone, le carvone (monoterpènes cétoniques), l' α -pinène et le P-cymène (monoterpènes aliphatiques) n'exercent aucun effet piégeur vis-à-vis du DPPH' dans les concentrations utilisées. En effet, au dose élevée de 1000 μ g/ml, la thymoquinone inhibe presque 16% de DPPH', le carvone et l' α -pinène inhibent 8 et 2,47% respectivement, alors que l'activité antiradicalaire de P-cymène dans cette concentration est nulle.

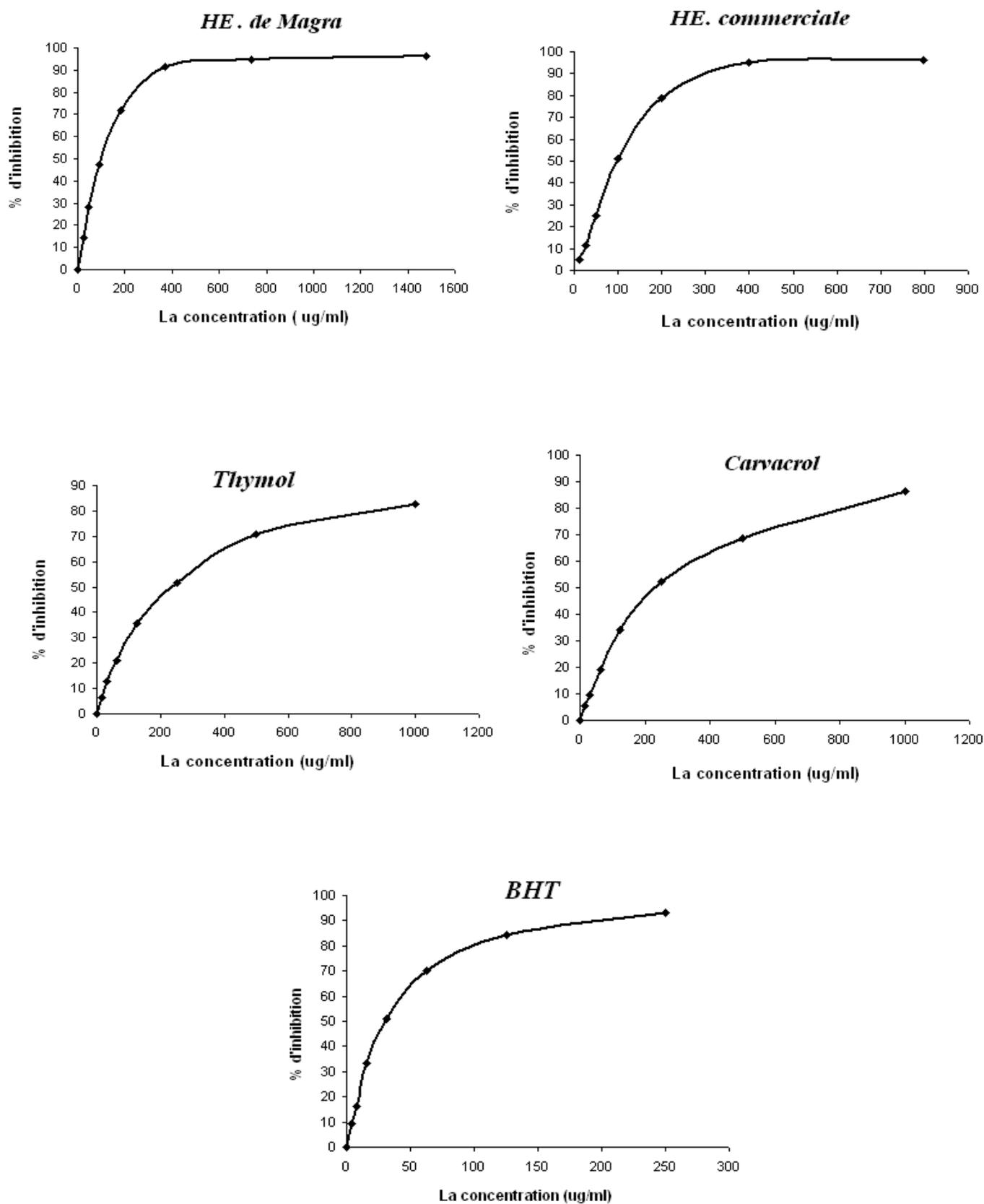


Figure 11 : Activité antiradicalaire des huiles essentielles et de certains de leurs constituants

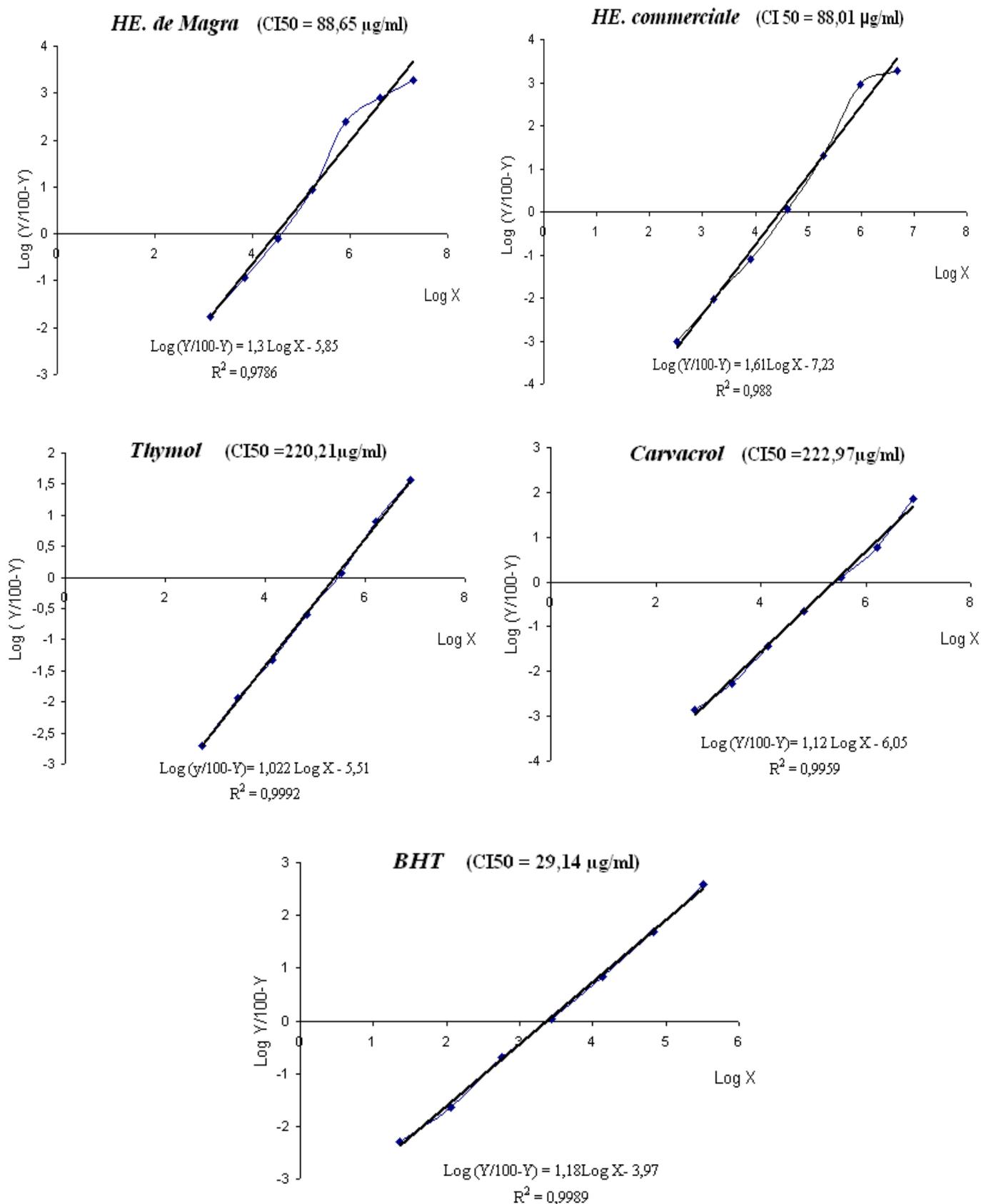


Figure12: La transformation des % d'inhibition de DPPH par le modèle logistique
 X (la concentration µg/ml) Y (% d'inhibition)

L'huile essentielle de la nigelle Algérienne ainsi que l'huile commerciale exercent une activité antiradicalaire assez substantielle avec des CI_{50} de l'ordre de $88,65 \pm 0,64$ et $88,01 \pm 1,26$ $\mu\text{g/ml}$ respectivement. En comparaison à l'activité de l'antioxydant standard, le BHT (CI_{50} de $29,14 \pm 0,52$ $\mu\text{g/ml}$), ces huiles sont trois fois moins actives. Les travaux concernant l'évaluation de la capacité d'huile essentielle de la nigelle de piéger le radical DPPH \cdot ont donné des résultats différents variant d'un écotype à un autre. L'étude de Bucar et al [107] a révélé que l'huile essentielle de la nigelle Australienne est capable de piéger le radical DPPH \cdot avec une CI_{50} de l'ordre de $460 \mu\text{g/ml}$, alors que la variété de la Turquie a présenté une CI_{50} de $515 \mu\text{g/ml}$. Par ailleurs Bourgou et ses collaborateurs [152] ont établi que l'huile essentielle de la nigelle Tunisienne exerce un puissant effet antiradicalaire avec une CI_{50} de $14 \mu\text{g/ml}$. Cette différence dans la CI_{50} peut être attribuée à la différence dans la concentration de DPPH \cdot utilisée dans le test d'une part [157] et d'autre part à l'influence des autres facteurs qui peuvent affecter la composition chimique et par conséquent la capacité antioxydante de l'échantillon, comme la variété des graines, les conditions de la croissance de la plante, les conditions du stockage des graines et d'huile et les méthodes d'extraction pratiquées [155].

En effet, il a été démontré que les constituants responsables de l'activité antioxydante des huiles essentielles sont généralement des composés oxygénés comme les phénols, les alcools et les cétones [152]. Le présent travail a révélé que les deux monoterpènes phénoliques, thymol et carvacrol sont les plus actifs que les autres composés testés. Ces composés ont démontré un puissant effet piègeur vis à vis du DPPH \cdot avec des CI_{50} comparables de l'ordre de $220,21 \pm 4,5$ et $222,97 \pm 3,77$ $\mu\text{g/ml}$ respectivement. De même l'étude réalisée par Mastelic et al [158] a montré que ces deux composés phénoliques possèdent une capacité antiradicalaire importante avec des CI_{50} de l'ordre de 269 et 267 $\mu\text{g/ml}$ respectivement et d'autre part Tepe et ses collaborateurs [159] ont prouvé que le thymol est capable de piéger significativement le radical DPPH \cdot et avec une CI_{50} de l'ordre de $162 \mu\text{g/ml}$. Une autre recherche a révélé aussi que le thymol et leur isomère, le carvacrol sont les principaux constituants responsables de l'activité antioxydante d'huile essentielle d'*Origanum vulgare*, et que sont des puissants agents piègeur du DPPH \cdot [160].

Concernant la thymoquinone, leur pouvoir de piéger le radical DPPH \cdot est très faible, ceci est confirmé par la bibliographie. Une étude récente a révèle que ce composé exerce un faible effet vis-à-vis du DPPH \cdot [161], et d'autre part Badary et ses collaborateurs [162] ont établi que la thymoquinone n'est pas capable de piéger le radical DPPH \cdot mais elle a un grand

pouvoir de scavenger l'anion superoxyde [162].

Les deux monoterpènes aliphatiques testés, l' α -pinène et le P-cymène ne possèdent pas des propriétés antiradicalaire, et l'étude de Kulisic et al [159] a révélé aussi que le P-cymène n'est pas actif vis-à-vis du DPPH \cdot , et d'autre part la fraction des composés oxygénés d'huile essentielle de *l'Origanum vulgare* L a montré une excellente activité dans le système de DPPH \cdot , mais la fraction des hydrocarbures ne possède pas des propriétés antiradicalaire [159].

Globalement, d'après les résultats de ce test, il est évident que l'huile essentielle de la nigelle possède des propriétés antiradicalaire assez substantielles, et que cette activité est significativement ($P \leq 0,01$) plus élevée à celle de deux composés phénoliques caractéristiques de cette huile (thymol et carvacrol), ce qui permet de dire qu'il y'a des autres constituants non phénoliques exercent un effet synergique responsable d'un grand pouvoir antiradicalaire. Ceci est confirmé par les résultats de Hinneburg et ses collaborateurs [163] qui ont prouvé que pas de corrélation entre le taux des phénols et l'effet scavenger *vis-à-vis* du DPPH \cdot de neuf huiles essentielles des différentes herbes et épices.

