

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-Chimique
Filière : Science Biologie
Option : Biochimie appliquée



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Activité anti-oxydante et anti-
inflammatoire de la nigelle**

Présenté par :

M^{elle} AITEUR Kahina et M^{elle} AMRANI Hadjer

Soutenu le : 21/06/2017

Devant le jury composé de :

M^{me} DAHDOUH A.	MAA	Présidente
M^{me} KHETTAL B.	MCA	Encadreur
M^{me} SAADAOUI-BOUGOFFA K.	MCB	Examinatrice

Année universitaire : 2016 / 2017

Remerciements

*Le thème de ce mémoire a été proposé et réalisé sous la direction du Dr Khettaf Bachra du laboratoire de biotechnologie végétale et ethnobotanique. Faculté des sciences de la nature et de la vie, université A.MIRA
-Bejaia.*

Avant tout, nous tenons à remercier infiniment et profondément ALLAH LE TOUT PUISSANT pour nous avoir donné le courage, la volonté, la santé et surtout la patience pour achever ce travail.

Nos remerciements et notre vive reconnaissance à notre promotrice Dr Khettaf Bachra, pour avoir accepté de nous encadrer et dirigé ce travail par excellence. Aussi bien pour ces conseils judicieux, sa disponibilité, son attention et pour l'ambiance sympathique qu'elle a créé lors de la réalisation de ce travail. Soyez assuré madame, de notre estime et de nos profonds respects.

Nos remerciements vont aux membres de jury, M^{me} DAHDOUH A et M^{me} SAADAOUI K pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Notre gratitude s'adresse aussi à M^{lle} MAMASSE HABIBA, ingénieur du laboratoire. Pédagogique d'enzymologie (FSN^V Bejaia) pour avoir été à notre écoute et avoir mis à notre disposition le matériel et les moyennes nécessaires à la réalisation de ce travail.

Nos remerciements s'adressent aussi à tous nos enseignants qui nous ont transmis leur savoir, ce qui nous a permis d'acquérir les connaissances indispensables pour réaliser ce mémoire.

Nous témoignons enfin notre reconnaissance à tous ceux et celles ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de notre mémoire de fin de cycle.



Dédicace

A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, J'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère qui ma apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.

A mon cher père qui ma appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, pour son sacrifice ses conseils et ses encouragements.

A ma sœur: Ferouze

A mes frères: Faride, Younes, Houssine, Talal

A mon fiancé: Ali

Spécialement à mes fidèles amies :

Kawther, Ahleme, Kenza, Sabrina, Sarra, Khalissa, Oumelkhire

A ma chère Binôme « Kahina » qui a partagée avec moi les moments difficiles de ce travail et sa famille.

A toute ma famille, proche ou éloignée.



HADJER

Dédicace

Je tiens à remercier dieu, qui illumine ma route à chaque lever, qui me guide sur le droit chemin, qui approfondit et renforce ma foi et qui a fait de moi ce que je suis, par

Bismi Allah El Rahmane El Rahim !

Je dédie ce travail à :

A mes très chers parents

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon grand amour, mon estime, ma reconnaissance et ma profonde affection. Je ne saurais vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi et ce que faites jusqu'à présent. Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue Vie.

A mes frères Tamen, Seddik, Nassim et ma sœurs Mouna.

A mon très cher fiancé Riad et sa famille

A toute ma famille

A ma chère binôme hadjer et sa famille

A mes copines : Sarra, Sabrina, khalissa et oumelkhir

Aux étudiants de la promotion de biochimie appliquée 2016/2017

A ma promotrice Dr KHETTAL B. Merci

Enfin je le dédie à moi même



AITEUR Kahina

ABTS: Aide 2,2'-azinobis (3enthlbenzothianzoline-6-sulfonique)

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AGPI : Acides Gras Polyinsaturés

AINS : Anti -Inflammatoires Non Stéroïdiens

AIS: Anti -Inflammatoires Stéroïdiens

BHA : Butylated Hydroxyanisol Acid

CAM : Complexe d'Attaque Macrophage

CD4 : Cluster de Différenciation 4

CD8 : Cluster de Différenciation 8

COX-1: Cyclooxygénase-1

COX-2: Cyclooxygénase-2

DO : Densité Optique

EAG : Equivalent Acide Gallique

EQ : Equivalent Quercétine

ERN : Espèces Réactives de Nitrogène

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

GR: Récepteur des Glucocorticoïdes

GSH: Glutathion réduit

GSSH: Glutathion oxydé

IC50: Concentration Inhibitrice à 50 %

IL1: Interleukine-1

IL10: Interleukine-10

IL13: Interleukine-13

IL-1 β : Interleukine-1beta

IL4: Interleukine-4

IL6: Interleukine-6

IκB-α: Inhibitor of nuclear factor-kappa B

LB : Lymphocytes B

LT: Lymphocytes T

NF-κB: Nuclear Factor-kappa B

NK : Naturelle Killer

NOS : Nitrique Oxyde Synthase

PAF : Facteur Activateur des Plaquettes

PGE2 : Prostaglandine E2

RL : Radicale Libre

SOD : Super Oxyde Dismutase

TEAC : Capacités Antioxydante Equivalente de Trolox

TNFα: Tumor necrosis factor alpha

TQ: Thymoquinone

UV : Ultra Violet

Liste des figures

Numéro de la figure	Titre	Page
01	Processus de transfert des électrons dans la mitochondrie	09
02	L'oxydation des protéines après attaque radicalaire	11
03	Lésions de l'ADN formés par attaque radicalaires	11
04	Mécanisme de peroxydation lipidique	12
05	Les pathologies associer aux espèces réactives	12
06	La réponse inflammatoire aigue : (A) initiation, (B) amplification, (C) réparation	15
07	Schéma représentant l'action des AIS et AINS	18
08	Protocol de dosage des polyphénols totaux d'extrait de nigelle	21
09	Protocol de dosage des flavonoïdes d'extrait de nigelle	22
10	Protocol du test de l'ABTS	24
11	Protocol de pouvoir réducteur	25
12	Courbe d'étalonnage A : l'acide gallique et B : la Quercitine	28
13	Pourcentages d'inhibition du radical ABTS ^{•+} en présence de (A : l'extrait de nigelle, B : Trolox)	30
14	Pouvoir réducteur de l'extrait de graine de nigelle (A) et de la BHA (B) à différents concentrations	31
15	Variation d'absorbance à 660nm de l'ovalbumine incubée à 70°C en fonction du temps pour différentes concentrations de la protéine	32
16	Variation des absorbances à 660nm de l'ovalbumine incubé à 70°C en fonction du temps pour différentes concentrations d'éthanol	33
17	Variation des DO de l'ovalbumine incubé à différentes températures (Ambiante, 60°C, 70°C et 80°C) en fonction du temps, Mesurer à λ : 660nm	34
18	Taux d'inhibition de la dénaturation d'ovalbumine à différentes concentrations d'extraits méthanoliques des graines de nigelle	35

Liste des tableaux

Numéro de tableaux	Titre	Page
I	Classification des nigelles	03
II	Description botanique de quelques espèces de nigelles	04
III	Les espèces réactives de l'oxygène les plus importants	08
IV	Espèces réactives de nitrogène	09
V	Les systèmes de défense antioxydant	13
VI	Les cellules de l'inflammation	16
VII	Les médiateurs de l'inflammation	17
VIII	Quelques exemples de plantes médicinales douées d'activité anti-inflammatoire	19
IX	Rendement d'extraction, teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes des graines de nigelle	29

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....01

Revue bibliographique

Chapitre I

I. Généralités sur les nigelles 03

I.1. Classification et description 03

I.2. Description botanique 03

I.3. Compositions chimiques et biochimiques des nigelles 06

I.4. Activités biologiques et propriétés pharmacologiques 06

II. Radicaux libres, stress oxydatif et antioxydants 08

II.1. Espèces réactives de type oxydant en biologie 08

II.1.1. Espèces réactives de l'oxygène (ERO) 08

II.1.2. Espèces réactives de nitrogène (ERN) 09

II.1.3. Principales sources des espèces réactives 09

II.2. Stress oxydatif 10

II.2.1. Définition et origine 10

II.2.2. Conséquences biologiques du stress oxydatif et implication pathologique 10

II.3. Antioxydants 12

II.3.1. Définition 12

III. Inflammation et anti-inflammatoires 14

III.1. Mécanismes cellulaires et moléculaires de l'inflammation 14

III.1.1. Cellules de l'inflammation 16

III.1.2. Médiateurs de l'inflammation 17

III.2. Anti-inflammatoire et leurs cibles pharmacologiques 18

III.2.1. Anti-inflammatoires stéroïdiennes (ANS) ou glucocorticoïdes 18

III.2.2. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) 18

III.2.3. Anti-inflammatoires d'origine végétale 19

Matériel et méthodes

Chapitre II

I. Préparation de la poudre végétal	20
I.1.Préparation de l'extrait méthanolique	20
II. Dosage des polyphénols	20
II.1. Dosage des phénols totaux	20
II-2-Dosage des flavonoïdes.....	22
III. Mesure de l'activité antioxydant de l'extrait de nigelle	23
III.1. Test anti-radicalaire à L'ABTS	23
III.2. Pouvoir réducteur	24
IV. Evaluation de l'effet anti-dénaturant des protéines.....	26
IV.1. Extraction de l'ovalbumine	26
IV.2. Mise au point du test de dénaturation de l'ovalbumine	26
IV.3. Mesure de l'activité anti-dénaturante de l'extrait de nigelle	27

Résultat et discussion

Chapitre III

I. Taux d'extraction	28
II. Taux des composés phénoliques.....	28
III. Activités antioxydants d'extrait méthanolique des graines de Nigelle	29
III. 1. Activité anti-radicalaire a l'ABTS	29
III. 2.Teste de pouvoir réducteur	30
IV. Effet inhibiteur de la thermo-dénaturation de l'ovalbumine.....	31
IV. 1. Paramètres influençant la dénaturation thermique de l'ovalbumine.....	31
IV.2. Effets inhibiteurs de la dénaturation thermique de l'ovalbumine	34
V. Discussion générale	36
Conclusion	38

Références bibliographiques

Introduction

A travers des siècles passés, les remèdes naturels et surtout les plantes médicinales furent la principale, voir l'unique source de remède. Un grand nombre de plante médicinales et aromatiques et des plantes épices cultivées ou spontanées possèdent des propriétés biologiques très intéressantes qui trouvent application dans divers domaines, dont en médecine, pharmacie, cosmétologie et en agriculture. Cependant, l'évaluation des effets biologiques de ces plantes ont démontrés que certains ont des utilisations thérapeutiques présente actuellement une tache très intéressante (**Hennebelle et al., 2007**).

Si nous comprenons la vraie nature d'une graine, la somme de vitalité (passée, présente et future) qui y est contenue, il ne semblera pas trop exagéré de dire qu'elle est capable de vaincre des bactéries résistantes aux antibiotiques, de guérir un corps empoisonné aux produits chimiques ou de stimuler la régénération de cellules productrices d'insuline dans le diabète... (**Errajraji et al.,2010**). La graine de nigelle occupe une place privilégiée dans la phytothérapie, elle était cultivée depuis l'Antiquité pour ses propriétés médicinales. La tradition lui attribue des propriétés thérapeutiques et leur activité et richesse en composées bioactives, ont une place particulière dans l'ensemble des produits aromatiques (**Heshmati et Namazi, 2015**). Les plus anciennes archives pour sa culture et son usage remontent à l'ancienne Égypte. De l'huile de nigelle a été retrouvée en fait dans la tombe du pharaon Toutankhamon, elle remonterait à approximativement 3300 ans. Dans la culture arabe, la graine est très connue sous le nom de Habbat El baraka, ce qui veut dire "graine de la bénédiction. Aussi que le prophète Mohamed disait de lui que "c'est un remède pour toutes les maladies sauf la mort" La graine de nigelle est donc une source très intéressante pour les substances bioactives à intérêt thérapeutique. L'étude des propriétés biologiques des constituants de cette graine et l'identification de ces substances qui y sont responsables constituent des axes de recherche à investir afin de valoriser cette matrice végétale dans différents domaines d'application notamment dans le domaine pharmaceutique (**Heshmati et Namazi, 2015**).

Dans cet axe de recherche globale sur les plantes douées de propriétés thérapeutiques s'insère l'objectif de notre thème de mémoire de master dont le but est l'évaluation des pouvoirs antioxydant et anti-inflammatoire des composés phénoliques de nigelle.

Dans le présent manuscrit, nous avons procédé dans un premier chapitre à faire une synthèse bibliographique qui traite des généralités sur les nigelles notamment sur leurs compositions chimique et biochimique, leurs effets thérapeutique et pharmacologique ; généralités sur les radicaux libres, le stress oxydatif et les antioxydants et enfin généralités sur l'inflammation et les anti-inflammatoires. Dans le chapitre II, l'étude expérimentale menée pour répondre à l'objectif du thème de master développé est décrite. L'étude réalisée a pour objets : l'extraction et dosage des polyphénols, l'évaluation de l'activité anti-oxydante par le test antiradicalaire à l'ABTS et par la mesure du pouvoir réducteur d'un complexe ferrique, l'évaluation du potentiel anti-inflammatoire par le test de l'inhibition de la thermo-dénaturation des albumines. Les résultats obtenus seront décrits et discutés dans le chapitre III.

I. Généralités sur les nigelles

I.1. Classification et description

Les nigelles sont des plantes herbacées annuelles de la famille des renonculacées, appartenant au genre «*Nigella* ». dérivent du mot latin «*Nigellus* » qui signifie noirâtre, la couleur noir de ces graines. Elles sont largement cultivées en Europe de l'Est, au Moyen-Orient, en Asie occidentale et en Nord de l'Afrique (Zohary, 1983)

Les nigelles sont utilisées comme plantes médicinales et plantes ornementale, ou comme épices. Le genre *Nigella* contient plus de 116 espèces, les espèces les plus répandues de ce genre sont : *Nigella sativa*, *Nigella damascena*, *Nigella arvensis*, *Nigella hispanica* et *Nigella oreintalis* (Tableau I) (Zohary, 1983)

Tableau I : Classification des nigelles (Guignard, 2001).

Rang	Nomenclature
Règne	Végétale
Sous règne	Cormophyte
Supra embranchement	Rhizophyte
Embranchement	Spermaphytes
Sous-Embranchement	Angiospermes
Classe	Eudicotylédones
Sous classe	Audicots archaïques
Ordre	Ranunculales
Famille	Renonculacées
Sous famille	Helloboroidées
Genre	<i>Nigella</i>
Espèce	<i>N.sativa</i> , <i>N.damascena</i> , <i>N.Arvensis</i> , <i>N.hispanica</i> , <i>N. oreintalis</i> , <i>N.segetalis</i> M, <i>N.ciliaris</i> , <i>N.oxypetala</i> , <i>N.turcica</i> .

