

Réf.....

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université BLIDA 1
Faculté des Sciences
Département de Chimie



Mémoire Présenté par
HEMMI Ouidad
En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine : Science de la matière
Filière : Chimie
Option : Chimie des Substances Naturelles

Titre

Extraction et étude qualitative et quantitative de l'huile
et des flavonoïdes des graines de « *Nigella sativa L* ».
Détermination de l'activité antioxydante

Soutenu publiquement en Septembre 2015 devant le jury composé de :

A. Badis	Pr	Président	Université de Blida I
Y. Daghbouche	Pr	Examineur	Université de Blida I
K. Boutemak	MCB	Promoteur	Université de Blida I

Promotion 2014 - 2015

Remerciements

J'exprime d'abord mes profonds remerciements à mon DIEU qui m'a donné le courage et la volonté d'achever ce travail.

*Je voudrais remercier à ma promotrice **Dr .K. BOUTEMAK** docteure à l'université Saad Dahleb de Blida I, pour avoir accepté de m'encadrer, et pour ses conseils très importants durant toute la période de cette recherche. Qu'il trouve ici mes sentiments de gratitude et l'expression de ma vive reconnaissance.*

*Je remercie également le **Pr. M. EL HATTAB**, Professeur à l'université Blida I, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, et qui, durant ces deux années m'a gratifiée de son savoir et son aide scientifique avec générosité.*

*Mes remerciements vont également au **Pr. Y. DAGHBOUCHE**, **Dr S. KASMI**, et au **Dr. N. BOUZIDI**, pour leur gentillesse et leurs précieux conseils.*

*J'adresse mes remerciements particuliers à **Mme O. TOUAFK**, Responsable du Master Chimie des Substances Naturelles, et lui voue tous mes respects pour sa modestie, son aide et sa précieuse présence pour l'accomplissement de mon travail.*

*Je tiens à exprimer mes remerciements au **Pr. A. BADIS**, pour l'honneur qu'elle ma fait en acceptant de présider le jury de soutenance.*

*J'adresse mes sincères remerciements à **Pr. Y. DAGHBOUCHE** qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail.*

*En guise de reconnaissance, mes sincères remerciements se dirigent vers les
membres de ma famille ainsi que tous mes amis.*

*Je ne pouvais finir sans remercier très fortement mes parents, pour leurs aides,
leur soutien moral et leurs encouragements. Je leurs exprime toute ma
reconnaissance et ma profonde gratitude.*

Résumé

Cette étude a été réalisée sur l'une des espèces algériennes largement utilisée, « *Nigella sativa* » de la famille des Renonculacées. L'huile végétale extraite par soxhlet à partir des graines de cette espèce a révélé un rendement de l'ordre de 16.64%. La détermination de sa composition chimique par CG/MS a montré que cette huile est très riche en acides gras insaturés (80,58 % de l'huile totale), dont le composé majoritaire est l'acide linoléique (54,3 %).

L'extraction des flavonoïdes à partir des graines de *Nigella sativa* L. a été réalisée par macération dans un mélange hydroalcoolique (éthanol/eau). Et puis par un affrontement par divers solvants organiques. L'estimation quantitative des polyphénols totaux a montré que l'extrait aqueux présentait la fraction phénolique la plus élevée avec une teneur de (180.245±0.216 µg EAG/g d'extrait). L'estimation quantitative des flavonoïdes totaux a montré que l'extrait n-butanol présentait la fraction la plus riche en flavonoïdes avec une teneur de (24.338 ±0.219 µg ER/g d'extrait).

L'évaluation de l'activité antioxydante a montré que l'extrait acétate d'éthyle présentait un pouvoir réducteur plus élevé en utilisant la méthode de réduction de fer et la méthode de piégeage du radical libre (IC50= 0.717 mg/ml mais cette capacité est inférieure à celle de l'acide ascorbique IC 50= 0.359 mg/ml).

Mots clés : *Nigella sativa* L., huile végétale, flavonoïdes , activité antioxydante.

ملخص

هذه الدراسة اجريت على احد النباتات الجزائري التي تعتبر من بين احد الانواع الاكثر استخداما " حبة البركة" من عائلة الحودان.تم استخراج الزيت النباتي من قبل سوكسليت ,هذه البذور اعطت مردودا يقدر ب (%16.64) وقد تم تحديد التركيب الكيميائي بواسطة كروماتوغرافية الغازية/ الوصف الكمي وقد اظهرت ان هذا الزيت غني جدا بالاحماض الدهنية الغير مشبعة (80.58% من الزيت النباتي) الذي اظهر العنصر الرئيسي هو حمض اللينوليك (%54.3).