II-3-2) Test du blanchissement de β - carotène

Le test du blanchissement de β -carotène permet d'évaluer l'aptitude d'un échantillon donné d'inhiber la peroxydation lipidique *in vitro* [164], où l'oxydation d'acide linoléique génère des radicaux libres qui vont par la suite oxyder le β -carotène hautement insaturé, ce qui conduit à la disparition de sa couleur orangée. Cependant la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement de β -carotène [165] [160].

La cinétique du blanchissement de β -carotène en présence et absence des huiles essentielles et de certains de leurs principaux constituants, et les % d'inhibition de la peroxydation lipidique sont présentés dans les **Figures (13)** et **(14)** respectivement.

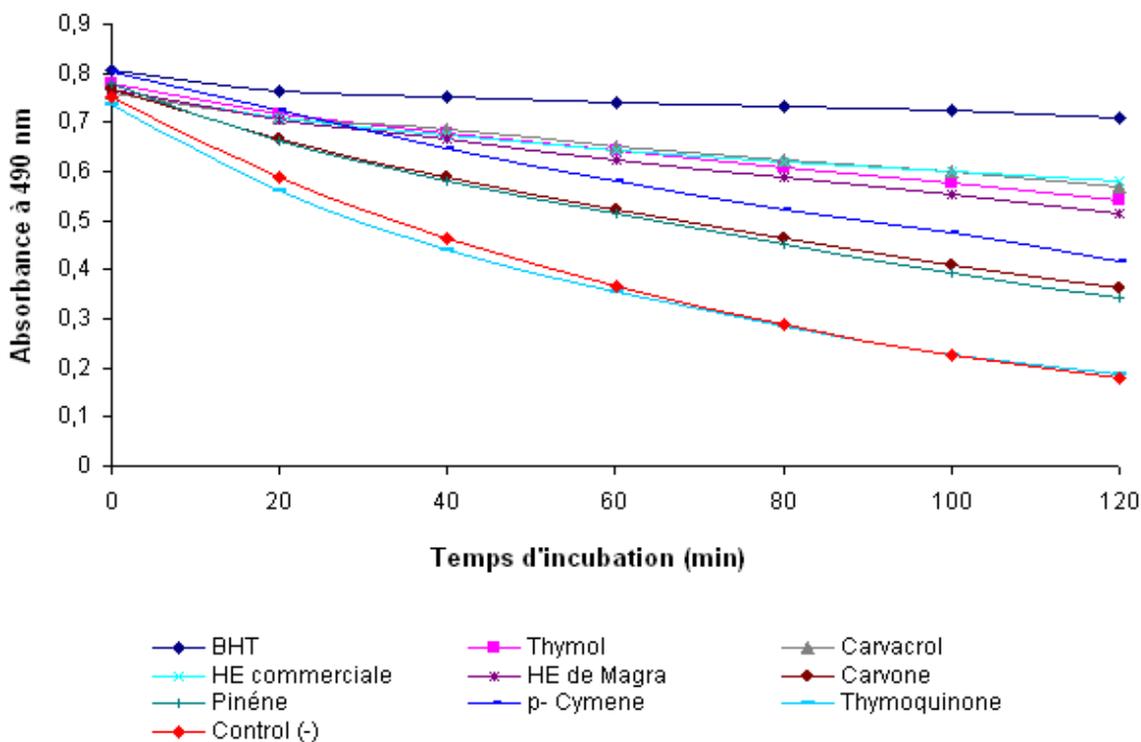


Figure 13 : Cinétique du blanchissement de β -carotène en présence des huiles essentielles et de certains de leurs principaux composés

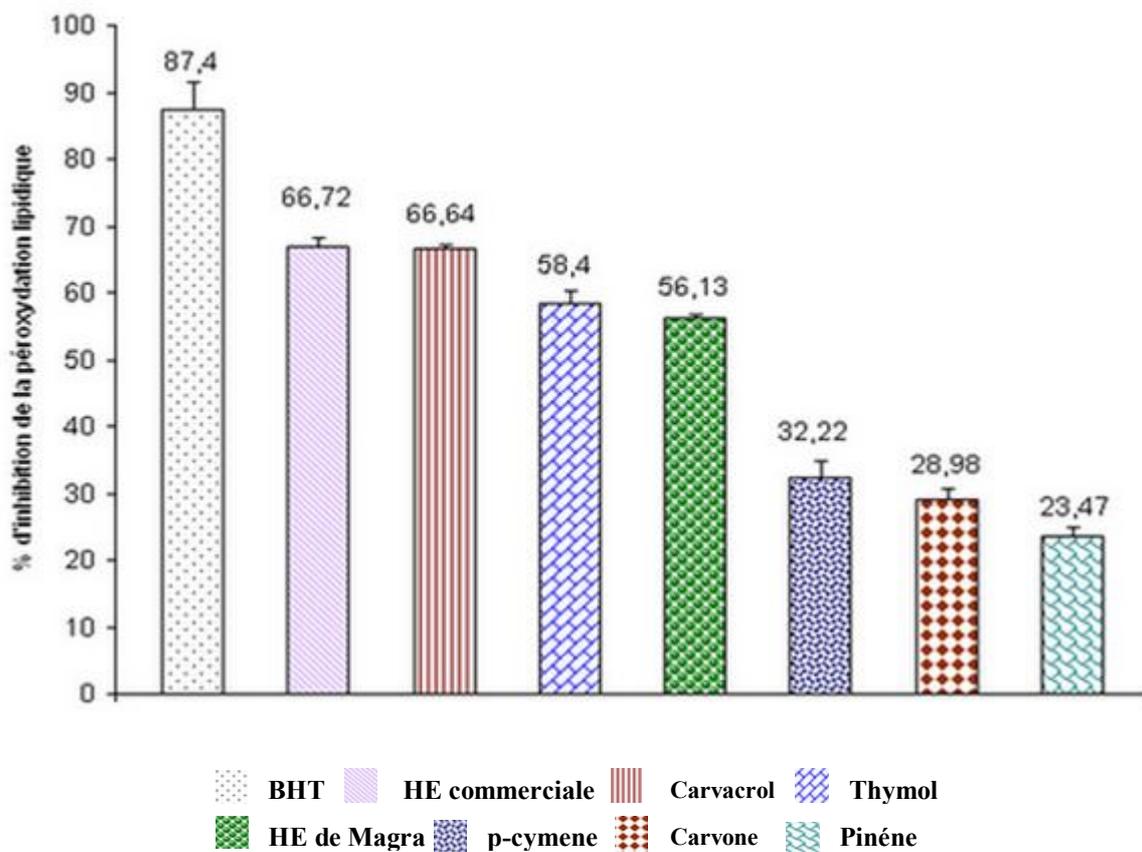


Figure 14 : Les pourcentages d'inhibition de la peroxydation lipidique

Les résultats de ce test et les analyses statistiques montrent que les absorbances de l'émulsion de β -carotène/acide linoléique en présence des huiles essentielles avec une concentration de 2 g/l sont significativement ($P < 0,01$) plus élevées à celles du contrôle négatif. Au temps 0, l'absorbance de la solution du β -carotène en absence des huiles essentielles (contrôle négatif) est de $0,75 \pm 0,0042$. Cette absorbance diminue après 2 heures d'incubation jusqu'à $0,18 \pm 0,014$, alors qu'en présence des huiles essentielles Algérienne et commerciale, les absorbances diminuent de $0,767 \pm 0,014$ et $0,769 \pm 0,0007$ jusqu'au $0,52 \pm 0,009$ et $0,579 \pm 0,012$ respectivement, ce qui confirme alors que les deux huiles essentielles ont un pouvoir substantiel d'inhiber l'oxydation couplée de β -carotène/acide linoléique et avec des pourcentages de $56,13 \pm 0,61$ et $66,72 \pm 1,4$ % respectivement.

Cette activité reste significativement inférieure à celle de BHT qui a donné un pourcentage d'inhibition de $87,4 \pm 2,34\%$ avec une absorbance de $0,8 \pm 0,0014$ au temps 0 et $0,71 \pm 0,012$ après 2 heures.

Le thymol et le carvacrol ont révélé aussi une capacité considérable et comparable à celle des huiles essentielles d'inhiber le blanchissement de β -carotène avec des pourcentages de $58,4 \pm 2,01$ et $66,64 \pm 0,61$ % respectivement. Par ailleurs le carvone, l' α -pinène et le P-cymène exercent une faible activité antioxydante (les pourcentages d'inhibition sont compris entre 23 et 32%), alors que la thymoquinone n'exerce aucun effet inhibiteur, les absorbances sont très proche à celles du contrôle négatif.

Ces résultats sont confirmés par plusieurs études *in vitro* et *in vivo*. En effet, *in vitro*, l'étude de Bucar et al [107] a révélé que l'huile essentielle de la nigelle possède un grand pouvoir d'inhiber la peroxydation des phospholipides du cerveau bovin. Une concentration de $0,0011 \mu\text{g/ml}$ inhibe presque 50% de dommage lipidique. D'autre par Singh et ses collaborateurs [166] ont prouvé que ces huiles volatiles sont capables d'inhiber significativement la peroxydation d'huile de Colza et d'acide linoléique avec un pouvoir comparable à celui de deux antioxydants synthétiques le BHA et le BHT.

In vivo, chez les rats, l'administration de l'huile essentielle de la nigelle par gavage et à dose de 10 ml /Kg inhibe de façon significative la peroxydation lipidique induite par l'éthanol, en diminuant le taux de malonatedialdehyde, marqueur de la peroxydation lipidique [117]. D'autre part l'étude de Kanter et al [118] a établi qu'un taux élevé de malonate dialdehyde MDA ($6,49 \pm 0,66$ nmol/ml) est observé dans le plasma des rats traités par le cadmium et que l'administration de l'huile essentielle de la nigelle par voie intrapéritoniale et à raison de 0,2 ml/Kg abaisse de façon significative le taux de MDA ($4,79 \pm 0,56$ nmol/ml).

Concernant le thymol et le carvacrol, Radonic et ses collaborateurs [167] ont prouvé que ces deux monoterpènes phénoliques exercent un puissant effet inhibiteur de l'oxydation couplée de β -carotène/acide linoléique et avec un pouvoir 1,5 fois inférieur à celui de l' α -tocophérol, et 2 fois inférieur à celui de BHT. D'autre part il a été rapporté que le thymol prévient le blanchissement de β -carotène avec un pourcentage de 56,7% [159].

Des travaux concernant les huiles essentielles de *Saturja montana* et d'*Origanum vulgare* ont révélé que la fraction phénolique constituée de thymol et carvacrol et la fraction des composés oxygénés de ces huiles essentielles ont un grand pouvoir d'inhiber l'oxydation de β -carotène, alors que l'effet de la fraction des hydrocarbures est très faible [160] [167].

Par ailleurs Tepe et al [159] attestent que le P-cymène exerce une faible activité antioxydante dans ce système, et d'autre part, une étude *in vivo* a rapporté que l' α -pinène et le P-cymène exercent une faible activité inhibitrice de la peroxydation lipidique induite chez les souris par le tétrachlorure de carbone (CCL_4) [168].

II-3-3) Test du pouvoir réducteur

L'aptitude d'un échantillon de donner un électron reflète leur pouvoir antioxydant, et la réduction de Fe^{3+} est un indicateur de la capacité de l'échantillon de donner un électron [169]. Dans ce test le pouvoir antioxydant des huiles essentielles de la nigelle et de leurs principaux constituants se manifeste via le changement de la couleur du milieu réactionnel de jaune au bleu, un changement qui est due à la réduction de (Fe^{3+}) à la forme (Fe^{2+}) qui est quantifiée par la mesure de l'absorbance de la couleur bleu formée aux différentes concentrations utilisées (**Figure 15**) .

Le pouvoir réducteur de ces échantillons est exprimé par la concentration effective à 50% (CE_{50}), une concentration permet d'obtenir une absorbance de 0,5 et qui est calculée par le modèle logarithmique selon cette formule $\text{LogY}=\text{F}(\text{LogX})$ (**Figure16**).

Les résultats obtenus et les analyses statistiques montrent que les deux huiles essentielles, le thymol et le carvacrol exercent une activité réductrice importante et dose dépendante (**Figure 15**). Cette activité reste inférieure à celle de BHT qui a présenté une CE_{50} de $9,75 \pm 0,15 \mu\text{g/ml}$. Par ailleurs les autres composés testés (thymoquinone, carvone, α -pinène, et p-cymène) n'exercent aucun effet réducteur dans les concentrations utilisées (150 à $600 \mu\text{g/ml}$).