I.2. Description botanique

Les différentes espèces de nigelles ont presque des caractéristiques communes, plantes annuelles à feuilles très découpées, et fleurs terminales et solitaires, les fruites sont des capsules soudées, qui contient dans graines presque tous de couleurs noires. Ces plantes possèdent aussi des particularités spécifiques telles que la longueur de tige, la couleur des fleurs et la forme des graines (Tableau II) (Zohary, 1983).

I.3. Compositions chimiques et biochimiques des nigelles

Les graines de nigelle contiennent de nombreux composants naturels, vitamines (B, C, E...), acides aminés, protéines, glucides, oligoéléments (Fe, Zn, Cu...), alcaloïdes, saponines, acides gras insaturés, aussi bien que des huiles fixes et volatiles et de nombreux autres composés. En fonction des conditions géographique et climatique ou la plante est cultivée, les proportions de ces composés varient significativement d'une espèce à une autre (**Al Jassir, 1992**).

De par leur bonne valeur nutritive, les graines de *Nigella sativa L* sont très utilisées dans l'alimentation. En effets, elles contiennent généralement une teneur relativement important en glucides 33-34%, en lipides 30-70% et en protéine 16-21% (**Atta, 2003**). Des études sur *Nigella damascena L* montre que sa graine est aussi riche en lipides (30-35%), en saponosides triterpénique (1,5%) et au huiles essentielles (0,4 à 2,5%) (**Fico et al., 2001**).

I.4. Activités biologiques et propriétés pharmacologiques

Les propriétés curatives de la nigelle sont connues depuis fort long temps. Elle a été utilisée pour ses étonnantes qualités de guérison de nombreuses pathologies et les bienfaits validés par la littérature biomédicale et la science moderne a confirmé ses effets bénéfiques. La nigelle a été signalée pour ses différentes propriétés biologique comme antioxydant, antimutagène, hépatoprotecteurs et anti-inflammatoire et autres (**Demir et al., 2006**).

Plusieurs travaux *in vivo* et *in vitro* sur l'étude des propriétés biologiques et thérapeutiques de nigelle, notamment sur les effets dus aux extraits de la graine de ce genre ainsi qu'à ses principaux constituants comme la thymoquinone et les huiles essentielles, dont les bienfaits sur la santé sont largement démontrés par la science, En synergie les uns avec les autres, ces composants permettent de booster le système immunitaire, préviennent les infections et les allergies . En outre l'huile des nigelles est un complément alimentaire indiqué pour faire le plein d'énergie (**Demir et al., 2006**). Il a été démontré que l'huile essentielle de *N.sativa*, *N.damascena*, *N.Arvensis* inhibe la peroxydation lipidique non enzymatique dans les liposomes, exerçant ainsi des effets antioxydants par leur capacité à piéger les radicaux libres (**Badary et al., 2003**).



D'autres travaux rapportent que la thymoquinone (TQ) est le principe actif essentiel responsable de l'effet anti-inflammatoire des extraits de *N.sativa*, la TQ s'est avérée être une




molécule anti-inflammatoire et anticoagulante. En effets, la TQ exerce un puissant inhibiteur de la thromboxane B2 et des leucotriènes B4 par l'inhibition respective des cyclooxygénase et lipooxygénase (**Badary et al., 2003**).

La graine de nigelle présente des effets antimicrobiens. Les différents extraits aqueux ou organiques des graines de plusieurs espèces de nigelle présentent un large spectre d'inhibition vis-à-vis de nombreuses souches bactériennes (*Pseudomonas aeruginosa* et *staphylococcus aureus*). (**Mashhadian et Rakhshandeh., 2005**).

L'huile fixe des graines de *N.damascena* est responsable d'un important effet analgésique dû à la présence d'un principe opioïde présente dans cette huile. L'extrait méthanolique de ces graines possède une activité ostrogénique causé par deux composés phénolique (3,4-dihydroxy- β -phénéthylalcool et 2,4-dihydroxyphénylacétic), qui se fixent au récepteur d'œstrogène et exerce le même effet que l'œstrogène dans la régulation de cycle menstruel de la femme (**Agradi et al., 2002**).

Tableau II : Description botanique de quelque espèce de nigelles. (Gamze et al., 2006) (Zohary, 1983)

Espèces	Description	Photo
<p><u>1-Nigella</u> <u>sativa L</u></p> <p>(<i>N. cretica</i>, <i>N. indica</i>).</p>	<p><u>Tige</u> : est très ramifiée. De couleur vert claire à vert foncée.</p> <p><u>Feuilles</u> : sont plumeuse et a lobes étroits, sont lancéolées à linéaires et présentent des angles nectarifères.</p> <p><u>Fleurs</u> : sont solitaires, axillaires et terminales. Sont petites à cinq pétales blanchâtres et cinq sépales pétaloïdes de couleur bleu claire et nombreuses étamines insérées sur le réceptacle.</p> <p><u>Fruits</u> : constitués des follicules soudés, s'ouvrant au sommet par une fente interne.</p> <p><u>Graines</u> : sont ovoïdes, de couleur noir mat, présentent 3ou 4 angles. Elles ont une base large et la face supérieure est finement granuleuse.</p>	
<p><u>2-Nigella</u> <u>damascena L</u></p> <p>(<i>N. coerulea</i>, <i>N. multifida</i>).</p>	<p><u>Tige</u> : est dressée, anguleuse simple ou ramifiée.</p> <p><u>Feuilles</u> : sont bi-tri-pennées avec des segments très fins.</p> <p><u>Fleurs</u> : Sont terminales, solitaires. Les sépales sont griffues, pétaloïdes, bleu très claire, rarement blanchâtres, voir même rose avec un nombre variable. Les pétales sont environ de 8, plus petites que les sépales.</p> <p><u>Fruits</u> : sont des capsules globuleuses et lisses.</p> <p><u>Graines</u> : sont ovoïdes ridées, noires, à 3 angles, transversalement côtelées.</p>	

<p><u>3-Nigella</u> <u>orientalis L</u> (<i>Nigellastrum flavum</i>, <i>Nigellastrum orientale</i>).</p>	<p><u>Tige</u> : est mois rameuse, les pistils plus longs que la corolle. <u>Feuilles</u> : sont très fines et les supérieures non involucrantes. <u>Fleurs</u> : Sont de couleur jaune vif. Les pétales sont cylindriques, très courtes, au nombre de 8-10. <u>Fruits</u> : Sont des follicules comprimés, oblong et plat. Les carpelles plus longs que les becs <u>Graines</u> : sont discoïdes, aplaties. De couleur brun jaunâtre.</p>	
<p><u>4-Nigella</u> <u>arvensis L</u> (<i>N. aristata</i>, <i>N. cretensis</i> <i>N. tenuiflora</i>, <i>N. tuberculata</i>)</p>	<p><u>Tige</u> : est dressée ou étalée, à rameaux écartés. <u>Feuilles</u> : Sont multitudes pennée en segments très étroites. <u>Fleurs</u> : Sont terminale et solitaire. Les sépales sont ovales, bleu claire, spatulés. Des nectaires se forment de gobelets, courts. <u>Fruits</u> : Follicules soudé, assez grand et non gonflés, à 3 nervures dorsales. <u>Graines</u> : sont fines granuleuses.</p>	
<p><u>5-Nigella</u> <u>hispanica L</u> (<i>N. amoena</i>, <i>N. gallica</i>, <i>N. confusa</i>).</p>	<p><u>Tige</u> : est dressé, cannelée, rude et peu ramifiée. <u>Feuilles</u> : sont fins et découpé <u>Fleurs</u> : Sont solitaires, violet pourpré, à 5 pétales étroites-elliptiques, nectaires bilabiés. les étamines sont visibles, rouge violet foncé. <u>Fruits</u> : Sont des follicules soudés, moins gonflés et plus nervurés. <u>Graines</u> : sont lisses marbrées et brunâtre.</p>	

--	--	--

II. Radicaux libres, stress oxydatif et antioxydants

II.1. Espèces réactives de type oxydant en biologie

Les espèces réactives de type oxydant en biologie comme les radicaux libres et leurs précurseurs, rendus chimiquement très réactifs par la présence d'électrons non appariés. dont un radical libre (RL) est un espèce chimique (atome ou molécule), capable d'avoir un ou plusieurs électrons célibataires et la demie vie est très courte (Afonso et al., 2007).

Les radiaux libres qui proviennent de l'oxygène sont appelés espèces réactives de l'oxygène (ERO). Alors, que les RL qui sont génères de la réaction de l'oxygène avec le nitrogène sont appelés espèces réactives de nitrogène (ERN) (Penna et al., 2009).

II.1.1. Espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Les ERO constituent une classe important produite dans les systèmes vivants. Les ERO radicalaires sont $O_2^{\circ-}$, OH° , O_2^1 et non radicalaire est H_2O_2 (Tableau III) (Seifried, 2007).

Tableau III: Les espèces réactives de l'oxygène les plus importants (Seifried, 2007).

ERO radicalaires	
Anion super oxyde ($O_2^{\circ-}$)	-C'est un radical relativement issu de la réduction mono- électronique (addition d'un seul électron). selon la réaction : $O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\circ-}$ -Participe à l'inactivation des virus et bactéries
Radical hydroxyle (OH°)	-Il est formé à partir de ($O_2^{\circ-}$) et (H_2O_2) en présence d'ions ferriques selon : -Réaction d'Haber weiss : $H_2O_2 + O_2^{\circ-} \longrightarrow OH^{\circ} + OH^- + O_2$ -Réaction de fenton : $H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow OH^{\circ} + OH^- + Fe^{3+}$ -provoqué des lésions oxydatives sur L'ADN, les protéines et les lipides.
ERO non radicalaires	
Oxygène singulet (O_2^1)	-C'est la forme excitée de l'oxygène moléculaire ou $O_2^{\circ-}$, obtenu par appariement des deux électrons célibataire de l' O_2 . Selon la réaction: $O^{\circ} + O^{\circ} \longrightarrow O_2^1$ -Il peut sous l'action des UV d'oxyder de nombreuses molécules.
Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)	-Le H_2O_2 est toxique pour la cellule, formé par dismutation, soit spontanée ou suit a l'action de l'enzyme de superoxyde dismutase, selon la réaction : $O_2^{\circ-} + O_2^{\circ-} \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$

II.1.2. Espèces réactives de nitrogène (ERN)

Les ERN radicalaires sont le monoxyde d’azote et dioxyde d’azote. Alors que l’ERN non radicalaires la plus connus est le peroxyntrite (Tableau IV) (Dellater et al., 2003).

Tableau IV : Espèces réactives de nitrogène (Dellater et al., 2003).

ERN radicalaires	
Monoxyde d’azote (NO°)	-Le NO° est un radical qui possède un seul électron célibataire, il est formé dans les tissus biologiques, par le nitrique oxyde synthase (NO synthase). - Il est susceptible de réagir avec d’autres radicaux libres pour former des espèces oxydantes telles que l’O ₂ pour donner le (ONOO°). $\text{NO}^\circ + \text{O}_2^{\circ-} \longrightarrow \text{ONOO}^\circ$
Dioxyde d’azote (NO₂°)	-Le NO ₂ ° se forme a partir de radical peroxyde et le monoxyde d’azote, ils est très abondant dans les polluants atmosphérique.
ERN non radicalaires	
Peroxyntrite (ONOO°)	-Le ONOO° est un oxydant très puissant, capable d’endommager de nombreuses molécules biologiques (ADN, protéine et lipides...). $\text{ONOO}^\circ + \text{H}^+ \longrightarrow \text{ONOOH} \longleftrightarrow \text{HO}^\circ + \text{NO}_2 \longrightarrow \text{NO}_3^- + \text{H}^+$

II.1.3. Principales sources des espèces réactives

Les espèces réactives peuvent être d'origine endogène, apparaissant comme sous-produits du métabolisme de certaines enzymes telle que: la xanthine oxydase, la lipoxygénases et les cyclooxygénases, Les ER sont aussi produits par le processus de transfert des électrons au niveau des mitochondries des cellules aérobies de l’organisme (figure 01). Elles peuvent être également formées aux niveaux de cytoplasme, membrane cytoplasmique, le peroxyosome et lysosome etc... (Rao et al., 2011).

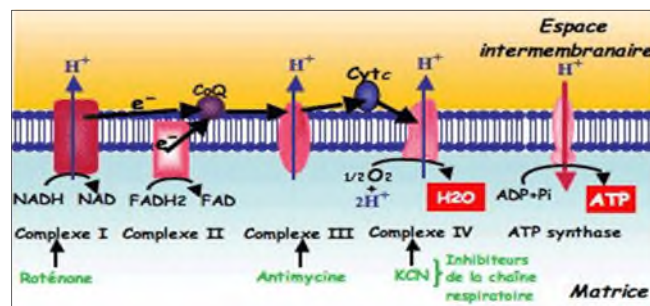


Figure 01 : Processus de transfert des électrons dans la mitochondrie (Rao et al., 2011).

Les espèces réactives sont également d'origine exogène, elles sont générées sous l'effet des facteurs environnementaux, des polluants divers, des radiations (UV, rayons gamma), certains produits chimiques, ainsi que des contamination par des pesticides ou des métaux lourds ou carences nutritionnelles (**Rao et al., 2011**).

II.2. Stress oxydatif

II.2.1. Définition et origine

Le stress oxydatif a été défini par Sies en 1991, comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les systèmes pro-oxydants et les capacités antioxydants d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire (**Sies, 1991**). Le stress oxydatif survient lors d'une production excessive de ces molécules réactives (des intoxications aux métaux lourds, l'irradiation, les ischémies/reperfusions, tabagisme, les maladies inflammatoires, le stress ...etc) et /ou d'une défaillance dans les systèmes antioxydants à cause soit d'un déficit nutritionnel comme les vitamines ou des anomalies génétiques (**Favier, 2003**).

II.2.2. Conséquences biologiques du stress oxydatif et implications pathologiques

Les radicaux libres présentent un paradoxe dans leur fonction biologique. Ils constituent des espèces hautement dangereuses susceptibles lors d'un stress oxydant, d'endommager par oxydation des différentes molécules biologiques notamment les lipides, les protéines et l'ADN (**Favier, 2003**).

✓ L'oxydation des protéines

Les RL s'exercent sur les protéines, et particulièrement sur les chaînes latérales de certains acides aminés comme le groupement thiol des cystéines et de la méthionine, conduisant aussi à la formation des ponts disulfuriques et par conséquent l'agrégation des protéines. Les autres groupements fonctionnels des protéines sont aussi cibles d'attaque par les RL. Ainsi le OH^\bullet attaque des groupements méthyles de valine, le groupement phényle des acides aminés tyrosine et groupement méthyle de l'alanine et le groupement amine de l'arginine et de la lysine (**Figure 02**) (**Favier, 2003**).

Les RL sont aussi capables de couper les liaisons peptidiques et former des fragments protéiques. Ces modifications oxydatives des protéines conduisent généralement aux changements de la conformation spatiale et par conséquent l'altération de la fonction biologique de cette protéine (enzyme, récepteur, facteur de transcription...) (**Favier, 2003**).

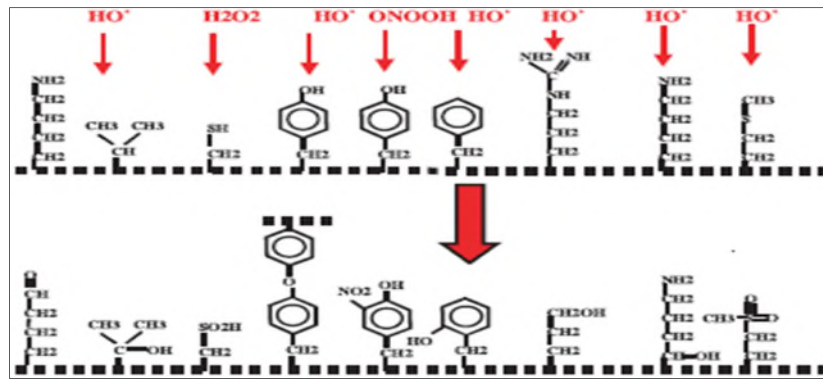


Figure 02 : L'oxydation des protéines après attaque radicalaire (Favier, 2003).

✓ L'oxydation de l'ADN

L'ADN qu'il soit nucléaire ou mitochondrial est une cible majeure des espèces réactives oxygénées et azotées, conduisant alors à différents dommages comme la modification des bases, la formation des sites abasiques, les cassures de brins, les pontages DNA-protéines (Dizadaroglu et al., 2004) (Figure 03).

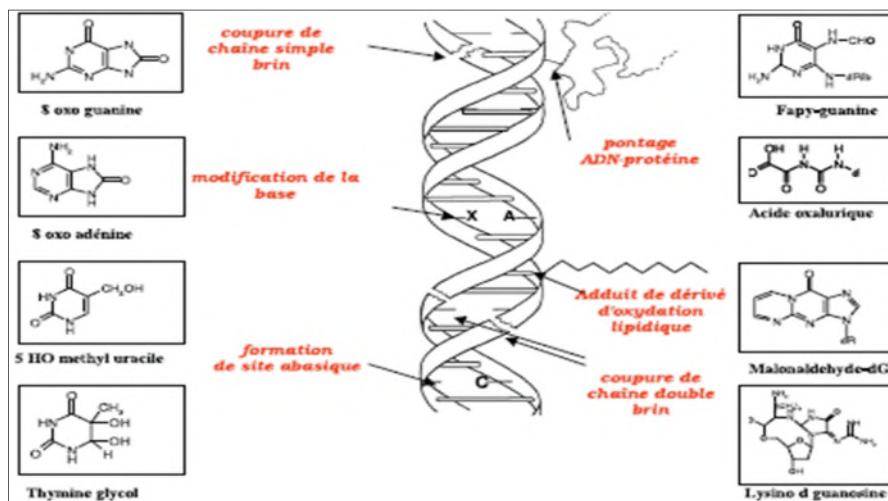


Figure 03 : Lisions de l'ADN formés par attaque radicalaires (Favier, 2003).

✓ L'oxydation des lipides

Les membranes cellulaire riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) (oléique, linoléique, et arachidonique), sont très sensibles à l'oxydation par les RL en déclenchant une réaction en chaine appelé lipoperoxydation site cellulaire (Figure 04).la peroxydation de lipides induite une modification de fluidité, perméabilité et excitabilité des membranes (Pham-Huy et al., 2008).

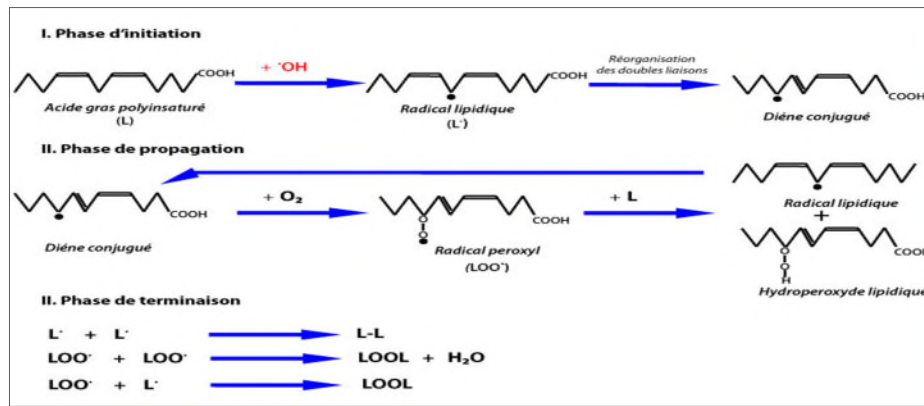


Figure 04 : Mécanisme de peroxydation lipidique (Pham-Huy et al., 2008).

Par la création de molécules biologiques anormales et la surexpression de certains gènes, le stress oxydatif est impliqué dans un certain nombre de maladies comme, le cancer, la cataracte et le vieillissement accéléré. il est aussi un facteur potentialisant la genèse de maladies plurifactorielles telles que le diabète, les maladies neurodégénératives, pulmonaire et cardiovasculaires (Figure 05) (Pham-Huy et al., 2008).



Figure 05 : Les pathologies associées aux espèces réactives (Pham-Huy et al., 2008).

II.3. Antioxydants

II.3.1. Définition

Un antioxydant est une substance ou molécule, capable en petite quantité, de prévenir, de retarder et de réduire l'oxydation d'un substrat. Les antioxydants sont d'origine endogène métaboliques comme des enzymes et d'origine exogènes nutritionnelles (Tableau V) (Parihar et al., 2008).

Tableau V: Les systèmes de défense antioxydant (Parihar et al., 2008) ; (Favier, 2003).

Système enzymatique	
Supéroxyde dismutase (SOD)	- Catalyse la dismutation de deux $O_2^{\circ-}$ et deux H^+ en H_2O_2 . Suivant la réaction : $2H^+ + 2O_2^{\circ-} \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$ - Comporte trois isoformes (SOD1, SOD2, SOD3) dont l'activité est dépendante de la localisation et les apports nutritionnels en cuivre et a un moindre degré en zinc.
Catalase	-Transforme le H_2O_2 en simple molécule d'eau. Comme suite : $2H_2O_2 \xrightarrow{Catalase} 2H_2O + O_2$ -Il est lié au NADPH dans les peroxysomes qui la protège et améliore son activité et détruit le H_2O_2 .
Glutathion peroxydase	- Elle se trouve essentiellement dans le cytosol et les mitochondries, est fonctionné en présence de glutathion réduit. $ROOH + 2GSH \longrightarrow ROH + GSSH + H_2O$
Système non enzymatique	
Vitamine C	- C'est un piègeur de $O_2^{\circ-}$, H_2O_2 , OH° , et O_2^1 , protège les biomembranes et les lipoprotéines, régénère la vitamine E.
Vitamine E	- protège les cellules contre les dommages associés aux RL (inhibe la peroxydation lipidique).
β-carotène	- C'est un précurseur de la vitamine A, neutralise l' O_2^1 et le radical peroxyde.
Glutathion	- C'est un tripeptide composé de cystéine, glutamine et glycine et joue un rôle dans la protection des lipides, des protéines et l'ADN contre l'oxydation.
Oligoéléments	- Zn, Cu, Mg, Sn et Fe jouent le rôle des cofacteurs pour maintenir l'activité catalytique des enzymes antioxydantes.
Polyphénols	- Les composés phénoliques sont capables d'agir comme des antioxydants qui peuvent neutraliser les RL en donnant un électron ou un atome d'hydrogène. ils peuvent réagir avec ERO et ERN. Le pouvoir antioxydant des composés phénoliques est également attribué à leur capacité de chélater les métaux ioniques et inhiber les enzymes impliquées dans la production de RL.

Système enzymatique	
Supéroxyde dismutase (SOD)	- Catalyse la dismutation de deux $O_2^{\circ-}$ et deux H^+ en H_2O_2 . Suivant la réaction : $2H^+ + 2O_2^{\circ-} \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$ - Comporte trois isoformes (SOD1 , SOD2 , SOD3) dont l'activité est dépendante de la localisation et les apports nutritionnels en cuivre et a un moindre degré en zinc.
Catalase	-Transforme le H_2O_2 en simple molécule d'eau. Comme suite : $2H_2O_2 \xrightarrow{Catalase} 2H_2O + O_2$ -Il est lié au NADPH dans les peroxysomes qui la protège et améliore son activité et détruit le H_2O_2 .
	- Elle se trouve essentiellement dans le cytosol et les mitochondries, est fonctionné en présence de glutathion réduit. $ROOH + 2GSH \longrightarrow ROH + GSSH + H_2O$
Système non enzymatique	
Vitamine C	- C'est un piègeur de $O_2^{\circ-}$, H_2O_2 , OH° , et O_2^1 , protège les biomembranes et les lipoprotéines, régénère la vitamine E.
Vitamine E	- protège les cellules contre les dommages associés aux RL (inhibe la peroxydation lipidique).
Beta-carotène	- C'est un précurseur de la vitamine A, neutralise l' O_2^1 et le radical peroxyde.
Glutathion	- C'est un tripeptide composé de cystéine, glutamine et glycine et joue un rôle dans la protection des lipides, protéines et l'ADN contre l'oxydation.
Oligoéléments	- Zn , Cu , Mg , Sn et Fe jouent le rôle des cofacteurs pour maintenir l'activité catalytique des enzymes antioxydantes.
Polyphénols	- Les composés phénoliques sont capables d'agir comme des antioxydants qui peuvent neutraliser les RL en donnant un électron ou un atome d'hydrogène. ils peuvent réagir avec ERO et ERN. Le pouvoir antioxydant des composés phénoliques est également attribué à leur capacité de chélater les métaux ioniques et inhiber les enzymes impliquées dans la production de RL

III. Inflammation et anti-inflammatoires

III.1. Mécanismes cellulaires et moléculaires de l'inflammation

L'inflammation est un processus physiologique complexe de défense utilisée par l'organisme, après une agression étrangère, vasculaire et tissulaire, vis à éliminé ou isolé l'agresseur et maintenir l'intégrité des tissus infectés. L'inflammation est un état morbide caractérisé par les signes cardinaux suivants : chaleur, douleur, rougeur et tuméfaction de la partie malade (Sarkhel, 2015).

Toute perturbation importante de l'homéostasie tissulaire est plus souvent à l'origine d'une réaction inflammatoire dont l'intensité et la durée peuvent être variable et conditionnent les effets bénéfiques ou nocifs de la réaction inflammatoire (Regnault, 1992).

Une réaction inflammatoire est l'un des modes de réponse les plus fréquents de l'organisme, provoquée par différents pathogènes, infectieuse (bactéries, virus ou parasites), immunologiques, traumatismes physiques ou chimique (intervention chirurgicale, microcristaux) et nécrose tissulaire, elle peut manifestée de manière aigue ou chronique (Regnault, 1992).

✓ Inflammation aigue

C'est une première réponse du corps à une lésion ou à une infection, elle est immédiate et courte, elle est caractérisé par une augmentation du débit sanguin (circulation accrue de plasma, les leucocytes et les protéines sériques) dans les sites infecté, l'inflammation aigue peut être divisée en trois grandes phases (Figure 06) (Weill et al ., 2003).

A. Phase vasculaire (initiation)

La phase est immédiate, de l'ordre de quelque minute et caractérisée par une vasodilatation artérielle entraînant un érythème et un dégagement de chaleur locale. Cette phase se produit une altération des micro-capillaires par relâchement des cytokines et des substances vasoactives (histamine, bradykinine, sérotonine, prostaglandine et dérivés du complément) et l'exsudation des cellules et du plasma vers les tissus (Weill et al ., 2003).

B. Phase cellulaire (amplification)

La réponse cellulaire fait suite à la phase vasculaire. se déroule en trios étapes essentielles, la première met en jeu les cellules de l'immunité innée (Les polynucléaires

neutrophiles et monocyte/macrophage), la seconde comprend une réponse non adaptative précoce (lymphocytes porteurs des récepteurs pour l'antigène) et la dernière étape, le développement d'une réponse immunitaire adaptative (activation des lymphocytes T (LT) et B (LB) spécifique) (Weill et al., 2003).

C. Phase de réparation (effectrice)

C'est la phase de résolution permettant la restauration du tissu lésé. En effet les conditions les plus favorables, les agents agresseurs et les débris cellulaires et tissulaires du foyer inflammatoire sont éliminés par les polynucléaires neutrophiles et les macrophages qui vont sécréter des médiateurs induisant ainsi la réparation tissulaire, les cellules fibroblastes et endothéliales forment alors un tissu conjonctivo-vasculaire aboutissant à la cicatrisation (Weill et al., 2003).

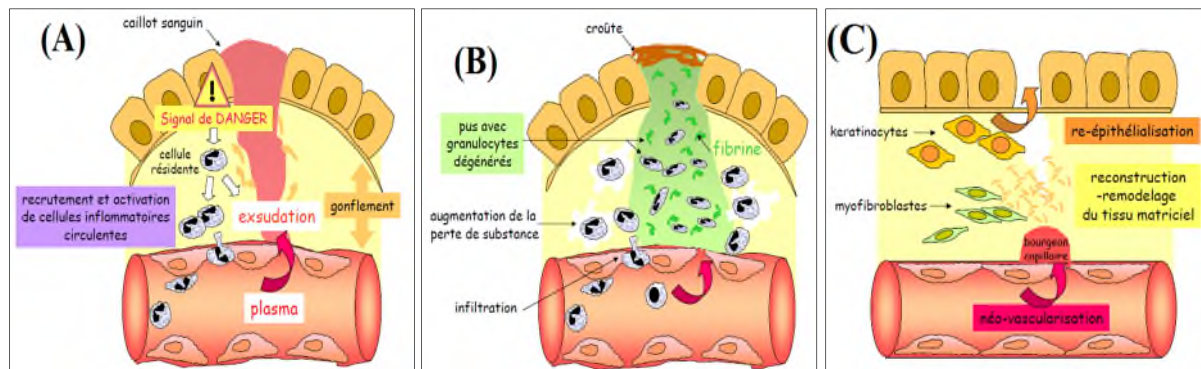


Figure 06 : La réponse inflammatoire aiguë : (A) initiation, (B) amplification, (C) réparation (Weill et al., 2003).

✓ Inflammation chronique

C'est une inflammation de durée prolongée, due à la persistance des facteurs d'agression. Elle peut suivre l'inflammation aiguë ou débiter de façon insidieuse sous forme d'une réponse de faible intensité et souvent asymptomatique. Les facteurs prédisposant, une agression persistante (l'acide gastrique dans l'ulcère peptique), une réponse inadéquate de l'hôte à l'infection et une maladie auto-immune chronique (polyarthrite rhumatoïde). L'inflammation chronique est associée à une réponse immunitaire tissulaire, peut mettre en jeu des moyens de défense spécifiques ou non spécifiques (Jackson et Evers, 2006).