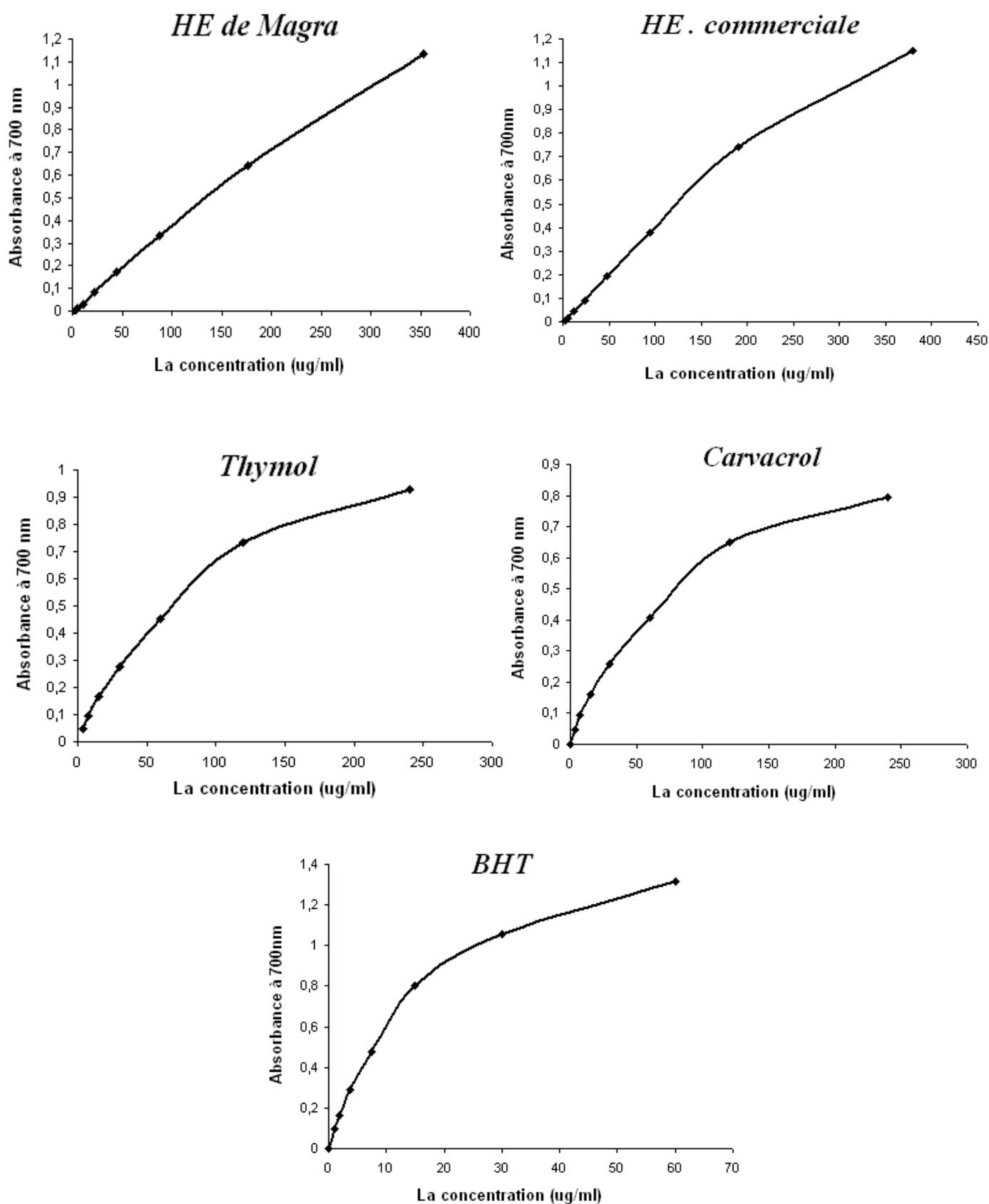


Figure 15 : Pouvoir réducteur des huiles essentielles et de certains de leurs constituants

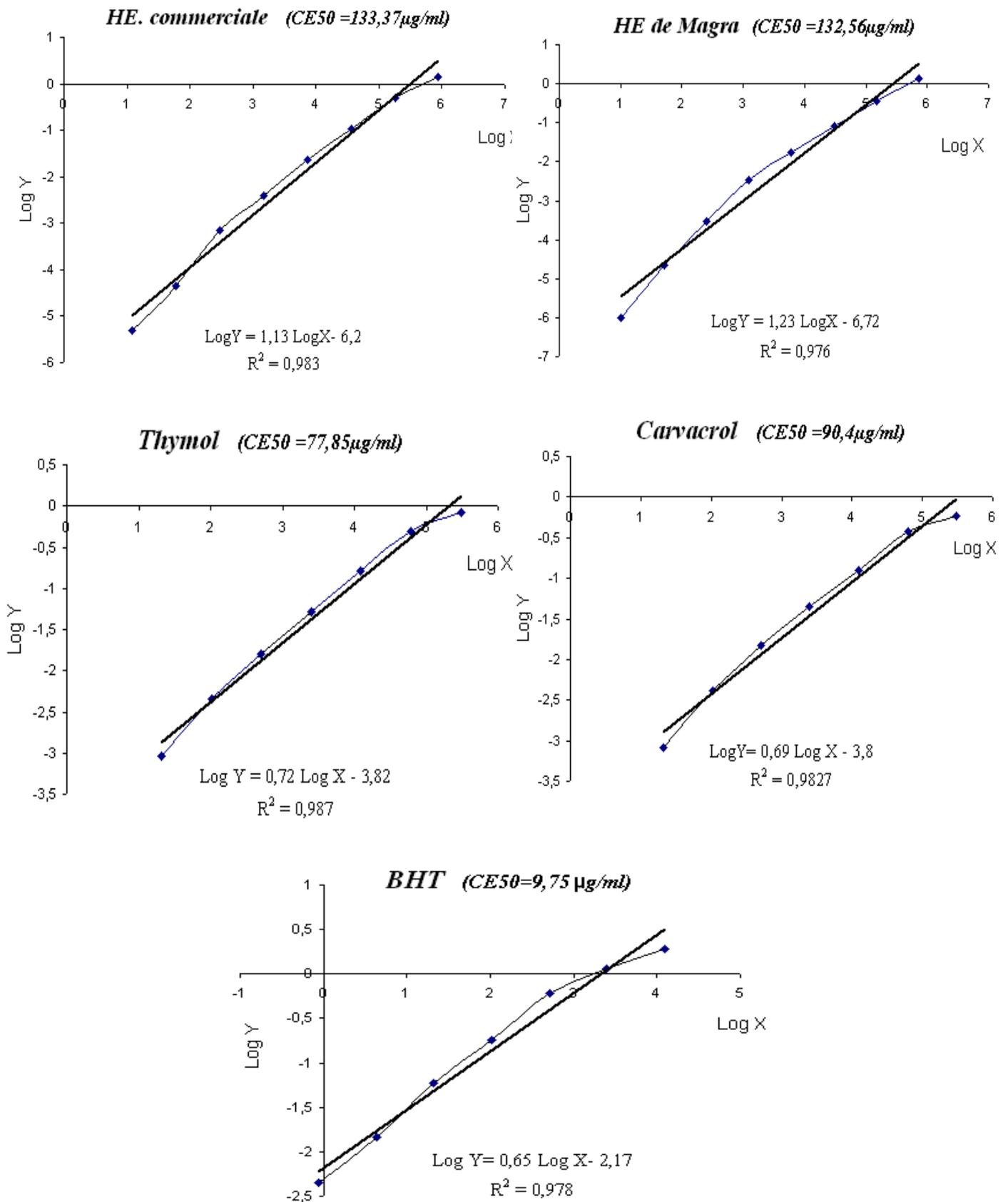


Figure 16: La transformation par le modèle logarithmique X (la concentration µg/ml) Y (L'absorbance à 700nm)

Pas de différence significative entre le pouvoir réducteur d'huile essentielle Algérienne et d'huile essentielle commerciale, les CE_{50} sont de l'ordre de $132,56 \pm 1,72$ et $133,37 \pm 1,27$ $\mu\text{g/ml}$ respectivement.

Le thymol et le carvacrol ont révélé une activité antioxydante significativement ($P < 0,05$) plus élevée à celle des huiles essentielles, les CE_{50} sont de l'ordre de $77,85 \pm 1,7$ et $90,4 \pm 1,78$ $\mu\text{g/ml}$ respectivement. Ce ci confirme les résultats obtenus par Hinneburg et ses collaborateurs [163] qui misent en évidence que la réduction de Fe^{3+} est corrélée avec le taux phénolique du matériel testé. D'autre part il a été démontré dans une étude réalisée sur les huiles essentielles des différentes variétés de *Thymus* que les huiles riches en thymol et carvacrol ont un pouvoir réducteur plus élevé que celui des huiles pauvres en ces deux phénols [170].

En effet, une seule étude a été réalisée pour évaluer le pouvoir réducteur des huiles essentielles de la nigelle, cette étude a révélé que ces huiles possèdent un pouvoir réducteur considérable [166].

Globalement, les résultats de l'activité antioxydante des huiles essentielles des graines de la nigelle Algérienne et d'huile commerciale évaluée par ces différents tests indiquent que ces huiles essentielles possèdent des propriétés antioxydantes substantielles.

Cette activité semble être attribuée aux composés phénoliques particulièrement le thymol et le carvacrol qui possèdent un groupement * hydroxyle- OH* a une grande aptitude de donner un hydrogène [169] [170]. D'autre composés tell que les alcools (linalool, 1,2-cineol), les cétones (menthone, isomenthone), les aldéhydes (neral, geranial, citronellal), les éthers et les hydrocarbures (α -terpinène, γ -terpinène et α -terpinolène) peuvent contribuer à l'activité antioxydante des huiles essentielles en agissant par synergisme [86].

Les travaux futurs doivent établir l'effet additif des différents composés chimiques à travers l'utilisation d'autre composés en combinaison entre eux ou mixés à l'huile essentielle et aussi réaliser un fractionnement de l'huile pour déterminer les fractions les plus actives.

II-4) Activité anticoagulante des huiles essentielles

Le pouvoir anticoagulant des huiles essentielles de la nigelle et de leurs principaux constituants a été évalué *in vitro* vis-à-vis de la voie endogène et la voie exogène de la coagulation à l'aide de deux tests chronométriques, le TCK et le TQ respectivement.

II-4-1) Activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène

L'évaluation de la capacité anticoagulante des huiles essentielles vis-à-vis de la voie endogène de la coagulation a été réalisée à l'aide du test de temps de céphaline-Kaolin (TCK). Dans ce test, cette voie de coagulation est activée par le contact entre le facteur XII et la surface électronégative de l'activateur qui est le kaolin (substitut du collagène et de tissu conjonctif *in vivo*). Cette interaction induit l'activation du facteur XII et par conséquent l'activation séquentielle des facteurs XI, IX, X et la thrombine (facteur II) [171].

Un temps de coagulation allongé par rapport au contrôle négatif où l'échantillon est remplacé par le DMSO traduit une activité anticoagulante du matériel testé.

Dans une première étape nous avons déterminé l'effet du temps d'incubation des huiles essentielles avec le plasma sur le TCK, et d'après les résultats obtenus, il ressort que les deux huiles essentielles, Algérienne et commerciale sont capables d'allonger significativement ($P < 0,01$) le TCK et de manière temps dépendante en comparaison avec le contrôle négatif dont le temps de coagulation n'est pas modifié durant les différents temps d'incubation (**Figure 17**).

En effet, l'incubation des huiles essentielles commerciale et de Magra avec le plasma pendant 1 minute et avec une concentration de 9,1mg/ml (10µl/ml) allonge le TCK à $57,85 \pm 1,06$ et $55,85 \pm 1,62$ secondes respectivement. Une incubation de 5 minutes a permis d'allonger le temps de coagulation presque 1,8 fois plus (78 Sec) que le contrôle négatif (44,2 Sec), alors que l'incubation durant 10 minutes allonge le TCK à $106,15 \pm 2,75$ et $93,65 \pm 1,63$ secondes en présence d'huiles essentielles commerciale et Algérienne respectivement. Par ailleurs, une incubation de 15 minutes allonge le TCK presque 3 fois plus que le contrôle négatif (128,033 / 132,56 Sec).