III.1.1. Cellules de l'inflammation

Les cellules impliquées dans l'inflammation sont appelées immunocompétentes, elles proviennent d'un précurseurs commun, la cellule souche hématopoïétique pluripotente de la moelle osseuse (**Tableau VII**) (**Charles et al., 2010**)

Tableau VI: Les cellules de l'inflammation (**Charles et al., 2010**).

Type	Fonction
Cellules phagocytaires	Comprennent les polynucléaires neutrophiles et les monocytes/macrophages, elles sont les premières cellules à migrer vers le foyer lésé sont capable d'éliminer les agressions par phagocytose.
Lymphocytes	Sont des cellules de l'immunité spécifique, humorale et cellulaire, de type B, T ou NK. Parmi les lymphocytes T, certains sont dits auxiliaires (helper) (CD4), d'autres cytotoxiques (CD8) secrètent des cytokines, les plasmocytes (la maturation de la lignée B) secrètent les anticorps et les lymphocytes NK peuvent avoir une action cytotoxique.
Polynucléaires basophiles	Ce sont les acteurs majeurs de la réaction allergique et de divers évènements immuns et inflammatoires, ils agissent par libération de composés vasoactifs (histamine).
Polynucléaires éosinophiles	Sont des cellules clés de l'inflammation allergique. En effet, ils possèdent dans leurs granules de l'histaminase, une enzyme qui agit sur l'histamine et la neutralise.
Mastocytes	Les mastocytes comportent des granulations qui contiennent des médiateurs chimiques de l'inflammation, l'histamine, l'héparine et sérotonine. Elles sont capables d'envoyer des signaux au système immunitaire en présence d'une bactérie ou d'un parasite et de déclencher une réponse immédiate
Plaquettes	Où encore appelées thrombocytes, sont de petites cellules dépourvues de noyau. Les plaquettes jouent un rôle primordial dans le processus de coagulation, Elles suppriment un saignement lors de l'apparition d'une brèche au niveau du tissu lésionnel
Fibroblastes	Ce sont les cellules qui produisent le collagène, elles jouent un rôle important dans la cicatrisation.

III.1.2. Médiateurs de l'inflammation :

L'ensemble des perturbations biochimiques dues à une réaction inflammatoire, lié à la libération des médiateurs plasmatiques ou cellulaires (**Tableau IX**) (Weill et al., 2003).

Tableau VII: Les médiateurs de l'inflammation (Weill et al., 2003).

Médiateurs plasmatiques	
Système de coagulation fibrinolyse	Si ce système activé est capable de synthétiser le thromboxane A ₂ qui assure une vasoconstriction efficace et l'activation du facteur Hageman (facteur XII) déclenche la coagulation et aboutit à la formation des fibrines.
Système du complément	Le système du complément intervenant dans la défense non spécifique contre les agents infectieux, il comprend trois voies d'activation, la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines, aboutissant à une unité effectrice terminale commune le CAM.
Système des kinines	Les kinogènes précurseur inactifs des kinines, sont activés par la kallibréine, ou par le facteur Hageman et augmentent la chaleur et la douleur. la bradykinine agit sur les terminaisons nerveuses en favorisant la douleur.
Médiateurs cellulaires	
Médiateurs lipidique	Lorsque qu'une cellule (phagocyte ou mastocyte) détecte un signal de danger, la phospholipase A ₂ est activée par le TNF α . Cette enzyme transforme les acides gras de la membrane plasmique des cellules en leucotriènes, prostaglandines et PAF.
Amines vasoactives	L'histamine et la sérotonine sont stockées dans les mastocytes, les polynucléaires basophiles et les plaquettes, produisent une vasodilatation et une perméabilité vasculaire.
Les radicaux libres (RL)	Les cellules phagocytaires (les polynucléaires neutrophiles et les macrophages) activées, produisent des dérivés toxiques de l'oxygène (H₂O₂ , O₂¹), générées l'acide hypochloreux (HOCL) et sécrètent (NO) toxique.
Cytokines et Chimiokines	Sont des protéines sécrétés par (les lymphocytes et les monocytes-macrophages), elles permettent l'orientation de la réponse en fonction de la nature du signal détecté. Certaines cytokines sont pro-inflammatoires (IL1, IL6, TNF α) et d'autres sont anti-inflammatoires (IL4, IL10, IL13). Les chimiokines sont des peptides apparentés aux cytokines, permettent le recrutement des monocytes et des polynucléaires pendant l'inflammation.

III. 2. Anti-inflammatoire et leurs cibles pharmacologiques

III.2.1. Anti-inflammatoires stéroïdiennes (AIS) ou glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes sont de puissants agents anti-inflammatoires, aux points d'impact multiples sur les différentes étapes et mécanismes, Il est tentant de les utiliser en thérapeutique et sont synthétisés sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien adrénérique. Le principal mécanisme d'action des glucocorticoïdes repose sur leur liaison avec leur récepteur (GR), ils sont exercent surtout des effets inhibiteurs qui limitent l'action des principaux médiateurs de la réponse inflammatoire, l'inhibition surtout de la synthèse de l'IL-1, de l'IL-6, et un moindre degré du TNFa, réduction de production des prostaglandines et des leucotriènes, l'inhibition des facteurs chimiotactiques et baisse l'expression des molécules d'adhérence et limitation des processus de vaso-perméabilité. Cependant leurs effets secondaires peuvent être importants, sont liés à l'utilisation prolongée ou l'augmentation de la posologie induisant à des divers troubles (ulcères gastrique, l'hypertension, l'hyperglycémie...) (**Figure 07**) (**Nicolaides et al., 2010**).

III.2.2. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens regroupent un ensemble de molécules présentant des propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques et analgésiques. Leur efficacité comme leurs principaux effets secondaires sont liés à leur mécanisme d'action principal qui est l'inhibition des cyclo-oxygénases, enzymes responsables de la synthèse des prostaglandines et du thromboxane. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens classiques, c'est-à-dire non sélectifs, inhibent les deux isoformes de la cyclo-oxygénase (COX-1 et COX-2), contrairement aux anti-inflammatoires non stéroïdiens sélectifs de la COX-2 (coxib). Ces derniers sont supposés avoir moins d'effets secondaires (**Figure 07**) (**Bacchi et al., 2012**).

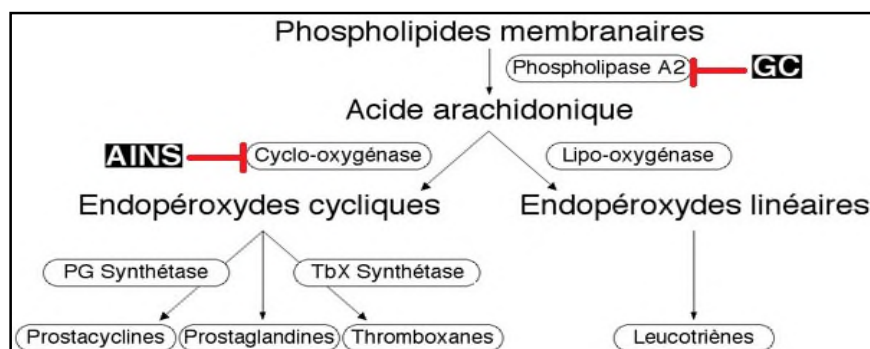


Figure 07 : Schéma représentant l'action des AIS et AINS(**Bacchi et al., 2012**).

III.2.3. Anti-inflammatoires d'origine végétal

Le nombre de composés phytochimiques, trouvés dans le règne végétal est très vaste, et leur spectre d'activité est tout aussi grand. Certains de ces composés phytochimiques ont des propriétés anti inflammatoire (**Fiebich et Chrubasik, 2004**). Beaucoup sont présumés agir en bloquant les voies de la cyclooxygénase et la lipoxygénase ainsi que par d'autres mécanismes. Quelques exemples de plantes douées d'activités anti-inflammatoires sont présentés dans le **Tableau VIII**

Tableau VIII : Quelques exemples de plantes médicinales douées d'activité anti-inflammatoire.

Nom Scientifique	Famille	Sites d'action	Références
<i>Salix sp</i> (Ecorces)	Salicacée	-Inhibe la synthèse des prostaglandines par inhibition de la voie de la COX-2 et de la lipoxygénase.	Fiebich et Chrubasik, 2004
<i>Ribes nigrum</i> (Feuilles)	Grossulariacée	-Diminuent le taux de TNF- α et d'IL-1 β . -Effet inhibiteur de la COX-1 et de la COX-2.	Garbacki et al., 2004
<i>Urtica dioica</i> (Feuilles)	Urticaceae	-Inhibe l'activation du facteur NF- κ B en empêchant la dégradation de sa sous-unité inhibitrice I κ B- α . -Inhibition de la COX-1 et COX-2 ainsi qu'une inhibition de la production de Prostaglandine D2	Marrassini et al., 2010
<i>Fraxinus japonica</i> (Feuille, écorce)	Oleaceae	-Inhibe l'activation de la voie classique et alterne du complément. -Inhibent la formation des leucotriènes issus de l'acide arachidonique par inhibition de la lipoxygénase	Kostova et Iossifova, 2007
<i>Curcuma longa</i> (Rhizome)	Zingibéracée	-Inhibe la production de PGE2 et l'augmentation de l'expression de COX-2.	Kim et al., 2012
<i>Harpagophytum procumbens</i> (Racine)	Pedaliaceae	-Inhibe l'expression de COX-1 et COX-2 et la biosynthèse la leucotriène.	Grant et al., 2007

I. Préparation de la poudre végétal

Les graines de nigelle utilisées dans cette étude ont été achetées chez un herboriste de la ville de Bejaia, elles ont subi un nettoyage et lavage à l'eau pour éliminer tous les traces de poussière, séchées à 40C° pendant une semaine, puis broyées à l'aide d'un broyeur électrique et tamisées afin de pouvoir récupérer une poudre fine et homogène . La poudre obtenue a été ensuite conservée hermétiquement dans des récipients en verre et stockée à l'abri de la lumière pour des prochaines utilisations.

I.1. Préparation de l'extrait méthanolique

L'objectif de l'extraction est de récupérer les molécules bioactives présentes dans les graines de nigelle, notamment les composés phénoliques et les flavonoïdes. L'extraction solide/liquide est réalisée par macération de la poudre dans du méthanol (80%) à une température ambiante conformément à la méthode décrite par (**Bidié et al., 2008**). 40g de poudre végétale ont été macérées dans un volume de 200ml de méthanol sous agitation douce pendant 72h, ensuite l'extrait a été filtré sur papier Wattman. Le méthanol est éliminé du filtrat par évaporation à 40°C dans l'étuve permettant ainsi d'obtenir un extrait sec caractérisé par une couleur brune, qui est considéré comme étant l'extrait brut.

✓ Expression du rendement d'extraction

Le rendement d'extraction est déterminé par le rapport entre la masse de l'extrait sec obtenu après évaporation du solvant et la masse de la poudre végétal utilisée. Selon la formule suivante :

$$\text{Rendement d'extraction (\%)} = (\text{Me} / \text{Mp}) \times 100$$

- **Me**: Masse de l'extrait sec (g).
- **Mp**: Masse de la poudre végétale (g).

II. Dosage des polyphénols

II.1. Dosage des phénols totaux

✓ Principe

Les polyphénols totaux ont été estimés par la méthode de Folin-Ciocalteu, spécifique au groupement phénols. Le réactif est formé d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide

phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxyde bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (MO_8O_{23}). L'intensité de la coloration bleue produite, dont l'absorption maximum est à 760 nm, est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans les extraits végétaux (Ribéreau-Gayon, 1972).

✓ Mode opératoire

Le protocole suivi pour le dosage des polyphénols totaux contenus dans nos extraits est celui de Ryan (2013) (Figure 08).

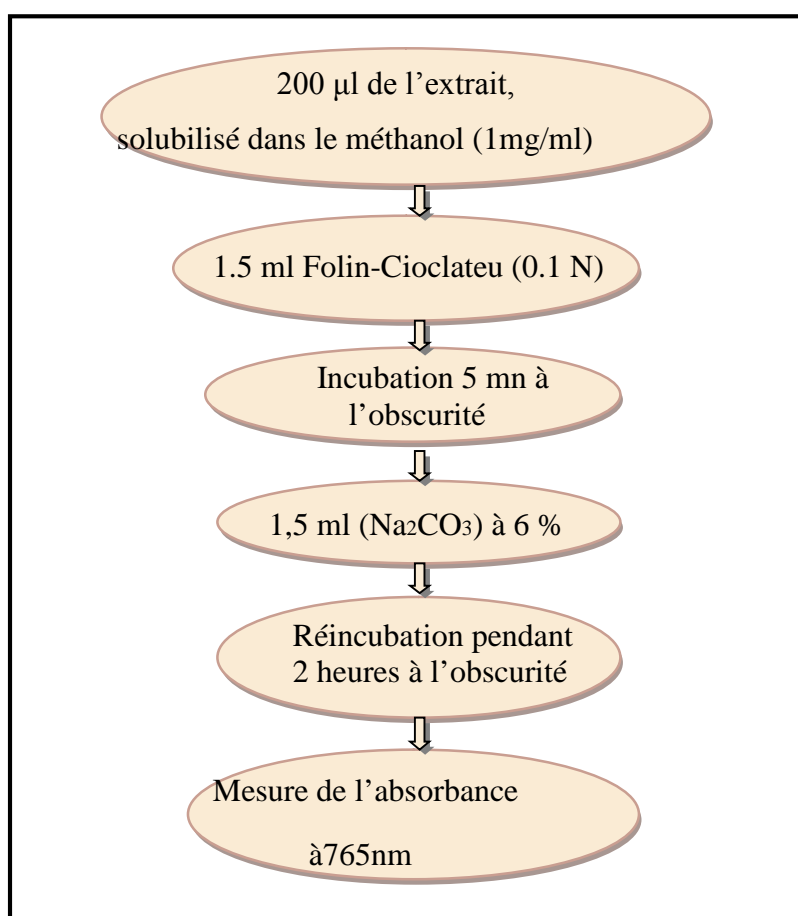


Figure 08 : Protocol de dosage des polyphénols totaux d'extrait de nigelle (Ryan, 2013).

NB : un blanc a été préparé en mélangeant le réactif de Folin-Ciocalteu (0.1 N) avec Na₂CO₃ (6 %) à volume égale.

✓ Expression des résultats

Les concentrations des phénols totaux ont été exprimées en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de l'extrait méthanolique des graines de nigelle

(mgEqAG/gEM), calculées en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions réactionnelles avec l'acide gallique comme phénol standard.

II.2. Dosage des flavonoïdes

✓ Principe

La teneur en flavonoïdes totaux de l'extrait étudié est évaluée selon la méthode de (Quettier *et al.*, 2000). A l'aide d'un test colorimétrique en utilisant comme réactif spécifique le chlorure d'aluminium.

La présence du groupement hydroxyle (OH) libre en position C₃ ou C₅ dans les flavonoïdes provoque la formation de complexes flavonoïdes-aluminium, qui donne par chélation de l'ion Al⁺³ une coloration jaunâtre mesurable à 448nm. La coloration jaune produite est proportionnelle à la quantité des flavonoïdes présente dans l'extrait (Quettier *et al.*, 2000).

✓ Mode opératoire

La méthode du trichlorure d'aluminium est appliquée dans notre travail pour quantifier les flavonoïdes présents dans les graines de nigelle, selon le protocole décrit ci-dessous. (Figure 09).

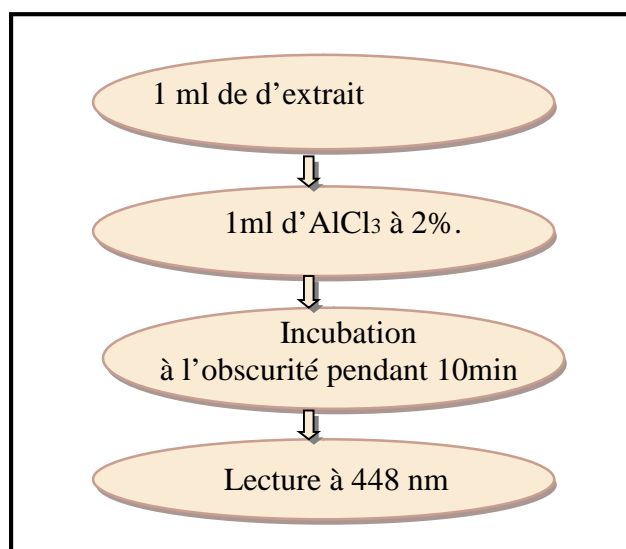


Figure 09 : Protocol de dosage des flavonoïdes d'extrait de nigelle (Djeridane *et al.*,2006).

NB : un blanc a été préparé en 1ml d' AlCl₃ (2%).

✓ Expression des résultats

La concentration des flavonoïdes contenus dans l'extrait de nigelle est exprimée en

milligramme équivalent de quercétine par gramme de l'extrait méthanolique des graines de nigelle (mgEqQ/gEM) à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions réactionnelles avec la quercétine comme standard.

III. Mesure de l'activité antioxydant de l'extrait de nigelle

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer l'activité antioxydant des extraits de plantes. La plupart de ces méthodes sont basées sur la coloration ou décoloration d'un réactif dans un milieu réactionnel.

Pour mettre en évidence l'activité antioxydant de notre extrait nous avons opté pour deux tests *in vitro* à savoir : piégeage du radical libre ABTS et la réduction du fer.

III.1. Test anti-radicalaire à L'ABTS

✓ Principe

Pour étudier l'activité antiradicalaire d'extrait de nigelle, nous avons opté pour la méthode qui utilise l'ABTS (2,2'-azinobis (3-éthyl-benzothiazoline-6sulphonate) comme un radical libre relativement stable, de coloration bleue verte en le transformant en ABTS-H⁺ incolore, par un don d'hydrogène et présentant une absorbance maximale à 734nm. Le test TEAC (Capacités antioxydante équivalente de trolox) est appliqué pour déterminer la quantité de radicaux qui peuvent être piégés par un antioxydant. Dans cette méthode, l'ABTS est mis en solution aqueuse avec du persulfate de potassium (K₂ S₂ O₈) pour générer le radical, une fois que le radical ABTS^{o+} est formé, le standard pur ou l'échantillon est ajouté et la diminution de l'absorbance est suivi par spectrophotométrie (Re *et al.*, 1999). La diminution de l'absorbance causée par l'antioxydant reflète la capacité de capture du radical libre.

✓ Mode opératoire

Préalablement, La solution du radical cationique ABTS^{o+} a été préparée en mélangeant à volume égal une solution de 2.45 mM de persulfate de potassium K₂S₂O₈ et une solution stock d'ABTS à 8 mM, après 16 h d'incubation à l'abri de la lumière et à température ambiante, la solution d'ABTS^{o+} a été diluée avec du méthanol afin d'obtenir une absorbance de 0,700 ± 0,2 à 734nm.

Le piégeage du radical cationique ABTS^{•+} est déterminé par la méthode de (**Figure 10**) (**Re et al., 1999**).

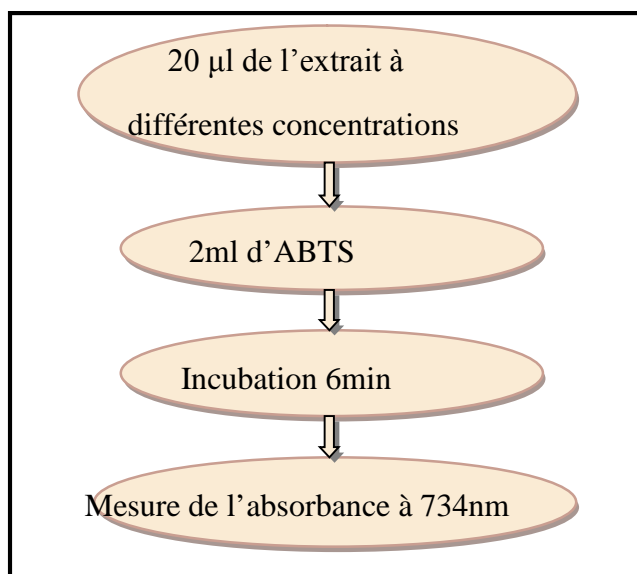


Figure 10 : Protocol du test de l'ABTS (**Re et al., 1999**).

NB : un blanc a été préparé en 2 ml d'ABTS.

✓ Expression des résultats

Le Trolox est utilisé comme standard et l'expression des résultats pour mesurer le pourcentage d'inhibition est comme suit :

$$\% \text{ d'inhibition} = (\text{Abs T} - \text{Abs E} / \text{Abs T}) \times 100$$

- **Abs T** : Absorbance du témoin (trolox).
- **Abs E** : Absorbance de l'extrait.

III.2. Pouvoir réducteur

✓ Principe

Le pouvoir réducteur a été déterminé selon la méthode d'**Oyaizu (1986)**, elle est basée sur la réduction du fer ferrique (Fe^{3+}) du complexe ferricyanure- Fe^{3+} en fer ferreux (Fe^{2+}), en présence des antioxydants réducteurs. Cette réaction se manifeste par l'apparition d'une coloration verte dont l'intensité est proportionnelle au potentiel réducteur (**Figure 11**).

✓ Mode opératoire

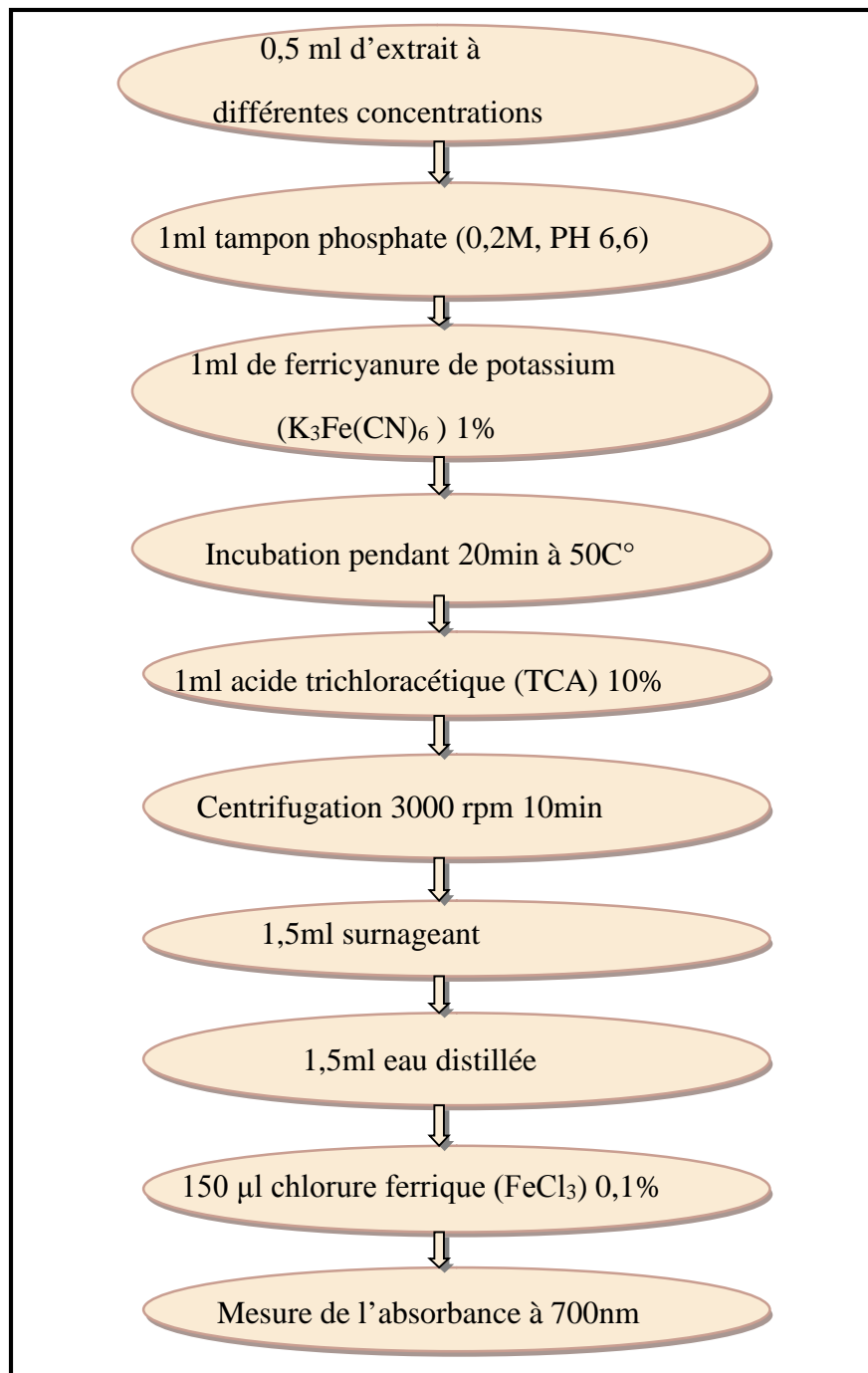


Figure 11 : Protocol de pouvoir réducteur (Oyaizu, 1986).

NB : un blanc a été préparé en mélangeant le tampon phosphate (0,2M, PH 6,6), (K₃Fe(CN)₆ 1%), (TCA) 10%, l' eau distillée et FeCl₃ (0,1%).

✓ Expression de résultats

Les résultats sont exprimés à partir des histogrammes des concentrations de l'extrait de nigelle et de BHA en µg/ml en fonction des DO mesurés à λ : 700nm.

IV. Evaluation de l'effet anti-dénaturant des protéines

Afin d'étudier l'effet anti-inflammatoire des extraits des graines de nigelle, un test d'évaluation *in vitro* de la capacité de ces extraits à empêcher la dénaturation thermique d'ovalbumine extraite du blanc d'œuf par turbidimétrie a été utilisé. En effet, La chaleur provoque le changement réversible de la conformation tertiaires et même secondaires des protéines qui se traduisent par la diminution de leurs solubilités et la perte de leurs fonction (Adarsh Verma *et al.*, 2011).

IV.1. Extraction de l'ovalbumine

L'ovalbumine à été extraite à partir du blanc d'œuf de poule selon la méthode décrite par Datta *et al.*, (2009). Un œuf frais a été cassé et le jaune est séparé du blanc, le blanc d'œuf à été récupéré dans un bécher mis dans un bain de glace et mélangé à 50ml du tampon phosphate (0.1M, PH=6.6) puis homogénéisé sous agitation magnétique pendant 5mn, ensuite l'homogénat obtenu a été centrifugé à 3000 rpm (4°C) pendant 5 mn, le surnageant obtenu a été filtré à travers une bande de gaze pour éliminer le précipitant. Enfin le filtrat obtenu, a été partagé dans des aliquotes de volume de 2 à 2,5ml puis stockés à -20°C.

IV.2. Mise au point du test de dénaturation de l'ovalbumine

Pour estimer l'effet anti-dénaturante de l'ovalbumine partiellement purifiée des extraits des graines de nigelle, la méthode décrite par Sangita *et al.*, (2012) a été suivi. Mais au préalable, nous avons réalisé des tests pour déterminer les concentrations d'ovalbumine, d'éthanol et la température à utiliser dans l'expérience.

✓ Effet de la concentration de l'ovalbumine

5 ml d'extrait d'ovalbumine de blanc d'œuf à différentes dilutions (1/100, 1/75, 1/50 et 1/25), ont été mélangées avec 250 µl de tampon phosphate (0.1 M, pH 6.6), incubé dans un bain marie à 70°C±2 pendant 60min. La densité optique (DO) a été mesurés à 660nm (avant (t=0) et après incubation (t=60min)).

✓ Effet de la concentration d'éthanol

Afin de déterminer l'effet de la concentration d'éthanol sur la dénaturation thermique d'ovalbumine, nous avons utilisé différentes concentrations d'éthanol (0%, 2.5%, 5%, 7,5%

et 10%), incubé à une température 70C° pendant 45 mn, ensuite la densité optique (DO) a été mesurés à 660nm (avant (t=0) et après incubation (t=45mn)).

✓ **Effet de la température**

Pour déterminer la température optimale dans la dénaturation d'ovalbumine, on a fait le test à différentes températures (amianté, 60C°, 70C° et 80C°), dans les mêmes conditions expérimentales précédentes.

IV.3. Mesure de l'activité anti-dénaturante de l'extrait de nigelle

✓ **Mode opératoire**

20mg d'extrait de nigelle ont été solubilisés dans 2ml d'éthanol, puis différents concentrations de l'extrait 40 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml et 500 µg/ml, ont été mélangés à 7,6 ml de la solution d'ovalbumine dilué à 1/35, dans un milieu réactionnel du tampon phosphate 0,1M, pH= 6,6 contient 2,5% d'éthanol. Le mélange a été incubé dans un bain marie à 70°C±2 pendant 45min. Les densités optiques ont été mesurées à 660nm tout les 15 min de la réaction.

Le contrôle a été préparé dans les mêmes conditions réactionnelles en remplaçant l'extrait par un même volume d'éthanol. Le déclofénac un anti-inflammatoire a été utilisé comme standard (Sangita et al., 2012).

✓ **Expression des résultats**

L'effet de l'extrait de nigelle sur la dénaturation thermique de l'ovalbumine à 70°C est exprimé par le taux d'inhibition, comme suit :

$$\text{Taux d'inhibition (\%)} = (\Delta\text{Absc} - \Delta\text{AbsE} / \Delta\text{Absc}) \times 100$$

Ou' :

- ΔAbsc : variation d'absorbance à 660nm de l'ovalbumine en absence d'extrait de Nigelle (contrôle).
- ΔAbsE : variation d'absorbance à 660nm de l'ovalbumine en présence de l'extrait de nigelle (essai).