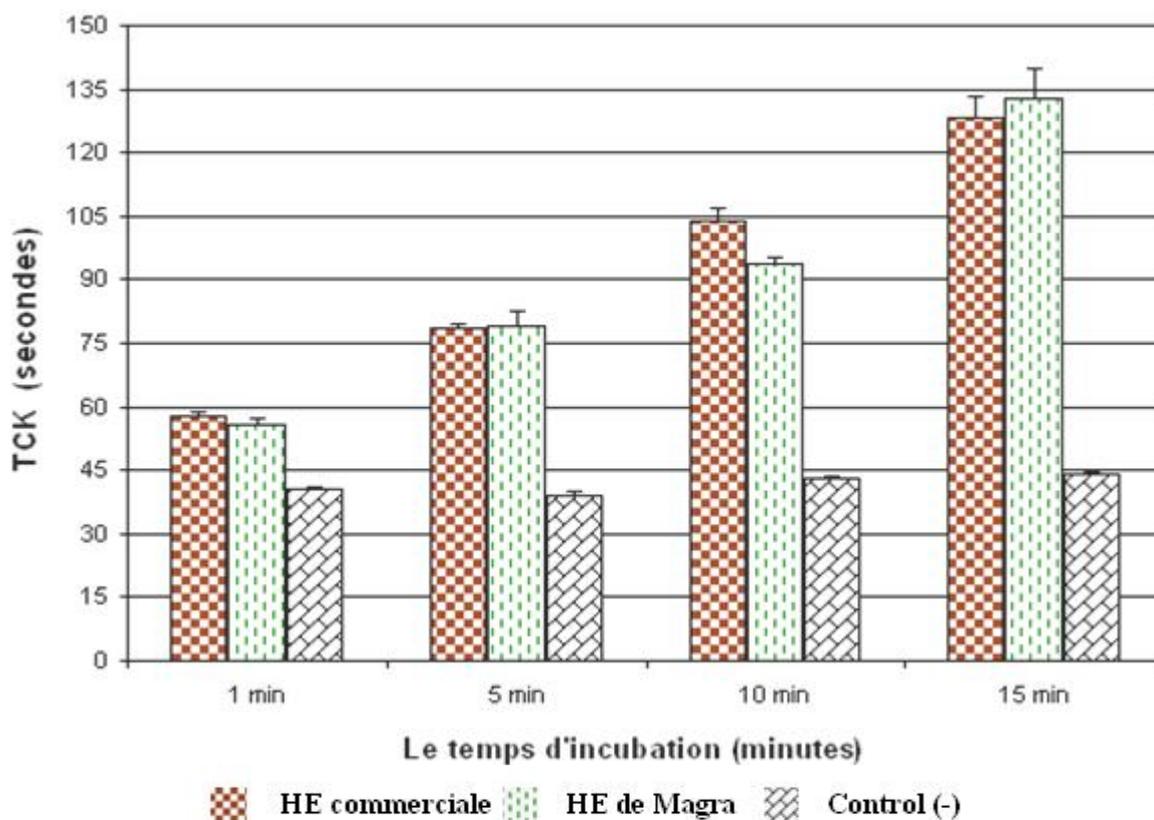


Figure 17: Effet du temps d'incubation des huiles essentielles avec le plasma sur le TCK

À la lumière des résultats obtenus, il apparaît clairement que les huiles essentielles de la nigelle exercent une activité anticoagulante positivement corrélée avec le temps d'incubation et que l'incubation de 15 minutes est temps préférable pour obtenir une grande activité anticoagulante vis-à-vis de la voie endogène de la coagulation.

Lors de la deuxième étape, le pouvoir anticoagulant des différentes concentrations des huiles essentielles et de leurs principaux constituants vis-à-vis de la voie endogène de la coagulation à été évalué au temps d'incubation optimal (15 minutes) et les résultats obtenus ont révélé que ces huiles exercent une activité anticoagulante dose dépendante (**Tableau 3**).

En effet, les analyses statistiques montrent que pas de différence significative entre le contrôle négatif (44,2 Sec) et le plasma standard (32,36 Sec) ce qui confirme que l'effet de DMSO sur la coagulation est négligeable, alors qu'en présence des huiles essentielles l'allongement du TCK est significatif et augmente au fur et à mesure que la concentration des huiles essentielles augmente dans le milieu réactionnel.

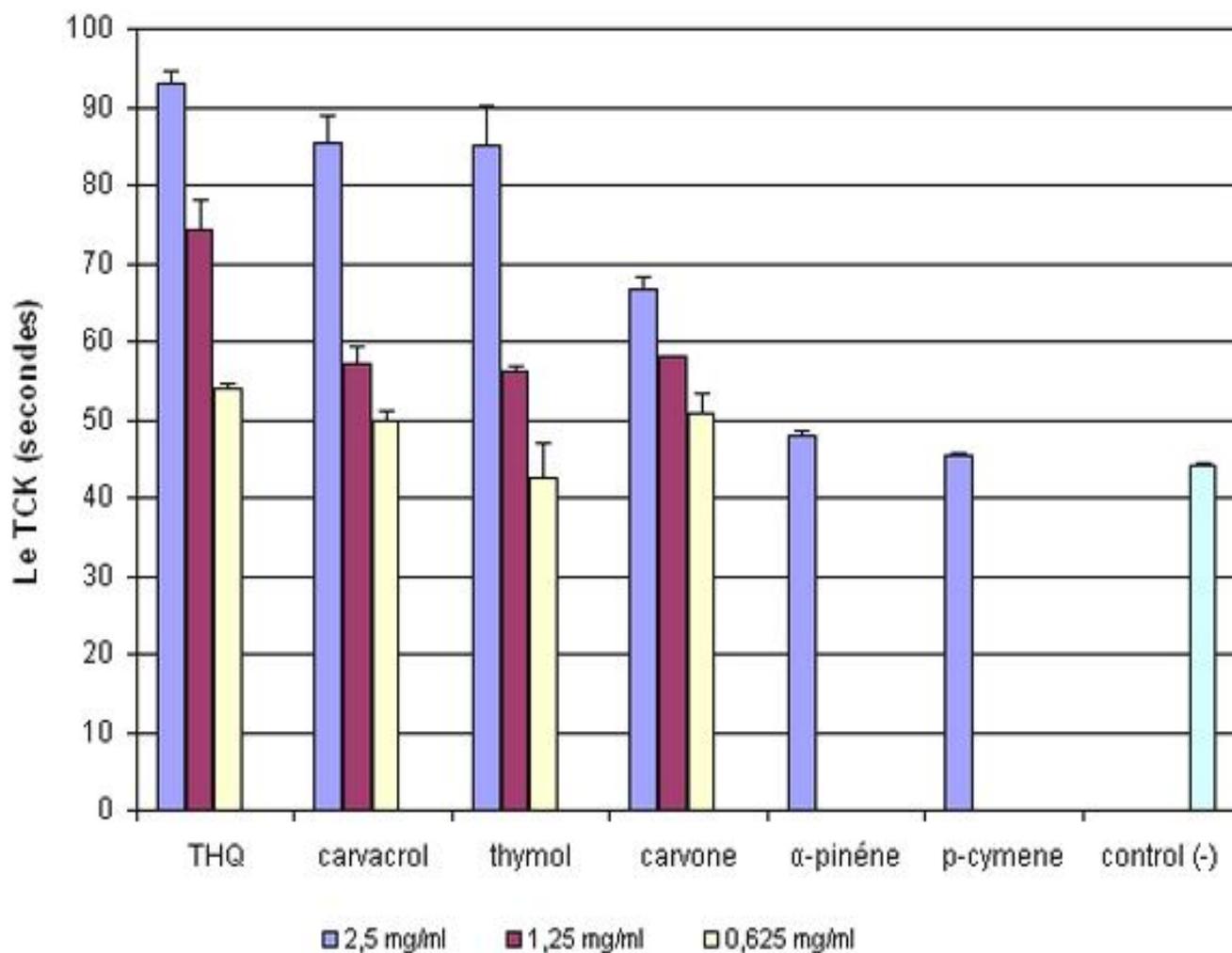
Tableau 3: Effet de la concentration des huiles essentielles sur le TCK

L'échantillon	La concentration dans le plasma (mg/ml)	Le TCK (secondes)
Plasma standard	–	32,36 ± 0,45
Contrôle (-)	–	44,2 ± 0,36
L'huile essentielle Commerciale	9,1	128,033 ± 2,8
	4,55	89,55 ± 1,77
	2,275	68,16 ± 3,18
	1,137	58,15 ± 0,21
L'huile essentielle de Magra	9,1	132,56 ± 0,92
	4,55	94,46 ± 1,6
	2,275	69,86 ± 2,01
	1,137	60,33 ± 1,66
Héparine (µg/ml)	0,83	148,9 ± 1,46
	0,625	114,83 ± 1,41
	0,5	66,5 ± 0,92
	0,25	32,55 ± 1,34

Aux faibles concentrations (1,13 et 2,27 mg/ml) le TCK varie entre 58 et 69 secondes pour les deux huiles essentielles. Cet allongement reflète une activité anticoagulante presque équivalente à celle de 0,5µg d'héparine/ml. À la concentration de 4,55mg/ml, le temps de coagulation est allongé presque 2 (89,55 Sec) et 2,14 (94,46 Sec) fois plus que le contrôle négatif en présence des huiles essentielles commerciale et Algérienne respectivement. Alors qu'une concentration de 9,1 mg/ml est capable d'allonger le TCK presque 3 fois plus que le contrôle négatif, le TCK est de l'ordre de 132,56 secondes en présence d'huile essentielle de Magra et 128,033 secondes en présence d'huile essentielle commerciale. D'après ces résultats, statistiquement pas de différence significative ($p < 0,01$) entre le pouvoir anticoagulant d'huile essentielle commerciale et d'huile essentielle de Magra vis-à-vis de la voie endogène de la coagulation, mais ce pouvoir reste inférieur à celui d'héparine, un

puissant médicament anticoagulant qui vise particulièrement la voie endogène de la coagulation.

L'étude de l'effet des principaux constituants d'huile essentielle de la nigelle sur la voie endogène de la coagulation a révélé que les deux monoterpènes phénoliques (thymol et carvacrol) et les deux monoterpènes cétoniques (thymoquinone et carvone) ont un grand pouvoir d'allonger le TCK et de façon dose dépendante, alors que les deux monoterpènes aliphatiques l' α -pinène et le p-cymène n'exercent aucun effet inhibiteur (**Figure 18**).



En effet, la thymoquinone a présenté une activité anticoagulante élevée que celle des autres composés testés, elle est capable d'allonger le TCK à $93 \pm 1,55$ et $74,35 \pm 3,6$ secondes aux concentrations de 2,5 et 1,25 mg/ml du plasma respectivement.

Pas de différence significative ($p < 0,01$) entre les deux monoterpènes phénoliques (thymol et carvacrol) qui exercent aussi un effet anticoagulant substantiel. À la concentration de 2,5 mg/ml du plasma ils sont capables d'allonger le TCK à $85,1 \pm 2,9$ et $85,5 \pm 3,1$ secondes respectivement. Alors que la concentration de 1,25 mg/ml allonge le TCK à $56,1 \pm 0,7$ et $57,033 \pm 1,41$ secondes respectivement.

Le carvone a montré une activité inhibitrice moyenne, significative et inférieure à celle de thymoquinone, thymol et carvacrol, à la concentration de 2,5 mg/ml il allonge le temps de coagulation 1,5 fois ($66,7 \pm 1,55$ Sec) plus que le contrôle négatif.

L'allongement du TCK en présence des huiles essentielles de la nigelle indique que ces métabolites sont capables d'inhiber les facteurs de la voie endogène et /ou les facteurs communs entre la voie endogène et la voie exogène de la coagulation [172] [173].

Cette activité semble être attribuée aux constituants qui possèdent des groupements fonctionnels comme les cétones et les phénols.

La plupart des études concernant la recherche des anticoagulants naturels sont

Figure 18: Effet des principaux constituants d'huile essentielle de la nigelle sur le TCK

focalisées particulièrement sur les polysaccharides extraits des algues alors que les travaux sur l'activité anticoagulante des huiles essentielles sont très limités, et jusqu'à présent aucune recherche n'a été réalisée *in vitro* pour évaluer le pouvoir anticoagulant de ces métabolites, mais *in vivo* certains travaux ont montré que les huiles essentielles sont capables d'inhiber la formation des thromboses *via* leurs activités antiagrégante et anticoagulante. Par exemple l'étude de Ballabeni et ses collaborateurs a révélé que l'huile essentielle de «*Ocotea quixos* » a un grand pouvoir d'inhiber la formation des thromboses induites par le collagène-epinephrine chez les souris [174], et d'autre part Tognolini et al ont confirmé que l'huile essentielle de «*Foeniculum vulgare* » et leur composé majoritaire l'anéthol sont capables de diminuer la surface du caillot fibrineux dans un plasma activé par la thrombine [175].

II-4-2) Activité anticoagulante vis-à-vis de la voie exogène

Le temps de Quick (TQ) ou le taux de prothrombine (TP) est le test qui permet d'explorer globalement la voie exogène de la coagulation où le facteur tissulaire est le déclencheur de cette voie [176]. Le TQ normal est compris entre 12 et 14 secondes selon les réactifs utilisés [151] et un allongement par rapport au contrôle négatif traduit une activité anticoagulante du matériel testé vis-à-vis de la voie exogène de la coagulation.

Dans un premier temps, les huiles essentielles de la nigelle sont incubées avec le plasma durant différents temps à fin de déterminer le temps d'incubation optimal pour obtenir une activité anticoagulante élevée et les résultats obtenus ont révélé que le temps d'incubation des huiles essentielles avec le plasma influe significativement ($P \leq 0,05$) sur leur pouvoir anticoagulant (Figure 19).

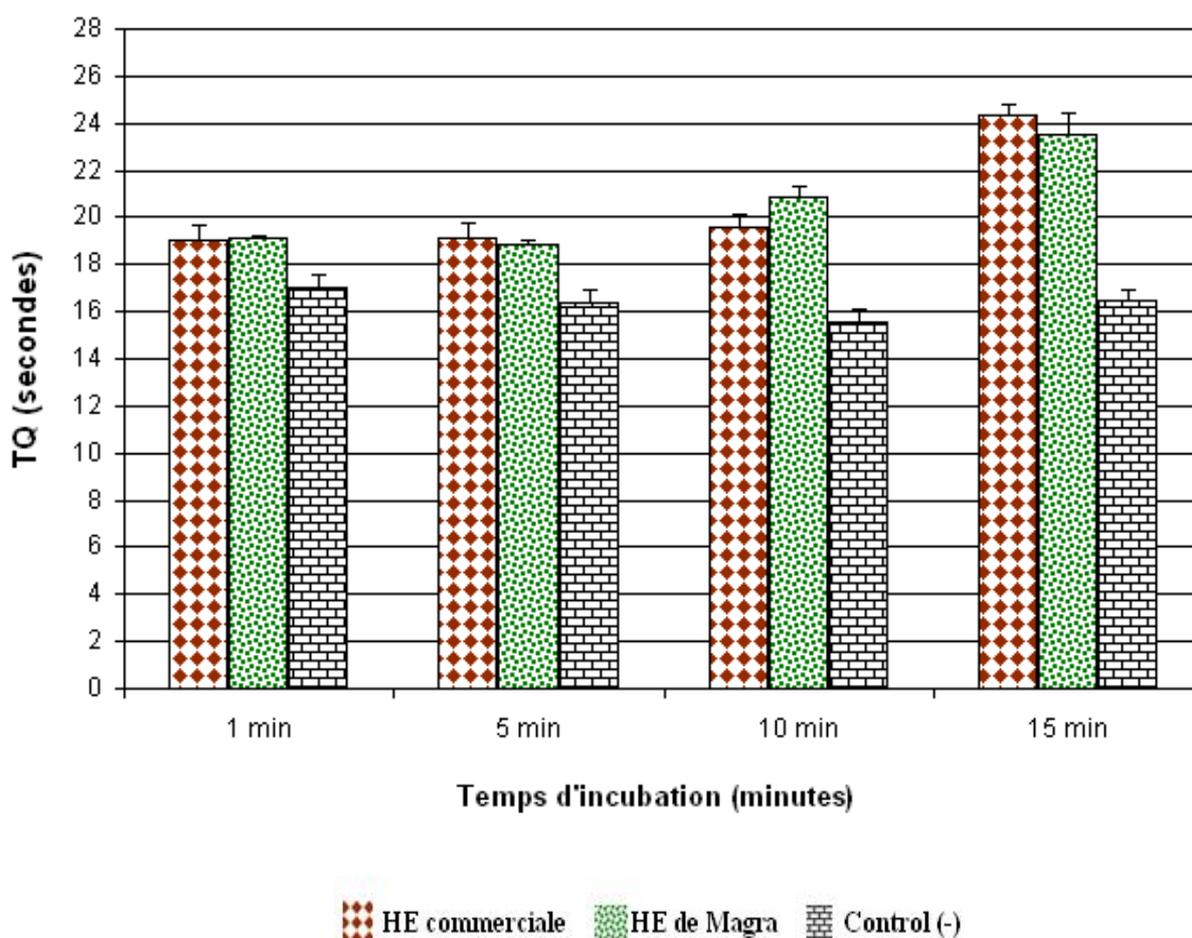


Figure 19 : Effet du temps d'incubation des huiles essentielles avec le plasma sur le TQ

En effet, l'incubation du contrôle négatif durant les différents temps (1, 5, 10 et 15 minutes) n'influe pas sur le temps de coagulation alors qu'en présence des huiles l'allongement du TQ est significatif et temps dépendant (**Figure 19**).

L'incubation pendant 15 minutes est le temps qui a permis d'obtenir une activité anticoagulante significative et élevée que celle d'incubation 1 minute, 5 minutes et 10 minutes, elle est capable d'allonger le TQ presque 1,5 (24,37 Sec) et 1,45 (23,57 Sec) fois plus que le contrôle négatif (16,2 Sec) en présence d'huile essentielle commerciale et d'huile essentielle de Magra respectivement.

Pas de différence significative entre l'incubation 1 et 5 minutes, le temps de coagulation est entre 18 et 19 secondes pour les deux huiles. Alors qu'une incubation de 10 minutes allonge le TQ à 19,3 et 21,13 secondes en présence d'huile essentielle commerciale et d'huile essentielle de Magra respectivement.

Lors de la deuxième étape, le pouvoir anticoagulant des différentes concentrations des huiles essentielles et de leurs principaux constituants a été évalué au temps d'incubation optimal (15 minutes) préalablement établi.

D'après les résultats obtenus, il ressort que les deux huiles essentielles sont capables d'allonger de manière significative ($P \leq 0,001$) et dose dépendante le TQ (**Tableau 4**).

Tableau 4: Effet de la concentration des huiles essentielles sur le TQ

L'échantillon	La concentration dans le plasma (mg/ml)	Le TQ (secondes)
Plasma standard	–	12,43± 0,057
Contrôle (-)	–	16,2± 0,46
L'huile essentielle commerciale	9,1	24,37± 0,45
	4,55	23,47± 1,25
	2,275	19,95± 0,5
	1,137	18,1± 0,28
L'huile essentielle de Magra	9,1	23,57± 0,89
	4,55	22,067± 0,4
	2,275	19,95± 0,07
	1,137	18,2± 0,28

En effet, à la faible concentration des huiles essentielles (1,137mg/ml) le TQ est légèrement allongé (18 Sec) par rapport au contrôle négatif (16,2 Sec), par contre à la concentration élevée de 9,1mg/ml le TQ est allongé à 24,37 et 23,57 secondes pour les huiles essentielles commerciale et de Magra respectivement.

D'après ces résultats et les analyses statistiques, il est évident que les deux huiles essentielles exercent aussi une activité anticoagulante significative et dose dépendante vis-à-vis de la voie exogène de la coagulation et avec un pouvoir identique. Ce pouvoir anticoagulant reste faible par rapport à celui vis-à-vis de la voie endogène de la coagulation où une concentration de 9,1mg/ml du plasma allonge le TCK presque 3 fois plus que le contrôle négatif, alors que seulement un allongement de 1,5 fois plus que le contrôle négatif est observé vis-à-vis du TQ dans cette concentration des huiles essentielles.

L'étude de l'effet des principaux constituants d'huile essentielle de la nigelle sur la voie exogène de la coagulation a révélé que les monoterpènes phénoliques « thymol et carvacrol » et les monoterpènes cétoniques « thymoquinone et carvone » sont capables d'allonger significativement le temps de Quick et de façon concentration dépendante, alors que les deux monoterpènes aliphatiques « α -pinène et p-cymène » n'exercent aucun effet inhibiteur (**Figure 20**).

En effet, le thymol et le carvacrol ont présenté une capacité anticoagulante élevée que celle des autres constituants, à la concentration de 5 mg/ml du plasma ils sont capables d'allonger le TQ 2 ($32,5 \pm 1,3$ Sec) et 2,33 fois ($37,8 \pm 1,5$ Sec) plus que le contrôle négatif respectivement. Alors que la concentration de 2,5 mg/ml allonge le temps de coagulation à $26,3 \pm 0,98$ et $27,95 \pm 1,34$ secondes respectivement.

La thymoquinone et le carvone sont aussi capables d'allonger significativement ($p < 0,05$) le TQ et avec un pouvoir identique, le temps de coagulation à la concentration de 5 mg/ml est de l'ordre de $22,3 \pm 1,4$ et $22,35 \pm 0,63$ secondes respectivement, alors que à la concentration de 2,5 mg/ml le temps de coagulation est de l'ordre de $19,8 \pm 0,42$ et $20,35 \pm 0,5$ secondes respectivement.

Par ailleurs pas de différence significative entre le temps de coagulation du contrôle négatif (16,2 Sec) et de l' α -pinène (18,9 Sec) et le p-cymène (18 Sec), ce qui confirme donc que ces monoterpènes aliphatiques n'exercent aucun effet anticoagulant.

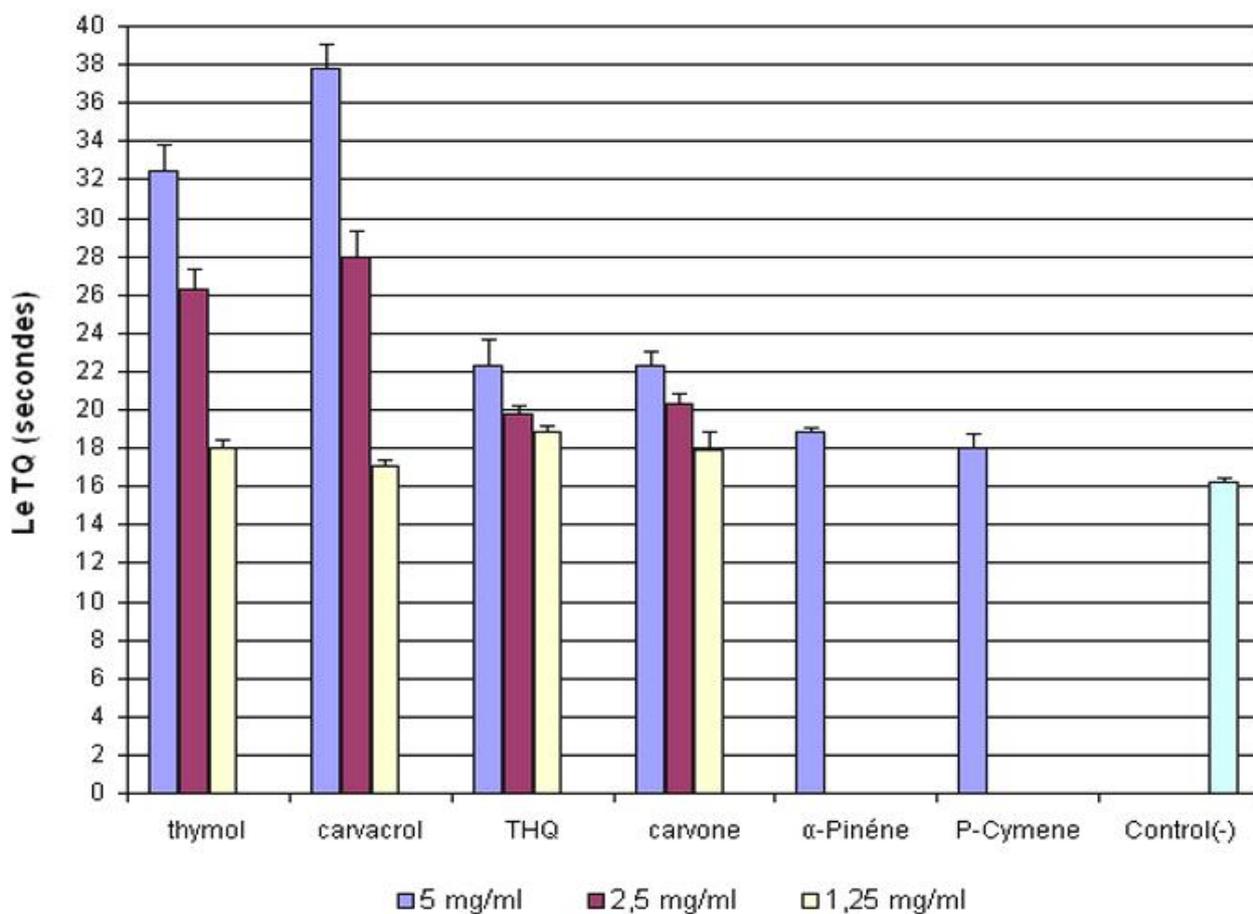


Figure 20: Effet des principaux constituants d'huile essentielle de la nigelle sur le TQ

Globalement, l'évaluation de la capacité anticoagulante des huiles essentielles de la nigelle établi par les deux tests chronométriques d'exploration de la coagulation, le TCK et le TQ démontre que ces huiles essentielles exercent une activité anticoagulante importante vis-à-vis des deux voies de la coagulation, mais cette activité est plus marquée vis-à-vis de la voie endogène que vis-à-vis de la voie exogène de la coagulation et que les constituants qui possèdent des groupements fonctionnels, particulièrement les monoterpènes phénoliques et les monoterpènes cétoniques peuvent être les composés responsables de cette activité anticoagulante.