I. Taux d'extraction

L'extraction par macération à froid (température ambiante) au méthanol de la poudre des graines de nigelle a donné un taux de 80mg/g d'extrait (**Tableau IX**). D'après les résultats obtenus, nous constatons que le taux d'extrait brut en utilisant le méthanol comme solvant organique est de (8%).

Avec la méthode d'extraction par macération où on a utilisé le méthanol, solvant le plus recommandé pour extraire le maximum de composés phénoliques, possède l'avantage d'être éliminé facilement (**Ribéreau-Gayon, 1972**). Le rendement obtenu est satisfaisant. En effet, au regard des résultats obtenus dans d'autres travaux sur les graines oléagineuses comme la graine de *Nigella sativa* (11%) (**Talbi et al., 2015**), la graine du pin (*Pinus koraiensis*) (3,5%) (**Su et al., 2009**), la graine de sésame (*Sesamum indicum L*) (7,8%) (**Carvalho et al., 2012**).

Par contre si on compare par rapport aux rendements obtenus par d'autres méthodes moins conventionnelles tel que méthode d'extraction au Soxhlet, extraction aux microondes ou les ultra son, le rendement est assez faible. L'extraction par macération menée à température basse et sous agitation continue, respecte l'intégrité des structures des molécules extraites et prévient leur dénaturation ou modification probable (**Ribéreau-Gayon, 1972**).

II. Taux des composés phénoliques

Les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes dans l'extrait des graines de nigelle déterminées à partir des courbes d'étalonnages réalisées avec l'acide gallique et la Quercitine (**figure 12**) sont de $(33,869 \pm 0,297 \text{ mgEqAG/g})$ et $(2,600 \pm 0,046 \text{ mgEqQ/g})$ d'extrait respectivement (**Tableau IX**).

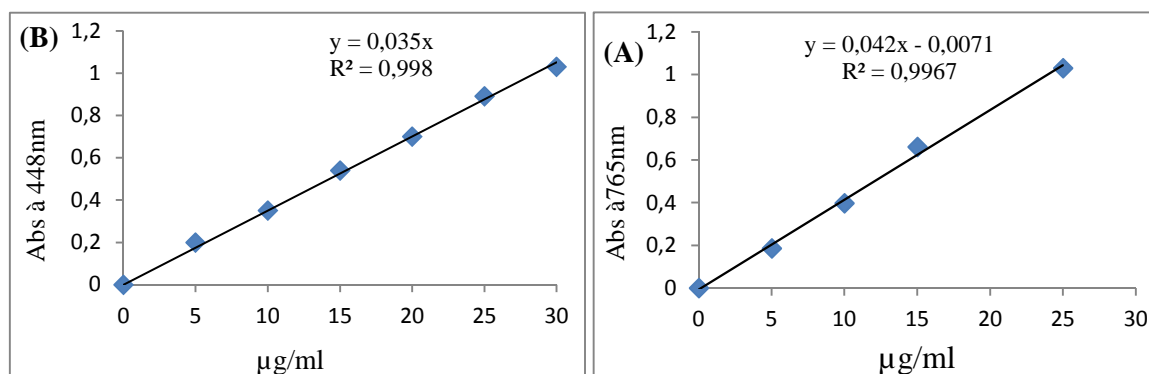


Figure 12 : Courbe d'étalonnage **A** : l'acide gallique et **B**: la Quercitine.

Tableau IX: Rendement d'extraction, teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes des graines de nigelle.

Extrait	Rendement d'extraction	polyphénols totaux (mgEqAG/g d'extrait)	Flavonoïdes (mgEqQ/g d'extrait)
Extrait méthanolique des graines de nigelles	80mg/g (8%)	33,869 ± 0,297	2,600± 0,046

Selon ces résultats, les graines de nigelles contiennent des quantités importantes en métabolites secondaires de type phénoliques. Au regard du résultat, le taux de polyphénol totaux ($33,86 \pm 0,29 \text{ mgEqAG/g}$ d'extrait de nigelle) trouvé pour la graine de nigelle est en accord avec celui mentionné par **Meziti, 2009** pour *Nigella sativa* ($33,64 \text{ mg/g ES}$) et aussi concorde avec les résultats obtenus par **Fico et al. (2001)** pour la graine de *Nigella damascena* (35 mg/g ES). Dont les taux des polyphénols totaux sont supérieur à ceux des flavonoïdes qui sont successivement de $3,8 \text{ mg/g ES}$ et $3,5 \text{ mg/g ES}$.

Pour les flavonoïdes, les résultats obtenu ($2,600 \pm 0,046 \text{ mgEqAG/g}$ d'extrait de nigelle) montre que les polyphénols des graine de nigelle utilisée sont plutôt de type acides phénoliques ou tanins. En effet, les flavonoïdes ($2,600 \pm 0,046 \text{ mgEqAG/g}$ d'extrait) représentent environ 6% des polyphénols totaux ($33,86 \pm 0,29 \text{ mgEqAG/g}$ d'extrait). Par comparaison aux résultats de Meziti (taux des flavonoïdes est de $3,8 \text{ mg/g ES}$) pour *Nigella sativa* et ceux de **Fico et al., (2001)** pour *Nigella damascena* (taux des flavonoïdes est de $3,5 \text{ mg/g ES}$), on en déduit que probablement les polyphénols des graines de nigelle sont des acides phénoliques, phénols simples et/ou des tanins.

III. Activités antioxydants de l'extrait méthanolique des graines de Nigelle

III.1. Activité anti-radicalaire a l'ABTS

L'activité anti-radicalaire des extraits de Nigelles a été évaluée par le test de l'ABTS. La méthode de radicale $\text{ABTS}^{\bullet+}$ est l'un des tests les plus utilisés pour la détermination de la concentration des radicaux libres, dans ce test la génération du radical cationique $\text{ABTS}^{\bullet+}$ à mesurer l'activité antioxydante totale des substances, constitue la base d'une méthode spectrophotométrique qui a été appliquée (**Re et al., 1999**). L' $\text{ABTS}^{\bullet+}$ est oxydé par les antioxydants à son radical cationique $\text{ABTS}^{\bullet+}$, qui a une couleur intense. L'activité anti-

radicalaire est considérée comme étant la capacité des composés testés à diminuer la couleur du radical ABTS^{•+} (Re *et al.*, 1999).

Les résultats de l'activité anti-radicalaire d'extrait obtenu, montrent que le taux d'inhibition du radical ABTS^{•+} augmente lentement avec la concentration de l'extrait entre 0,1 et 1 mg/ml. L'activité antioxydante de l'ABTS la plus élevée est de 22% pour une concentration d'extrait de 1mg/ml. Le trolox utilisé comme antioxydant standard présente une activité inhibitrice largement supérieure à celle de l'extrait (**figure 13**). En effet, pour une concentration de 0,1mg/ml de trolox, le taux d'inhibition est de 56,39%. Ce résultat signifie que l'efficacité du phénol synthétique (trolox) (IC50 ≈ 85 μg/ml) à piéger les radicaux libres comme le radical ABTS^{•+} est largement meilleur que celle des polyphénols présents dans l'extrait de graine de nigelle (IC50 >>1 mg/ml).

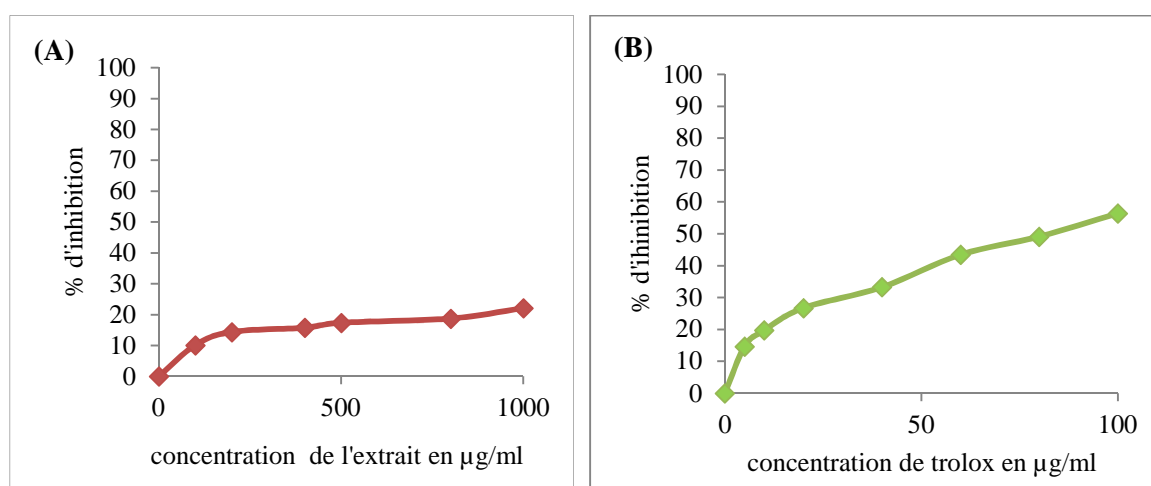


Figure 13 : Pourcentages d'inhibition du radical ABTS^{•+} en présence de (A : l'extrait de nigelle, B : Trolox).

III. 2. Teste de pouvoir réducteur

La révélation du pouvoir réducteur se manifeste par l'apparition de la couleur verte qui est due au transfert du fer ferrique Fe⁺³ en fer ferreux Fe⁺² en présence de l'extrait de nigelle. Le pouvoir réducteur est due à la présence du lycopène et de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron et à réduire le fer. En effet l'absorbance augmentation au fur et à mesure que la concentration en extrait s'élève. (Ksouri *et al.*, 2008).

D'après les résultats de pouvoir réducteur d'extrait des graines de nigelle obtenus, on constate que la variation de la densité optique augmente en fonction de la concentration d'extrait. L'activité réductrice de l'extrait la plus élevée représente une absorbance de 0,5 pour une concentration d'extrait de 1mg/ml. La BHA utilisé comme antioxydant synthétique standard présente une activité réductrice beaucoup plus importante que celle de l'extrait de nigelles (**Figure 14**). En effet, pour une concentration de 0,1mg/ml, l'absorbance en présence de l'extrait végétal est de 1,44. Ce résultat signifie que l'efficacité de l'antioxydant synthétique (BHA) à réduire le fer ferrique Fe^{+3} en fer ferreux Fe^{+2} est largement supérieure que celle des polyphénols présents dans l'extrait de la graine de nigelle.

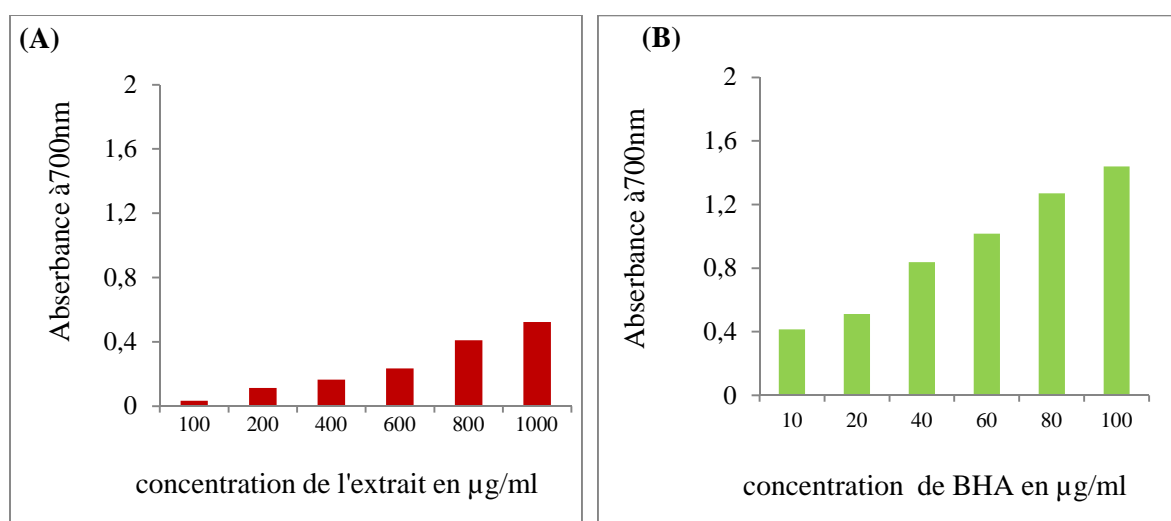


Figure 14 : Pouvoir réducteur de l'extrait de graine de nigelle (A) et de la BHA (B) à différentes concentrations.

IV. Effet inhibiteur de la thermo-dénaturation de l'ovalbumine

IV. 1. Paramètres influençant la dénaturation thermique de l'ovalbumine

✓ Effet de la concentration de la protéine

Les résultats de la dénaturation thermique, exprimé en variation de densité optique (ΔDO) à 660nm, à 70C° et différentes concentrations d'ovalbumine en fonction du temps sont présentés dans la **figure 15**.

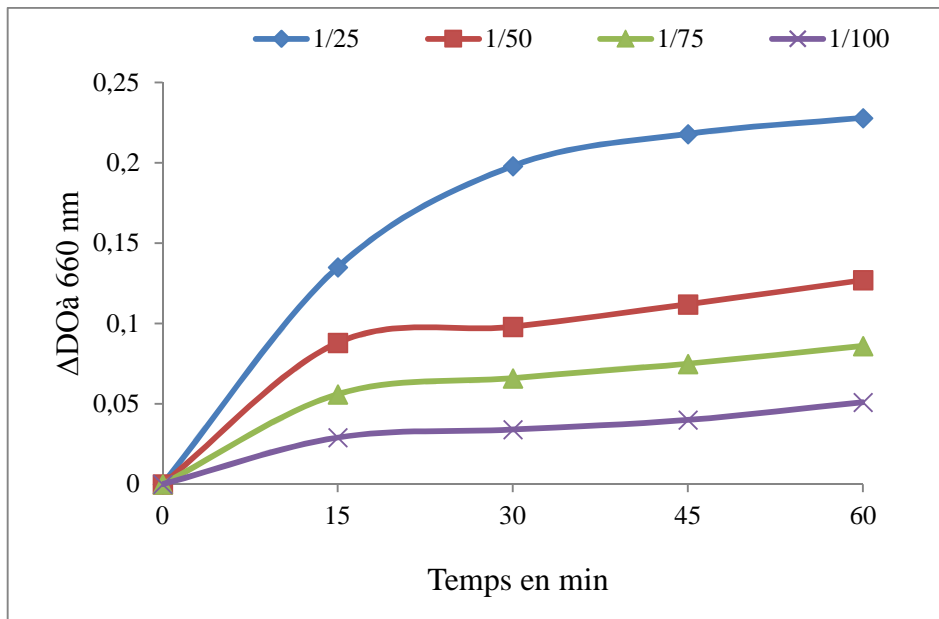


Figure 15 : Variation d'absorbance à 660nm de l'ovalbumine incubée à 70°C en fonction du temps pour différentes concentrations de la protéine.