Conclusion et perspectives

Dans le cadre de la valorisation des huiles essentielles des graines de la nigelle à travers l'étude de leurs effets préventifs contre le stress oxydant et les complications cliniques des maladies thrombotiques, nous avons préparé par hydrodistillation ces huiles à partir des graines de la nigelle cultivée dans la région de Magra (M'sila) et aussi à partir d'une huile fixe commerciale (El-Baraka).

La teneur en huiles essentielles obtenue à partir des graines la nigelle et de l'huile commerciale est de l'ordre de 0,51% et 2,2% (p/p) du poids d'huile fixe respectivement. L'analyse qualitative de ces deux huiles par CCM a révélé la présence de nombreux constituants parmi lesquels la thymoquinone, le carvone, le thymol, et/ou le carvacrol.

L'évaluation de la capacité antioxydante de ces huiles en utilisant le test du DPPH a permis d'établir que ces extraits possèdent un grand pouvoir de piéger ce radical avec des CI_{50} de l'ordre de 88,65 et 88,01 $\mu\text{g/ml}$ pour les huiles Algérienne et commerciale respectivement. Cette activité est confirmée, par ailleurs, à travers l'inhibition de la peroxydation lipidique dans le système de β -carotène/ acide linoléique dont les pourcentages d'inhibition ont été estimés à 56,13% et 66,72% pour les deux huiles respectivement. Le pouvoir réducteur de ces huiles a permis, d'autre part, de montrer une capacité antioxydante appréciable avec des CE_{50} de l'ordre de 132,56 $\mu\text{g/ml}$ pour l'huile de Magra et 133,37 $\mu\text{g/ml}$ pour l'huile commerciale.

L'évaluation de l'activité antioxydante des principaux constituants de cette huile a montré que le thymol et le carvacrol (monoterpènes phénoliques) sont plus actifs que les monoterpènes cétoniques (la thymoquinone et le carvone) et hydrocarbonés (l' α -pinène et le p-cymène). D'une manière générale les huiles essentielles de la nigelle possèdent des propriétés antioxydantes remarquables et cette activité n'est pas attribuée seulement aux composés phénoliques, mais aussi à l'effet synergique des composés non phénoliques.

L'étude de l'effet des huiles essentielles sur l'allongement du temps de coagulation des deux voies a permis d'établir ou d'asseoir que ces métabolites exercent une activité anticoagulante plus significative sur la voie endogène que sur la voie exogène. En effet, les huiles essentielles à la concentration de 9,1mg/ml sont capables d'allonger trois fois plus le TCK et 1,5 fois plus le TQ par rapport au contrôle négatif. Parmi les divers constituants de ces huiles, il semble que la thymoquinone est le composé qui exerce un grand

effet anticoagulant vis à vis de la voie endogène de la coagulation alors que le thymol et le carvacrol sont les plus actifs vis-à-vis de la voie exogène.

A la lumière de ces résultats, il ressort que les huiles essentielles des graines de la nigelle peuvent être utilisées pour la prévention des lésions induites par le stress oxydant, et comme antioxydants naturels dans les industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. Dans les complications cliniques des maladies thrombotiques, ces huiles essentielles peuvent être utilisées comme anticoagulants dans les thromboses veineuses ou en association à des antiagrégants dans les thromboses artérielles.

Ces résultats restent préliminaires et nécessitent des études complémentaires approfondies à différents niveaux de l'approche à travers une caractérisation fine et poussée de ces huiles essentielles par d'autres techniques telles que la CPG/SM ou l'HPLC/SM afin d'établir une relation structure activité. Les activités antioxydante et anticoagulante doivent être évaluées dans d'autres systèmes *in vitro* (cellulaires et enzymatiques) comme *in vivo* afin de mieux cerner les interactions moléculaires de ces huiles vis-à-vis de leurs cibles.

Références bibliographiques

- [1] **Jensen R.** Clinical Presentation of Arterial Thrombosis vs. Venous Thrombosis. *Clinical Hemostasis Review* 2002; 16(8):1-6.
- [2] **Salama HMR.** Clinical and Therapeutic Trials of *Nigella sativa*. *TAF Prev Med Bull* 2010; 9(5): 513-522.
- [3] **Ramadan MF.** Nutritional value, functional properties and nutraceutical applications of black cumin (*Nigella sativa* L): an overview. *International Journal of Food Science and Technology* 2007; 42:1208–1218.
- [4] **Tariq M.** *Nigella Sativa* seeds: Folklore treatment in modern day medicine. *The Saudi Journal of Gastroenterology* 2008; 14(3):105-106.
- [5] **Koechlin-Ramonatxo C.** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme* 2006; 20 : 165–177.
- [6] **Penna C, Mancardi D, Rastaldo R, Pagliaro P.** Cardioprotection: A radical view Free radicals in pre and postconditioning. *Biochimica et Biophysica Acta* 2009; 1787: 781–793.
- [7] **Favier A.** Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension Des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique* 2003; 108-115.
- [8] **Agarwal A, Prabakaran S, Allamaneni S.** What an andrologist/urologist should know about free radicals and why. *Urology* 2006; 67: 2–8.
- [9] **Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA.** A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2007; 18: 567–579.
- [10] **Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007; 39:44–84.
- [11] **Scheibmeir HD, Christensen K, Whitaker SH, Jegaethesan J, Clancy R, Pierce JD.** A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive and Critical Care Nursing* 2005; 21:24—28.
- [12] **Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z, Jore D.** Espèces réactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique? *L'actualité Chimique* 2003; 91-96.
- [13] **Parihar A, Parihar MS, Milner S, Bhat S.** Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. *Burns* 2008; 34:6-17.

- [14] **Carrière A, Galinier A, Fernandez Y, Carmona MC, Pénicaud L, Casteilla L.** Les espèces actives de l'oxygène: le yin et le yang de la mitochondrie. *Médecine/sciences* 2006; 22: 47-53.
- [15] **Cadenas E, Davies k.** Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radical Biology & Medicine* 2000; 29: 222–230.
- [16] **Sordillo LM, Aitken SL.** Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2009; 128: 104–109.
- [17] **Leopold AJ, Loscalzo J.** Oxidative risk for atherothrombotic cardiovascular disease. *Free Radical Biology & Medicine* 2009; 47: 1673–1706.
- [18] **Serteyn D, Mouithys-Micjalad A, Franck T, Grulke S, Lamy M, Deby C, Deby-Dupont G.** La nature chimique et la réactivité de l'oxygène. *Ann.Méd.Vét* 2002; 146:137-153.
- [19] **Sasaki M, Joh T.** Oxidative stress and ischemia-reperfusion injury in gastrointestinal tract and antioxidant, protective agents. *J.Clin.Biochem.Nutr* 2007; 40:1-12.
- [20] **Toufektsian MC, Boucher FR, Tanguy S, Morel S, Leiris JG.** Cardiac Toxicity of Singlet Oxygen: Implication in Reperfusion Injury. *Antioxidants & redox Signalling* 2001;3(1):63-69.
- [21] **Baudin B.** Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *mt cardio* 2006; 2(1): 43-52.
- [22] **Lykkesfeldt J, Svendsen O.** Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. *The Veterinary Journal* 2007; 173: 502–511.
- [23] **Kothari S, Thompson A, Agarwal A, Plessis S.** Free radicals: their benefecial and detrimental effects on sperm function. *Indian Journal of Experimental Biology* 2010; 48: 425-435.
- [24] **Roberts CK, Sindhu KK.** Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sciences* 2009; 84: 705–712
- [25] **Schulz E, Anter E, Keaney JP.** Oxidative stress, antioxidants, and endothelial function. *Curr Med Chem* 2004; 11: 1093-104.
- [26] **Kohen R, Nyska A.** Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantifcation. *Toxicologic pathology* 2002; 30: 620–650.
- [27] **Cemeli E, Baumgartner A, Anderson D.** Antioxidants and the Comet assay. *Mutation Research* 2009; 681:51–67.
- [28] **Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M.** Free radicals metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 2006; 160: 1–40.

- [29] **Masella R, Benedetto RD, Vari`R, Filesi C, Giovannini C.** Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2005; 16: 577–586.
- [30] **Machlin LJ, Bendich A.** A free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J* 1987; 1:441-445.
- [31] **Djilas SM, Jasna M, Brunet C, Cetkovic GS.** Antioxidants in food. *Chem.Ind* 2002; 56(3):105-112.
- [32] **Valco M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J.** Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2004; 266:37–56.
- [33] **Barouki R.** Stress oxydant et vieillissement. *Medecine/Sciences* 2006 ; 22: 266-72.
- [34] **Michell F, Bonnefont-Rousselot D, Mas E, Draï J, Thérond P.** Biomarqueurs de la peroxydation lipidique: aspects analytiques. *Ann Biol Clin* 2008 ; 66 (6) : 605-20.
- [35] **Cillard J, Cillard P.** Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *OCL* 2006; 13:24-29.
- [36] **Dizadaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H.** Free radical induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology & Medicine* 2002; 32: 1102–1115.
- [37] **Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC.** Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radical Biology and Medicine* 2002; 33(5): 575.
- [38] **Jay D, Hitomi H, Griendling KK.** Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Radical Biology & Medicine* 2006; 40: 183 – 192.
- [39] **Bauerova K, Bezek S .** Role of reactive oxygen and nitrogen species in etiopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Gen. Physiol. Biophys* 1999; 18: 15–20.
- [40] **Butterfield DA, Castegna A, Lauderback CM, Drake J.** Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer’s disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiol Aging* 2002; 23: 655–664.
- [41] **Jenner P.** Oxidative stress in Parkinson’s disease. *Ann. Neurol* 2003; 53: S26–S36.
- [42] **Lacut K, Deluc A, Le Moigne E, Mottier D.** Existe-t-il un lien entre la maladie artérielle athéromateuse et la maladie veineuse thromboembolique ? *mt* 2008;14(1) : 32-36.
- [43] **Franchini M, Mannucci PM.** Venous and arterial thrombosis: Different sides of the same coin?. *European Journal of Internal Medicine* 2008; 19: 476–481.

- [44] **Beaudeau JL, Delattre J, Therond P, Bonnefont-Rousselot D, Legrand D, Peynet J.** Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée* 2006;21 : 144–150.
- [45] **Viles-Gonzalez JF, Fuster V, Badimon JJ.** Thrombin/inflammation paradigms: A closer look at arterial and venous thrombosis. *American Heart Journal* 2005; 149:S20-S31.
- [46] **Fearon IM, Faux SP.** Oxidative stress and cardiovascular disease: Novel tools give (free) radical insight. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2009; 47: 372–381.
- [47] **Singh U, Jialal I.** Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology* 2006; 13:129–142.
- [48] **Rizzo M, Kotur-Stevuljevic J, Berneis K, Spinas G, Rini GB, Jelic-Ivanovic Z, Spasojevic-Kalimanovska V, Vekic J.** Atherogenic dyslipidemia and oxidative stress: a new look. *Translational Research* 2009; 153:217–223.
- [49] **Duriez P.** Mécanismes de formation de la plaque d'athérome. *La revue de médecine interne* 2004; 25: S3–S6.
- [50] **Léoni J.** Physiopathologie de l'athérosclérose-Mécanismes et prévention de l'athérombose. Thèse de doctorat (2001). Université de Franche-Comté -UFR de Pharmacie - Besançon – France.
- [51] **Napolia C, Palinska W.** Neurodegenerative diseases: insights into pathogenic mechanisms from atherosclerosis. *Neurobiology of Aging* 2005; 26:293–302.
- [52] **Marutsuka K, Hatakeyama K, Yamashita A, Asada Y.** Role of thrombogenic factors in the development of atherosclerosis. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* 2005;12:1-8.
- [53] **Colvin BT.** Physiology of haemostasis. *Vox Sanguinis* 2004; 87(Suppl. 1): S43–S46.
- [54] **Drouet L.** Coagulation et risque vasculaire artériel. *Mt médecine de la reproduction* 2005 ; 7(1): 49-51.
- [55] **Previtali E, Bucciarelli P, Passamonti SM, Martinelli I.** Risk factors for venous and arterial thrombosis. *Blood Transfus* 2011; 9:120-38.
- [56] **Lowe GD.** Common risk factors for both arterial and venous thrombosis. *British journal of haematology* 2008; 140:488-495.
- [57] **Ligue française contre la maladie veineuse thrombo-embolique.** Phlébite et embolie pulmonaire mieux les connaître pour mieux les éviter. *Bât-Thrombose veineuse* 2007; 10(4):1-16.
- [58] **Smithkline G.** La thrombose veineuse ou « phlébite ». www.gsk.fr 2010.
- [59] **Ligue française contre la maladie veineuse thrombo-embolique.** Phlébite et embolie pulmonaire, une complication redoutée de la chirurgie 2009.