Quelle que soit la concentration de la protéine, la densité optique à 70°C suit probablement une cinétique d'ordre 1 (allure hyperbolique des courbes). À partir de ces courbes on peut estimer les temps de demi-réaction à 12 min pour une concentration de la protéine à la dilution 1/25, 60 min pour une concentration de la protéine diluée à 1/50 et $t \gg 60$ min pour les dilutions 1/75 et 1/100. D'après les résultats de la variation de dénaturation thermique à différentes concentrations d'ovalbumine, on constate que la cinétique de la dénaturation d'autant plus rapide que la concentration de l'ovalbumine est élevée.

✓ Effet de la concentration d'éthanol

Les résultats de l'étude de l'effet de la concentration d'éthanol (0-10%) sur la dénaturation thermique de l'ovalbumine à dilution 1/35 de l'extrait du blanc d'œufs, sont représentés dans la **figure 16**.

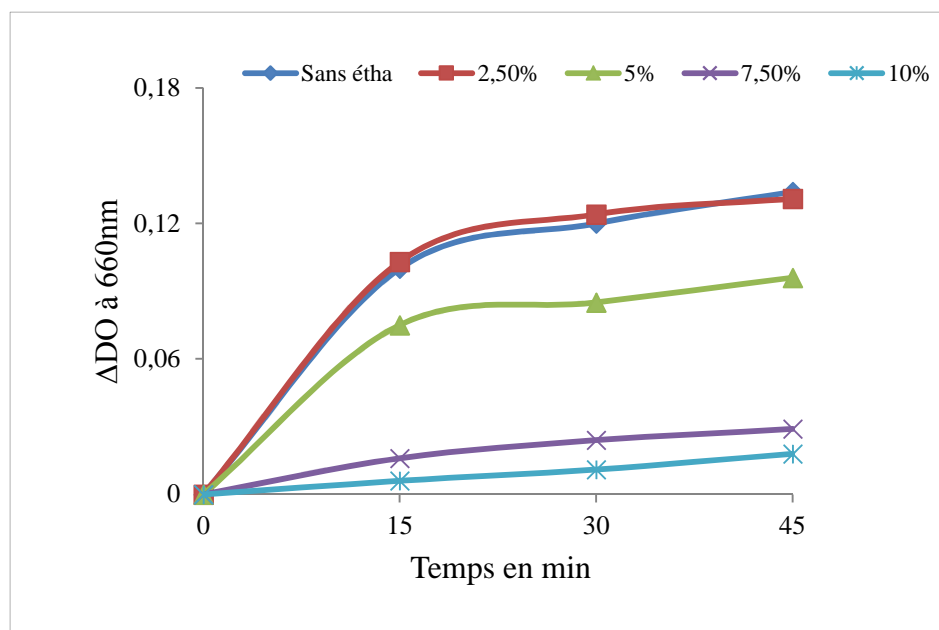


Figure 16 : Variation des absorbances à 660nm de l'ovalbumine incubé à 70°C en fonction du temps pour différentes concentrations d'éthanol.

La variation de densité optique d'ovalbumine de 45 min à température 70C° est d'autant plus stable que la concentration d'éthanol est faible. En effet, la concentration de 2.5% d'éthanol ne présente aucun effet sur la cinétique de dénaturation thermique de l'ovalbumine. Par contre à 10%, l'éthanol stabilise la protéine. La cinétique de dénaturation thermique est ralentie. Le temps de demi-réaction où 50 % de l'ovalbumine est dénaturée est de 12 min à 0% d'éthanol et est de 45 min à 10% d'éthanol.

D'après ces résultats on observe que l'éthanol présente un effet plutôt thermo-stabilisateur de l'ovalbumine.

✓ Effet de la température

Les résultats de l'effet thermo-dénaturant de l'ovalbumine extraite à partir de blanc d'œuf à dilution 1/35, sont exprimés en variation de densité optique (ΔDO) à 660nm, à différentes températures (Ambiante, 60C°, 70°C et 80C°) en fonction du temps (**figure 17**).

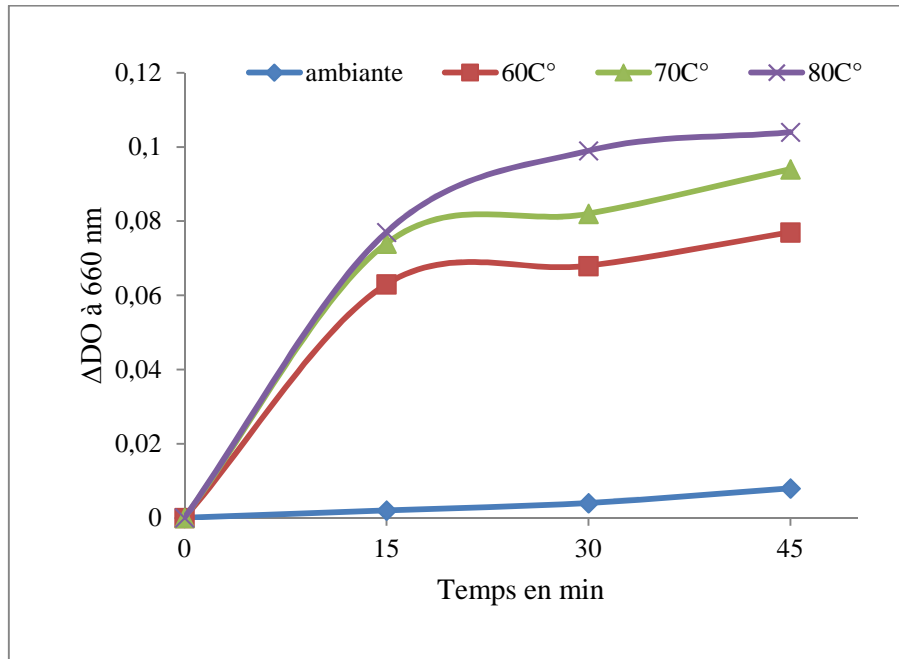


Figure 17 : Variation des DO de l'ovalbumine incubé à différentes températures (Ambiante, 60C°, 70C° et 80C°) en fonction du temps, Mesurer à λ : 660nm.

A partir des résultats de la variation des DO à 660nm de l'ovalbumine à dilution 1/35 incubé à différentes températures, en déduit que plus la température est élevée plus la variation des DO est grande c'est-à-dire la cinétique de dénaturation de la protéine est importante, mais à une température ambiante n'a pas d'effet dénaturant de l'ovalbumine significatif

IV. 2. Effets inhibiteurs de la dénaturation thermique de l'ovalbumine

Pour évaluer l'activité anti-inflammatoire *in vitro* d'extrait méthanolique des graines de nigelles, nous avons utilisé le test de l'inhibition de la dénaturation de l'ovalbumine extraire à partir de blanc d'œuf de poule. Les taux d'inhibition obtenus à différentes concentrations de l'extrait de nigelle sont représentés dans la figure suivante (**Figure 18**).

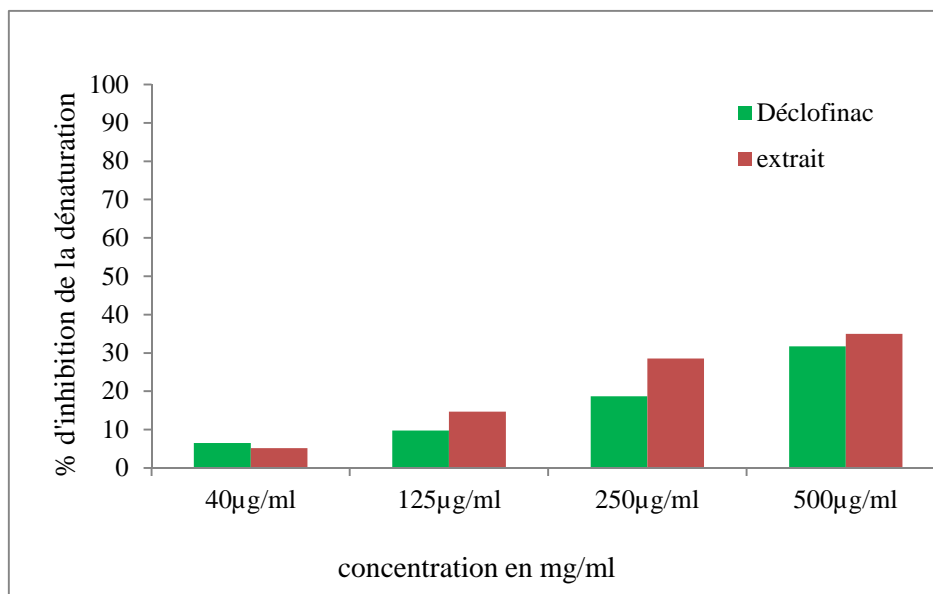


Figure 18 : Taux d'inhibition de la dénaturation d'ovalbumine à différentes concentrations d'extraits méthanoliques des graines de nigelle.

Afin d'évaluer le potentielle anti-inflammatoire des substances bioactives d'extrait étudié, un test d'inhibition de la dénaturation d'albumine a été suivi. En effet la conformation d'une protéine est liée à la structure secondaire et tertiaire, elle est réalisée par l'intermédiaire de liaisons faible énergie (liaisons hydrogène, électrostatiques, hydrophobes et les ponts disulfures) donc fragiles. La dénaturation résulte d'une modification des structures quaternaire, tertiaire et secondaire sans fragmentation de la chaîne peptidique sous l'effet de divers agents chimiques (acide, base, détergent) ou physiques (chaleur, PH) (**Karthik et al.,2013**).

L'augmentation de la température engendre une agitation thermique des atomes de la molécule, donc la dénaturation des protéines passe par des structures éphémères qui peuvent aboutir à un déplissement total de la molécule mais on considère aussi que la dénaturation peut résulter d'un accroissement de structure au-delà de la forme native. Le déplissement analogue à une structure en pelote statistique augmente la stabilité des molécules. Cette dénaturation modifie les propriétés des protéines (**Karthik et al.,2013**).

Le test d'inhibition de la dénaturation des protéines est utilisée *in vitro* à un test d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire, La dénaturation d'une protéine provoque l'induction de la réaction inflammatoire par la production des auto-antigènes, facteurs important pour développer une inflammation chronique. Ce teste dans le but de mesurer le

pouvoir inhibiteur de la dénaturation thermique de protéine par l'extrait méthanolique des graines de nigelle et l'albumine sérique humaine est la protéine utilisée comme model pour ce test. Mais à cause de l'indisponibilité de cette protéine, nous avons utilisé l'ovalbumine extraite du blanc d'œuf, représente la fraction majoritaire des protéines de l'œuf (54%), elle est une source essentiel des nutriments et une importance dans les études immunologiques. **(Karthik et al.,2013).**

A partir des résultats de taux d'inhibition de la dénaturation d'ovalbumine à différentes concentrations d'extraits méthanoliques des graines de nigelle, on constate que le taux d'inhibition augmente significativement avec l'augmentation des concentrations pour l'extrait et le d'éclofénac. En effet à des même concentrations (125 µg/ml, 250 µg/ml et 500 µg/ml) d'extrait des graines de nigelle et le d'éclofénac de sodium (anti-inflammatoire de référence), l'extrait présentent la meilleure efficacité anti-dénaturation thermique de l'ovalbumine que le d'éclofénac. Mais à une concentration de 40µg/ml, l'extrait présente une activité faible que le d'éclofénac vis avis de la dénaturation thermique de l'ovalbumine.

La dénaturation des protéines est une cause bien documentée d'inflammation. Dans le cadre de l'enquête sur les mécanismes de l'activité anti-inflammation, la capacité de l'extrait à inhiber la dénaturer des protéines a été étudiée. En effet l'extrait des graines de nigelles testées présente une efficacité inhibitrice de la dénaturation thermique, ainsi le pouvoir stabilisateur de l'ovalbumine. La stabilisation des protéines par les extraits de nigelle met probablement en jeu des polyphénols et leurs métabolites qui sont agissaient comme des modulateurs des voies de signalisation de l'inflammation **(Sangita et al., 2012).**

V. Discussion générale

Les extraits bruts des plantes commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives notamment les polyphénols et les flavonoïdes connus par leurs propriétés thérapeutiques. Ils font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme alternative pour le traitement des maladies infectieuses, la protection des aliments contre l'oxydation et des anti-inflammatoires. Comme la phytothérapie suscite un renouveau d'intérêt, nous sommes intéressés dans ce travail à l'effet de l'extrait méthanolique des graines de nigelle et son activité antioxydant et anti-inflammatoire **(Jan et al., 2016).**

Les polyphénols inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle fortement réactif. Ils sont également capables de chélater les ions métalliques (largués à partir de leurs protéines de fixation ou de transport) et régénération des formes réduites des vitamines E et C qui peuvent renforcer ces effets délétères par la production des radicaux hydroxyles (OH \cdot). Les flavonoïdes furent d'ailleurs par le passé considérés comme une seule et même vitamine, cofacteur de la vitamine C, qui était appelée vitamine P ou C, en tant qu'antioxydants, les flavonoïdes sont capables d'inhiber la carcinogénèse. Ils inhibent en plus l'angiogénèse, la prolifération cellulaire et affectent le potentiel invasif et métastatique des cellules tumorales (**Hennebelle et al.,2004**).

L'inflammation est la réponse principale de l'organisme à une agression et est précisément régulée afin de limiter les atteintes possibles des structures de l'organisme. Cependant, une régulation inappropriée de ce phénomène peut conduire à un état inflammatoire chronique, la dénaturation des protéines est aussi parmi les causes de l'inflammation par la production d'auto-antigènes dans les maladies inflammatoires qui peut être due à la dénaturation des protéines. D'après nos résultats, on constate que l'extraits de nigelle est capables de contrôlé la production d'auto-antigène par l'inhibition de la dénaturation de l'ovalbumine. L'activité inhibitrice de la dénaturation de la protéine est peut être attribuée a la présence de différents composés bioactifs tels que les flavonoïdes (**Ghedira 2005**).

Les différentes études menées sur les effets protecteurs des polyphénols et leurs métabolites dans ces contextes pathologiques ont montré que ceux-ci diminuaient les marqueurs de l'inflammation et agissaient sur de nombreuses cibles moléculaires au centre des voies de signalisation de l'inflammation par modification de métabolisme de l'acide arachidonique, par inhibition de la COX-1 et COX-2 (**Ghedira 2005**).

Conclusion

De nos jours, un grand nombre de plantes médicinales possèdent des propriétés biologiques très importantes liées certainement aux vertus thérapeutiques attribués à une gamme extraordinaire de molécules bioactives synthétisées par la plante non seulement comme des agents chimiques contre les maladies, les herbivores et les prédateurs mais aussi comme des agents médicinaux tels que les antioxydants.