- [60] **Cushman M.** Epidemiology and Risk Factors for Venous Thrombosis. *Semin Hematol* 2007; 44:62-69.
- [61] **Gentry P A.** Comparative aspects of blood coagulation. *The Veterinary Journal* 2004; 168: 238–251.
- [62] **Revel T, Doghmi K.** Physiologie de l'hémostase. *Encyclopédie Médico Chirurgicale* 2004 ; 22-009-D-20.
- [63] **Meriane F.** Manuel d'hémostase (2^{ème} Ed), Office des publications universitaires (Alger) 1991; pp: 35-36.
- [64] **Vogler AE, Siedlecki AC.** Contact activation of blood-plasma coagulation. *Biomaterials* 2009; 30:1857–1869.
- [65] **Renné T, Nieswandt B, Gailani D .**The intrinsic pathway of coagulation is essential for thrombus stability in mice. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2006; 36:148–151.
- [66] **Caen J, Lrrieu MJ, Samama M.** L'hémostase : méthodes d'exploration et diagnostic pratique (2^{ème} Ed), Expansion Scientifique Francaise (Paris) 1975; pp : 15-20.
- [67] **Aubry P, Halna du Fretay X.** Traitements antithrombotiques du syndrome coronarien aigu avec sus-décalage ST. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie* 2010; 59: 335–343.
- [68] **Crozier S, Woimant F.** Infarctus cérébral grave: quelle prise en charge ? Acute management of severe ischemic stroke. *Réanimation* 2007; 16: 441- 451.
- [69] **Helft G, Leger P.** Que retenir de la littérature récente concernant les antithrombotiques What's new on antithrombotics? *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie* 2009;58: 230–235.
- [70] **Batty P, Smith G.** Anticoagulation. *Surgery* 2010; 28(6): 243-247.
- [71] **Hirsh J, Dalen JE, Poller L, Deykin D.** Oral Anticoagulants: Mechanism of Action Clinical Effectiveness, and Optimal Therapeutic Range. *CHEST* 2001; 119:8S–21S.
- [72] **Samama MM, Gerotziafas GT, Elalamy I, Horellou MH, Conard J.** Biochemistry and clinical pharmacology of new anticoagulant agents. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002; 32:218-224.
- [73] **Girardel JM, Samama CM.** Les nouveaux antithrombotiques : une thérapeutique en mutation, des perspectives d'avenir New anticoagulant agents: the present and the future. *Réanimation* 2006; (15): 117–123.
- [74] **Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M.** Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 2008; 46: 446–475.
- [75] **Bruneton J.** Pharmagnosie : phytochimie, plantes médicinales (3^{ème} Ed), Technique et Documentation (Paris) 1999; pp: 484.

- [76] **Pourmortazavi SM, Hajimirsadeghi SS.** Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of Chromatography A* 2007; 1163:2–24.
- [77] **Maffei ME.** Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *South African Journal of Botany* 2010; 76:612-631.
- [78] **Cseke LJ, Kaufman PB, Kirakosyan A.** The Biology of Essential Oils in the Pollination of Flowers. *Natural product communications* 2007; 2 (12):1317-1336.
- [79] **Lamarti A, Badoc A, Deffieux G, Carde JP.** Biogenèse des monoterpènes. II – La chaîne isoprénique. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux* 1994; 133 : 79 – 99.
- [80] **Dubey VS, Bhalla R, Luthra R.** An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *J. Biosci.* 2003; 28(5):637–646.
- [81] **Eisenreich W, Rohdich F, Bacher A.** Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *TRENDS in Plant Science* 2001; 6(2):78-84.
- [82] **Porter N.** Essential oils and their production. *Crop & Food Research* 2001; 39.
- [83] **Pichersky E, Gershenzon J.** The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr Opin Plant Biol* 2002; 5:237-243.
- [84] Food and Agriculture organisation (FAO), industrial development organization (UNIDO). Herbs, spices and essential oil-post harvested operations in developing countries. 2005.
- [85] **Hattab ME, Culioli G, Piovetti L, Chitour SE, Valls R.** Comparison of various extraction methods for identification and determination of volatile metabolites from the brown alga *Dictyopteris membranacea*. *Journal of Chromatography A* 2007; 1143: 1–7.
- [86] **Edris AE.** Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. *Phytother Res* 2007; 21(4):308-23.
- [87] **Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M, Bruni R.** Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry* 2005; 91: 621–632.
- [88] **Ozkan G, Simsek B, Kuleasan H.** Antioxidant activities of *Satureja cilicica* essential oil in butter and *in vitro*. *Journal of Food Engineering* 2007; 79:1391–1396.
- [89] **Prieto JM, Iacopini P, Cioni P, Chericoni S.** *In vitro* activity of the essential oils of *Origanum vulgare*, *Satureja montana* and their main constituents in peroxynitrite-induced oxidative processes. *Food Chemistry* 2007; 104:889–895.
- [90] **Dordevic S, Petrovic S, Dobric S, Milenkovic M, Vucicevic D, Zizic S, Kukic J.** Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil. *Journal of Ethnopharmacology* 2007; 109:458–463.

- [91] Karaca M, Ozbek H, Him A, Tutuncu M, Akkan HA, Kaplanoglu V. Investigation of anti-inflammatory activity of bergamot oil. *Eur J Gen Med* 2007; 4(4):176-179.
- [92] Kamatou GPP, Viljoen AM, Figueiredo AC, Tilney PM, Van Zyl RL, Barroso JG, Pedro LG, Van Vuuren SF. Trichomes, essential composition and biological activities of *Salvia albicaulis* Benth. and *S. dolomitica* Codd, two species from the Cape region of South Africa. *South African Journal of Botany* 2007; 73:102–108.
- [93] Sylvestre M, Legault J, Dufour D, Pichette A. Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L. *Phytomedicine* 2005; 12:299– 304.
- [94] Kumar A, Malik F, Bhushan S, Sethi VK, Shahi AK, Kaur J, Taneja SC, Qazi GN, Singh J. An essential oil and its major constituent isointermedeol induce apoptosis by increased expression of mitochondrial cytochrome *c* and apical death receptors in human leukaemia HL-60 cells. *Chemico-Biological Interactions* 2008; 171:332–347.
- [95] Kumar A, Shukla R, Singh P, Prasad CS, Dubey NK. Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post harvest fungal infestation of food commodities. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2008; 9: 575–580.
- [96] Reichling J, Schnitzler P, Suschke U, Saller R. Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties—an Overview. *Forsch Komplementmed* 2009; 16:79–90.
- [97] El-Meleigy MA, Ahmed ME, Arafa RA, Ebrahim NA, EL-Kholany EE. Cytotoxicity of four essential oils on some human and bacterial cells. *Journal of applied sciences in environmental sanitation* 2010; 5(2): 14 3-159.
- [98] Beloued A. Plantes médicinales d'Algérie (2^{ème} Ed), Office des publications universitaires (Alger) 1998; pp : 144.
- [99] Akhram Khan M. Chemical composition and medicinal properties of *Nigella sativa* L. *Inflammopharmacology* 1999; 7(1):15-35.
- [100] Iserin P, Masson M, Restellini JP. Encyclopédie des plantes médicinales (2^{ème} Ed), Dorling Kindersley Limited (Berlin) 2001; pp : 239.
- [101] Ghedira K, Le Jeune R. Huile de nigelle cultivée, *Nigella sativa* L (Ranunculaceae). *Phytothérapie* 2010; 8: 124–128.
- [102] Atta MB. Some characteristics of nigella (*Nigella sativa* L) seed cultivated in Egypt and its lipid profile. *Food Chemistry* 2003; 83: 63–68.
- [103] Sultan MT, Butt MS, Anjumi FM, Jamil A, Akhtar S, Nasir M. Nutritional profile of indigenous cultivar of black cumin seeds and antioxidant potential of its fixed and essential oil. *Pak. J. Bot* 2009; 41(3): 1321-1330.
- [104] Ramadan MF, Mörsel TJ. Neutral lipid classes of black cumin (*Nigella sativa* L.) seed oils. *Eur Food Res Technol* 2002; 214:202–206.

[105] **Ramadan MF, Morsel TJ.** Characterization of phospholipid composition of black cumin (*Nigella sativa* L.) seed oil. *Nahrung/Food* 2002; 46(4):240 – 244.

[106] **Ramadan MF, Morsel TJ.** Analysis of glycolipids from black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.) and niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) oil seeds. *Food Chemistry* 2003; 80:197–204.

[107] **Burits M, Bucar F.** Antioxidant Activity of *Nigella sativa* Essential Oil. *Phytother. Res* 2000; 14:323–328.

[108] **Wajs A, Bonikowski R, Kalemba D.** Composition of essential oil from seeds of *Nigella sativa* L. cultivated in Poland. *Flavour Fragr. J* 2008; 23: 126–132.

[109] **Benkaci-Ali F, Baaliouamer A, Meklati BY.** Kinetic Study of Microwave Extraction of Essential Oil of *Nigella sativa* L. Seeds. *Chromatographia* 2006; 64: 227–231.

[110] **Cheikh-Rouhou S, Besbes S, Hentati B, Blecker C, Deroanne C, Attia H.** *Nigella sativa* L: Chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction. *Food Chemistry* 2007; 101:673–681.

[111] **Oshchepkova YI, Rogozhin EA, Veshkuro ON, Egorov TA, Salikhov SI.** Comparaison of extracts from seeds and spourts of *Nigella sativa*. *Chemistry of Natural Compounds* 2009; 45(2): 293-294.

[112] **Ramadan MF, Mörsel TJ.** Direct isocratic normal-phase HPLC assay of fat-soluble vitamins and β -carotene in oilseeds. *Eur Food Res Technol* 2002; 214:521- 527.

[113] **Mariod AA, Ibrahim RM, Ismail M, Ismail N.** Antioxidant activity and phenolic content of phenolic rich fractions obtained from black cumin (*Nigella sativa*) seedcake. *Food Chemistry* 2009; 116: 306–312.

[114] **Morikawa T, Xu F, Ninomiya K, Matsuda H, Yoshikawa M.** Nigellamines A₃, A₄, A₅ and C, new dolabellane-type diterpene alkaloids with lipid metabolism-promoting activities from the Egyptian medicinal food black cumin. *Chem.Pharm.Bull* 2004; 52 (4):494-497.

[115] **Ramadan MF, Kroh LW, Morsel TJ.** Radical Scavenging Activity of Black Cumin (*Nigella sativa* L.), Coriander (*Coriandrum sativum* L.), and Niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) Crude Seed Oils and Oil Fractions. *J. Agric. Food Chem* 2003; 51: 6961-6969.

[116] **Al-Majed AA, Al-Omar FA, Nagi MN.** Neuroprotective effects of thymoquinone against transient forebrain ischemia in the rat hippocampus. *European Journal of Pharmacology* 2006; 543:40–47.

[117] **Kanter M, Demir H, Karakaya C, Ozbek H.** Gastroprotective activity of *Nigella sativa* L oil and its constituent, thymoquinone against acute alcohol-induced gastric mucosal injury in rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11(42):6662-6666.

- [118] **Kanter M, Coskun O, Gurel A.** Effect of Black Cumin (*Nigella sativa*) on Cadmium-Induced Oxidative Stress in the Blood of Rats. *Biological Trace Element Research* 2005; 107:277-287.
- [119] **Ilhan N, Seçkin D.** Protective effect of *Nigella Sativa* seeds on CCL₄-induced hepatotoxicité. *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi* 2005; 19(3): 175-179.
- [120] **Al-Hader A, Aqel M, Hasan Z.** Hypoglycemic effects of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds. *Int J Pharmacog* 1993; 31: 96-100.
- [121] **El-Mahmoudy A, Shimizu Y, Shiina T, Matsuyama H, El-Sayed M, Takewaki T.** Successful abrogation by thymoquinone against induction of diabetes mellitus with streptozotocin via nitric oxide inhibitory mechanism. *International Immunopharmacology* 2005; 5: 195–207.
- [122] **Fararh KM, Shimizu Y, Shiina T, Nikami H, Ghanem MM, Takewaki T.** Thymoquinone reduces hepatic glucose production in diabetic hamsters. *Research in Veterinary Science* 2005; 79: 219–223.
- [123] **Meddah B, Ducroc R, Faouzi ME, Eto B, Mahraoui L, Benhaddou-Andaloussi A, Martineau LC, Cherrah Y, Haddad PS.** *Nigella sativa* inhibits intestinal glucose absorption and improves glucose tolerance in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2009; 121: 419–424.
- [124] **El Gazzar M, El Mezayen R, Marecki JC, Nicolls MR, Canastar A, Dreskin SC.** Anti-inflammatory effect of thymoquinone in a mouse model of allergic lung inflammation. *International Immunopharmacology* 2006; 6:1135–1142.
- [125] **Shahzad M, Yang X, Raza Asim MB, Sun Q, Han Y, Zhang F, Cao Y, Lu S.** Black seed oil ameliorates allergic airway inflammation by inhibiting T-cell proliferation in rats. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 2009; 22: 37–43.
- [126] **Mansour M, Tornhamre S.** Inhibition of 5-lipoxygenase and Leukotriene C₄ Synthase in Human Blood Cells by Thymoquinone. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 2004; 19 (5): 431–436.
- [127] **Ghannadi A, Hajhashemi V, Jafarabadi H.** An Investigation of the Analgesic and Anti-Inflammatory Effects of *Nigella sativa* Seed Polyphenols. *J Med Food* 2005; 8(4):488–493.
- [128] **Salim EI, Fukushima S.** Chemopreventive Potential of Volatile Oil from Black Cumin (*Nigella sativa* L.) Seeds against Rat Colon Carcinogenesis. *Nutrition and Cancer* 2003; 45(2): 195–202.
- [129] **Ait Mbarek L, Ait MouseH, Elabbadi N, Bensalah M, Gamouh A, Aboufatima R, Benharref A, Chait A, Kamal M, Dalal A, Ziyad A.** Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40(6):839-47.

- [130] **Shafi G, Munshi A, Hasan TN, Alshatwi AA, Jyothy A, Lei DK.** Induction of apoptosis in HeLa cells by chloroform fraction of seed extracts of *Nigella sativa*. *Cancer Cell International* 2009; 9:29.
- [131] **Ivankovic S, Stojkovic R, Jukic M, Milos M, Jurin M.** The antitumor activity of thymoquinone and thymohydroquinone *in vitro* and *in vivo*. *Exp Oncol* 2006; 28(3):220–224.
- [132] **Nair MK, Vasudevan P, Venkitanarayanan K.** Antibacterial effect of black seed oil on *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 2005; 16: 395–398.
- [133] **Toma MA, EL-Aley TS, EL-Fatratry HM.** Antimicrobial Activity of the Volatile Oil of *Nigella sativa* Linneaus Seeds. *Antimicrobial agents and Chemotherapy* 1974; 6(2):225-226.
- [134] **Aljabre M, Randhawa MA, Akhtar N, Alakloby OM, Alqurashi AM, Aldossary A.** Antidermatophyte activity of ether extract of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. *Journal of Ethnopharmacology* 2005; 101: 116– 119.
- [135] **Khattab MM, Nagi MN.** Thymoquinone Supplementation attenuates Hypertension and Renal Damage in Nitric Oxide deficient Hypertensive Rats. *Phytother.Res* 2007; 21:410–414.
- [136] **EL Tahir K, Al Ajmi MF, Al Bakairi AM.** Some cardiovascular effects of the dethymoquinonated *Nigella sativa* oil and its major components α -pinène and p- cymene in rats. *Saudi pharmaceutical journal* 2003; 11(3):104-110.
- [137] **Al-Naqeep G, Al-Zubairi AS, Ismail M, Zulkhairi A, Mohd Esa N.** Antiatherogenic Potential of *Nigella sativa* Seeds and Oil in Diet-Induced Hypercholesterolemia in Rabbits. *eCAM* 2010; 1-9.
- [138] **Mohamad MD, Daradka H.** Effects of Black Seeds (*Nigella Sativa*) on Spermatogenesis and Fertility of Male Albino Rats. *Research Journal of Medicine and Medical Sciences* 2009; 4(2): 386-390.
- [139] **Boskabady MH, Kiani S, Jandaghi P, Ziaei T, Zarei A.** Comparison of antitussive effect of *Nigella sativa* with codeine in Guinea Pig. *Iran J Med Sci* 2003; 28(3):111-115.
- [140] **Boskabady MH, Keyhanmanesh R, Saadatloo MA.** Relaxant effects of different fractions from *Nigella sativa* L on guinea pig tracheal chains and its possible mechanisms. *Indian journal of experimental biology* 2008; 46:805-810.
- [141] **Touchstone J, Dobbins MF.** Practice of thin layer chromatography (2^{ème} Ed), wiley-Interscience(Berlin) 1983; pp: 1-13.
- [142] **Salami E, Kordali S, Kotan R, Cakir A, Kaya Y.** Chemical compositions antimicrobial and herbicidal effects of essential oils isolated from Turkish *Tanacetum aucheranum* and *Tanacetum chiliophyllum* var. *chiliophyllum*. *Biochemical Systematics and Ecology* 2007;35:569-581.

- [143] Hildebert W, Sabine B, Zgainski EM. Plant drug analysis: A thin layer chromatography (2^{ème} Ed), Springer Verlag (Berlin Heidelberg) 1983; pp: 5-8, 299.
- [144] Ramadan MF. Rapid antiradical method for screening deep fried oils. *Journal of Consumer Protection and Food Safety* 2010; 5: 47-50.
- [145] Schlesier K, Harwat M, Bohm V, Bitsch R. assessment of antioxidant activity by using different *in vitro* methods. *Free radical research* 2002; 36(2):177-187.
- [146] Laguerre M, Lecomte J, Villeneuve P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research* 2007; 46: 244–282.
- [147] Dapkevicius A, Venskutonis R, Van Beek TA, Linssen PH. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1998; 77: 140–146.
- [148] Barros L, Ferreira MJ, Queiros B, Ferreira I.C.F.R, Baptista P. Total phenols, ascorbic acid, b-carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry* 2007; 103: 413–419.
- [149] Prasad KN, Yang B, Dong X, Jiang G, Zhang H, Xie H, Jiang Y. Flavonoid contents and antioxidant activities from Cinnamomum species. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2009; 10: 627–632.
- [150] Athukorala Y, Lee KW, Kim SK, Jeon YJ. Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. *Bioresource Technology* 2007; 98: 1711–1716.
- [151] Caquet R. 250 examens de laboratoire : prescription et interprétation (9^{ème} Ed), Masson (Paris) 2004; pp:388-389.
- [152] Bourgou S, Ksouri R, Skandranf I, Chekir-Ghedira L, Marzouk B. Antioxidant and antimutagenic activities of the essential oil and methanol extract from Tunisian *Nigella sativa* L.(Ranunculaceae). *Ital. J. Food Sei* 2008;20(2):191-201.
- [153] Benkaci-Ali F, Baaliouamer A, Meklati BY. Kinetic Study of Microwave Extraction of Essential Oil of *Nigella sativa* L.Seeds. *Chromatographia* 2006; 64:227–231.
- [154] Hamrouni-Sellami I, Kchouk ME, Marzouk B. Lipid and aroma composition of black cumin (*Nigella sativa* L) seeds from Tunisia. *Journal of food biochemistry* 2008; 32: 335-352.
- [155] Lutterodt H, Luther M, Slavin M, Yin JJ, Parry J, Gao JM, Yu L. Fatty acid profile, thymoquinone content, oxidative stability, and antioxidant properties of cold-pressed black cumin seed oils. *LWT - Food Science and Technology* 2010; 43: 1409- 1413.

- [156] Nickavar B, Mojab F, Javidnia K, Amoli MR. Chemical Composition of the Fixed and Volatile Oils of *Nigella sativa* L from Iran . *Z. Naturforsch* 2003; 58c:629-631.
- [157] Sharma OP, Bhat KT. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry* 2009;113: 1202–1205.
- [158] Mastelic J , Jerkovic I, Blazevic I, Poljak-Blazi M, Borovic S, Bace II, Smreckiv, Žarkovic Z, Brcic-Kostic K, Vikić-Topić D, Müller N. Comparative Study on the Antioxidant and Biological Activities of Carvacrol, Thymol, and Eugenol Derivatives. *J. Agric. Food Chemistry* 2008; 56(11):3989-96.
- [159] Tepe B, Sihoglu-Tepe A, Daferera D, Polissiou M, Sokmen A. Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Clinopodium vulgare* L. *Food Chemistry* 2007; 103: 766–770.
- [160] Kulisic T, Radonic A, Katalinic V, Milos M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry* 2004; 85: 633– 640.
- [161] Staniek K, Gille L. Is thymoquinone an antioxidant? *BMC Pharmacology* 2010; 10 (Suppl 1):A9
- [162] Badary OA, Taha RA, Gamal El-Din AM, Abdel-Wahab MH. Thymoquinone Is a Potent Superoxide Anion Scavenger. *Drug and Chemical Toxicology* 2003; 26(2): 87–98.
- [163] Hinneburg I, Damien Dorman HJ, Hiltunen R. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chemistry* 2006; 97: 122–129.
- [164] Tepe B, Sokmen M, Akpulat HA, Daferera, D, Polissiou, M, SokmenA. Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp *Sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*. *Journal of Food Engineering* 2005; 66(44): 447–454.
- [165] Sarikurkcü C, Bektas Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Harmandar M. Studies on the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Marrubium globosum* subsp. *Globosum* (lamiaceae) by three different chemical assays. *Bioresource Technology* 2008; 99: 4239–4246.
- [166] Singh G, Marimuthu P, de Heluani CS, Catalan C. Chemical constituents and antimicrobial and antioxidant potentials of essential oil and acetone extract of *Nigella sativa* seeds. *J Sci Food Agric* 2005; 85:2297–2306.
- [167] Radonic A, Milos M. Chemical Composition and *In Vitro* Evaluation of Antioxidant Effect of Free Volatile Compounds from *Satureja montana* L. *Free Radical Research* 2003; 37 (6): 673–679.
- [168] Mansour MA, Ginawi OT, El-Hadiyah T, El-Khatib AS, Al-Shabanah OA, Al-Sawaf HA. Effects of volatile oil constituents of *Nigella sativa* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice: evidence for antioxidant effects of thymoquinone. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol* 2001;110: 239-251.

- [169] **Gholivand BM, Rahimi-Nasrabadi M, Batooli H, Ebrahimabadi AH.** Chemical composition and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of *Psammogeton canescens*. *Food and Chemical Toxicology* 2010; 48: 24–28.
- [170] **Hazzit M, Baaliouamer A, Veríssimo AR, Faleiro ML, Miguel MG.** Chemical composition and biological activities of Algerian Thymus oils. *Food Chemistry* 2009;116: 714– 721.
- [171] **Gerotziafast GT.** Le test de génération de thrombine un test utile pour la recherche et nécessaire pour une exploration moderne de l'hémostase. *Hémostase* 2007;24: 37-43.
- [172] **Athukorala Y, Jung WK, Vasanthan T, Jeon YJ.** An anticoagulative polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of *Ecklonia cava*. *Carbohydrate Polymers* 2006; 66:184–191.
- [173] **Zhang HJ, Mao WJ, Fang F, Li HY, Sun HH, Chen Y, Qi XH.** Chemical characteristics and anticoagulant activities of a sulphated polysaccharide and its fragments from *Monostroma latissimum*. *Carbohydrate Polymers* 2008; 71:428– 434.
- [174] **Ballabeni V, Tognolini M, Bertoni S, Bruni R, Guerrini A, Rueda GM, Barocelli E.** Antiplatelet and antithrombotic activities of essential oil from wild *Ocotea quixos* (Lam) Kosterm. (Lauraceae) calices from Amazonian Ecuador. *Pharmacological Research* 2007; 55: 23–30.
- [175] **Tognolini M, Ballabeni V, Bertoni S, Bruni R, Impicciatore M, Barocelli E.** Protective effect of *Foeniculum vulgare* essential oil and anethole in an experimental model of thrombosis. *Pharmacological Research* 2007; 56: 254–260.
- [176] **Tripodi A.** Tests of Coagulation in Liver Disease. *Clin Liver Dis* 2009; 13:55–61.