Au cours de cette étude, nous avons effectué différentes analyses afin d'évaluer les teneurs en composés phénoliques : polyphénols totaux et flavonoïdes dans l'extrait méthanolique des graines de nigelle, ajoutant l'activité antioxydante et anti-inflammatoire *in vitro*.

Dans la première partie la quantification des composés phénoliques par des méthodes spectrophotométriques a été effectuée. Les résultats obtenus nous ont révélé que les graines de nigelles étudiées, constituent une source prometteuse en polyphénols totaux ($33,869 \pm 0,297$ mgEqAG/g d'extrait) et présentent des teneurs en flavonoïdes de ($2,600 \pm 0,046$ mgEqQ/g d'extrait).

La deuxième partie a été consacrée à l'étude des propriétés antioxydantes d'extraits des graines de nigelle par deux méthodes, la méthode de réduction de radical libre ABTS et le test de pouvoir réducteur. Les résultats ont révélé des réponses réductrices intéressantes des radicaux ABTS^{•+} et du fer ferrique.

D'autre part, l'étude de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits des graines de nigelle a prouvé une activité de stabilisation des protéines contre la dénaturation thermique avec une efficacité comparable à celle de l'anti-inflammatoire non stéroïdien le d'éclofénac.

Ces résultats restent préliminaires et nécessitent des études complémentaires approfondies à différents niveaux de l'approche à travers une caractérisation fine et poussée sur d'autres composés des graine de nigelle par d'autres techniques, afin d'établir une relation structure activité. Les activités antioxydantes et anti-inflammatoires doivent être évaluées dans d'autres systèmes *in vitro* (cellulaires et enzymatiques) comme *in vivo* (modèle animal) pour mieux cerner les interactions moléculaires de ces composés vis-à-vis de leurs cibles.

- **Adrach verma, M., Ajay Kumar, P., Kavitha, D., Aurag, KB. (2011).** Anti denaturation and antioxidant activity of *Annon cherimola in vitro*. *International Journal of Pharma and Bio Science*, 2 (2): 1-6.
- **Afonso, V., Champy, R., Mitovic, D., Collin, P., Lomri, A. (2007).** radicaux libres dérivés de l'oxygène superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *revue du rhumatisme*, (74): 636-643.
- **Agradi, E., Fico, G., Cillo, F., Frannisci, C., Tomé, F. (2002).** Estrogenic activity of *Nigella damascene* extracts evaluated using a recombinant yeast screen. *phytother. Res*, (16): 414-416.
- **Al Jassir, S.M. (1992).** Chemical composition and micoflora of black cumin (*Nigella sativa*) seeds growing in Saudi Arabia. *Food Chemistry*, (45): 239-242.
- **Atta, M.B. (2003).** Some characteristic of nigella (*nigella sativa L*).seed cultivated in Egypt and I its lipid profile. *Food chemistry*, (38):63-68.
- **Bacchi, S., Palumbo, P., Sponta, A., Coppolino, MF. (2012).** Clinical pharmacology of non-steroidal anti-inflammatory drugs: a review. *Anti-inflammatory Anti-allergy, Agents Med Chem*, (11): 52-64.
- **Badary, OA., Taha, AM., El-Din Gamal and Bdel-Wahab, MH. (2003).** Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug. Chem. Toxicol*, (26): 87-98.
- **Bidié, A.P., Koffi, E., N'guessan, JD., Djaman, A.J. & Guédé-Guina, F. (2008).** Influence of *Mitragyna ciliata* (MYTA) on themicrosomalactivity of ATPase Na⁺/K⁺ dependent extract on a rabbit (heart) *Afr J Trad CAM*, (5): 294-301.
- **Carvalho, R., Galvão, E., Barros, J.Â., Conceição, M. (2012).** Extraction fatty acid profile and antioxidant activity of sesame extract (*Sesamum Indicum L.*). *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 1104-6632.
- **Charles, N.S., Peter, A.W., Derek, W.G. (2010).** "*Fundamentals inflammation*" Cambridge University Press, p: 2-3.
- **Datta, P., Battacharjee, S., Nath, A., Das, R., Batcharjee, C et Datta, S. (2009).** Separation of ovalbumine from chicken egg white using two-stage ultra filtration technique separation and purification technology, (66): 353-361.
- **Delattre, J., Durant, G., Jardillier, C. (2003).** Biochimie pathologique, aspects moléculaires et cellulaires. Édition Flammarion, pp : 176.

- **Demir, H.M., Kanter, O., Coskun, Y., Yildiz, A. (2006).** Effect of black cumin (*Nigella sativa*) on heart rate, some hematological values and pancreatic beta-cell damage in cadmium-treated rats. *Biol. Trace. Elem. Res*, 110: 151-162.
- **Dizadaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., Rodriguez, H. (2002).** Free radical induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology & Medicine*, 32: 1102–1115.
- **Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P et Vidal, N. (2006).** Antioxydant activity of some Algerian medicinal plants extracts compound. *Food Chemistry*, 97: 654-660.
- **Errajraji, A., Ouhdouch, F., El-Anssari, N. (2010).** Usage des plantes médicinales dans le traitement du diabète de type 2 au Maroc: Use of medicinal plants for type 2 diabetes treatment, in Morocco. *Médecine des Maladies Métaboliques*. Volume 4, Issue 3, P : 301–304.
- **Favier, A. (2003).** Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension Des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.
- **Fico, G., Bracaa, A., Tomé, Fet Morelli, I. (2001).** A New phenolic compound from *Nigella damascena* seeds. *fitoterapia*, 72:642-463.
- **Fiebich, BL., Chrubasik, S. (2004).** Effects of an ethanolic *Salix* extract on the release of selected inflammatory mediators in vitro. *Phytomedicine*, 11: 135–138.
- **Gamze, K., Ahmet, İ., Başak, Ö., Cihangir, U. (2006).** Morphology and stem anatomy of some species of genus *Nigella*. *J. Fac. Pharm, Ankara*, 35 (1) 19 - 41.
- **-Garbacki, N., Tits, M., Angenot, L., et al. (2004).** Inhibitory effects of proanthocyanidins from *Ribes nigrum* leaves on carrageen in acute inflammatory reactions induced in rats. *BMC Pharmacol*, 4: 25.
- **Ghedira, K. (2005).** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 4: 162-169.
- **Grant, L., Mcbean, DE., Fyfe, L., et al. (2007).** A review of the biological and potential therapeutic actions of *Harpagophytum procumbens*. *Phytother. Res*, 21: 199–209.
- **Guinard, J.L. (2001).** In <<Botanique systématique moléculaire>>. 12^{ème} Edition Masson, paris, p304.

- **Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F. (2004).** Polyphénols végétaux sources utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 1: 3-6.
- **Hennebelle, S., Sahpaz, F., Bailleul. (2007).** Plantes sédatives : évaluation pharmacologique et clinique. *Médecine du Sommeil*. Volume 4, Issue 13, P4-1.
- **Heshmati, J., Namazi, N, (2015).** Effects of Black Seed (Nigella Sativa) on Metabolic Parameters in Diabetes Mellitus: A Systematic Review. *Complement Ther, Med*, 23 : 629–631.
- **Jackson, L., and Evers, B.M. (2006).** Chronic inflammation and pathogenesis of GI and pancreatic cancers, in: The link between inflammation and cancer. *Springer US*, vol, 130, P, 39-65.
- **Jan, T., Ludvik, Bo., Lukas, H. (2016).** Phenolic composition, antioxidant and anti-proliferative activities of edible and medicinal plants from the Peruvian Amazon. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26, 728-737.
- **Karthik, K., Bharath, R.P., Venu Priya, R., Sunil Kumar, K., Ranjith Singh, B., Rathore. (2013).** Evaluation of anti-inflammatory activity of *canthium parviflorum* by in-vitro method. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology* 2320 – 3471.
- **Kim, KH., Lee, EN., Park, JK., et al. (2012).** Curcumin Attenuates TNF- α -induced Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1, Vascular Cell Adhesion Molecule-1 and Pro inflammatory Cytokines in Human Endometriotic Stromal Cells. *Phytotherapy Research*, 26: 1037–1047.
- **Kostova, I., Iossifova, T. (2007).** Chemical components of *Fraxinus* species. *Fitoterapia*, 78: 85–106.
- **Ksouri, R., Megdich., Falleh, H., et al. (2008).** Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *compte Rendues de biologie*, 331: 865-873.
- **Marrassini, C., Acevedo, C., Mino, J., et al. (2010).** Evaluation of Antinociceptive, Anti inflammatory Activities and Phytochemical Analysis of Aerial Parts of *Urtica urens* L. *Phytother. Res*, 24: 1807– 1812.
- **Mashhadian, V., akhshandeh, H. (2005).** Antibacterial and antifungal effects of *nigella sativa* extracts against *S. Aureus*, *P. Aeruginosa* and *C. Albicans*. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 21: 147-152.

- **Meziti, A. (2009).** Activité antioxydante des extraits des grains de *Nigella sativa* L. Etude *in vitro* et *in vivo*. Thèse de magistère. Département des Sciences Biologiques. Université de EL-Haj Lakhdar (Batna).
- **Nicolaides, NC., Galata, Z., Kino, T., Chrousos, G., Charmandari, E. (2010).** The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids*, 75:1–12.
- **Oyaizu, M. (1986).** Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jap. J. Nutr.* 44: 307-315.
- **Parihar, A., Parihar, MS., Milner, S. (2008).** Bhat S. Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. *Burns*, 34:6-17.
- **Penna, C., Mancardi, D., Rastaldo, R., Pagliaro, P. (2009).** Cardio protection: A radical view Free radicals in pre and post conditioning. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1787: 781–793.
- **Pham-Huy, M., et Hébuterne, X. (2008).** Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International journal of Biochemical Science*, 4(2):89-96.
- **Quettier-Deleu, C., Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C., et Luyckx, M. (2000).** Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hull and flour. *Journal of Ethnopharmacology*, 72, 35-42.
- **Rao, P.S., Kalva, S., Yerramilli, A., and Mamidi, S. (2011).** Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science*, 4(2):89-96.
- **Re, R., Pellegrini, N., Rroteggente, A., Pannala, A., Yang, M., et Riz-Rice-Evans. (1999).** Activité antioxydante appliquant une analyse améliorée de décoloration de cation radical d'ABTS, *radical libre bio .med*, 26,123-137.
- **Regnult, J. P. (1992).** Immunologie générale .5^{ème} édition Decarie. P278-296.
- **Ribereau-Gayon, P. (1972).** Propriétés chimiques des phénols. In "les composés phénoliques des végétaux". Edition Dunod Paris, p : 29-57.
- **Ryan, I. (2013).** Polyphenol bioaccessibility and sugar reducing capacity of black, green, and white teas. *Int J Sci*.
- **Sangita, C., Priyanka, C., Protapaditya, D., Sanjib, B. (2012).** Evaluation of *in vitro* anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein Asian Pacific. *Journal of Tropical Biomedicine*, S178-S180.

Références bibliographiques

- **Sarkhel, S. (2015).** Evaluation of the anti-inflammatory activities of *Quillaja saponaria*. *Toxicology Report*, 2: 1-3.
- **Seifried, H. E., Anderson, DE., Fisher EI, Milner JA. (2007).** A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *Journal of Nutritional Biochemistry*; 18: 567–579.
- **Sies, H., (1991).** Oxidative stress: introduction In: oxidative stress oxidants and antioxidants .H. Sies Ed. London .*London academicpress*, pp15-22.
- **Su, X., wang, Z., Liu, J. (2009).** In vitro antioxidant activity of *pinus koraiensis* seed extract containing phenolic compounds .*food chemistry*, 117, p.681-186.
- **Talbi, H., Boumaza, A., El-mostafa, K., Talbi, J., HilaliA. (2015).** Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. *Mater. Environ. Sci*, 6 (4) 1111-1117.
- **Weill, B., Batteux , F., Dhainaut, J. (2003).** Immunopathologie et réactions inflammatoires .Eds, De Beock université (paris), p12-13.
- **Zohary, M. (1983).** The genus *nigella* (ranunculaceae)-a taxonomic revision .*plant systematic and +evolution* 142, 71-107.

Résumé

Ce travail est effectué dans le but d'évaluer l'activité antioxydante et anti-inflammatoire d'extrait méthanolique des graines de nigelle. A l'issue de dosage, les taux obtenues en polyphénols totaux sont de (33,869±0,297mgEAG/g d'extrait) et en flavonoïdes est de (2,600±0,046mgEQ/g d'extrait), les tests d'ABTS et de pouvoir réducteur ont montré que l'activité antioxydante d'extrait de nigelle est plus faible que le trolox et le BHA respectivement. Les résultats de l'étude de l'activité anti-inflammatoire *in vitro*, par test d'inhibition de la dénaturation thermique de l'ovalbumine montrent que l'extrait méthanolique des graines de nigelle présente une efficacité inhibitrice légèrement supérieure à celle du déclofénac.

Mots clés : graines de nigelle, polyphénol, flavonoïde, activité anti-inflammatoire, activité antioxydante.

Abstract

This work is carried out with the aim of evaluating the antioxidant and anti-inflammatory activity of methanol extract of the seeds of nigella. At the end of the assay, the total polyphenol levels were (33.869 ± 0.297mgEAG / g extract) and flavonoids was (2.600 ± 0.046mgEQ / g extract), ABTS and Reducing power have shown that the antioxidant activity of nigel extract is lower than the trolox and BHA respectively. The results of the study of the anti-inflammatory activity *in vitro*, by test of inhibition the thermal denaturation of the ovalbumin shows that methanol extract of the seeds of nigella presents an inhibitory efficacy slightly higher than that of diclofenac.

Keys words: nigella seeds, polyphenol, flavonoid, anti-inflammatory activity, antioxidant activity.

ملخص

يتم تنفيذ هذا العمل من أجل تقييم نشاطية مضادات الأكسدة ومضادات الالتهابات لمستخلص الميثانول لبذور حبة البركة. في نهاية القياس، تم الحصول على معدلات البوليفينولات الاجمالية هي (33.869±0.297mgEAG/g من المستخلص) والفلافونيدات هي (2.600±0.046mgEQ/g) من المستخلص ، أظهر اختبار ABTS و الحد من القوة لمستخلص حبة البركة أن نشاطية مضادات الأكسدة أقل من trolox و BHA على التوالي. نتائج دراسة النشاط المضاد للالتهابات في المختبر، عن طريق اختبار تثبيط تمسخ الحراري للزلال تبين أن مستخلص الميثانول من بذور حبة لديه فعالية مثبطة أكبر قليلا إلى أن من ديكلوفيناك.

كلمات البحث: بذور حبة البركة ، البوليفينول ،الفلافونيد،النشاط المضاد للالتهاب، النشاط المضاد للأكسدة.