تم اجراء استخراج فلافونيدات من بذور حبة البركة. عن طريق النقع في مزيج كحول مائي (الايثانول /الماء) و من ثم المعالجة بالمذيبات العضوية. اظهر التقرير الكمي لإجمالي البوليفينول الكلية ان المستخلص المائي يملك اعلى محتوى (180.324 ± 0.216) مكغ معادل حمض الغليك/غرام من استخراج) ,اظهر التقرير الكمي من اجمالي مركبات الفلافونويد الكلية ان مستخلص ن-بيوتانول غني جدا بالفلافونويد مع محتوى (24.338± 0.219) مكغ معادل الغوتين/غرام من استخراج).

واظهر تقييم النشاط المضادات للأكسدة ان مستخلص خلات الايثيل له النشاط الاعلى باستخدام طريقة ارجاع الحديد طريقة تنشيط الجذر الحر IC50= 0.717 ملغ /مل ولكن القدرة هي اقل من حمض الاسكوربيك IC50= 0.359ملغ/مل

الكلمات البحث : حبة البركة, الزيت النباتي الفلافونويد, النشاط المضاد للأكسدة .

Abstract

This study was performed on one species widely Utilised Algerian, "Nigella sativa" of the family Ranunculaceae. Vegetable oil extracted by soxhlet from the seeds of this species revealed a yield of about 16.64%. The determination of its chemical composition by GC / MS showed that this oil is rich in unsaturated fatty acids (80.58% of the total oil), whose major component is linoleic acid (54.3%).

Extraction of flavonoids from the seeds of Nigella sativa L. was carried out by maceration in an alcohol mixture (ethanol / water). And then a confrontation with various organic solvents. The quantitative estimation of total polyphenols showed that the aqueous extract showed the highest phenolic fraction with a content of $180.245 \pm 0.216 \mu\text{g EAG} / \text{g}$ of extract). The quantitative estimation of total flavonoids showed that n-butanol extract had the highest flavonoid-rich fraction with a content of $(24,338 \pm 0.219 \mu\text{g ER} / \text{g}$ of extract).

Evaluation of antioxidant activity showed that the ethyl acetate extract had a higher reducing power using the iron reduction method and the method of trapping free radicals ($\text{IC}_{50} = 0.717 \mu\text{g} / \text{ml}$ but this capacity is less than that of ascorbic acid $\text{IC}_{50} = 0.359 \mu\text{g} / \text{ml}$).

Keywords: Nigella sativa L., vegetable oil, flavonoids, antioxidant activity,

Liste des abréviations

NS : *Nigella sativa*

HV : Huile végétal

CCM : Chromatographie sur couche mince

DPPH : 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyle

EA : Extrait aqueux

EAc: Extrait acétate d'éthyle

EBr : Extrait brut

EBuOH : Extrait butanolique

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power

CG/MS : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

HPLC : La chromatographie liquide à haute performance

IC50 : pourcentage d'inhibition de DPPH à 50%

mg EAG /g E : milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait

µg EQ/g E : milligramme équivalent de quercétine par gramme d'extrait

Rf : rapport frontal

RMN : résonance magnétique nucléaire

Tr : temps de rétention

UV: ultra violet

PL : phospholipides

GLC / FID : chromatographie liquide gazeuse avec détecteur à ionisation de flamme

Liste des figures :

Figure 01 : La plante de <i>Nigella sativa</i> L.....	06
Figure 02 : La Fleure de <i>Nigella sativa</i> L.....	07
Figure 03 : Les graines de <i>Nigella sativa</i> L.....	08
Figure 04 : Structure chimique des principaux alcaloïdes de <i>Nigella sativa</i>	15
Figure 05 : Le saponoside l'a-hédérine	16
Figure 06 : Trois flavonoïdes isolés des graines de <i>N. sativa</i>	17
Figure 07 : Structure des polyphénols de <i>Nigella sativa</i>	18
Figure 08 : Quelques constituants de la fraction glycéridique.....	24
Figure 09 : Acide gras	25
Figure 10 : Quelques exemples d'acides gras insaturés.....	25
Figure 11 : montage extraction par solvant.....	27
Figure 12 : Exemple de quelque acides phénols de la série benzoïque	31
Figure 13 : Exemple de quelques acides phénols de la série cinnamique	31
Figure 14 : Structure de cation flavylum ou 2-phényl- 1-benzopyrilium.....	32
Figure 15 : Structure de base des flavonoïdes	33
Figure 16 : Structure de Flavonols	33
Figure 17 : Structure de Flavones	33
Figure 18 : Structure de Flavanones.....	34
Figure 19 : Structure de dihydroflavonols.....	34
Figure 20 : Structure de Flavan-3-ols.....	34
Figure 21 : Structure de flavan-3,4-diols.....	34
Figure 22 : Structure de anthocyanidols.....	35
Figure 23 : Structure de chalcones.....	35
Figure 24 : Structure d'aurone.....	35
Figure 25 : Les graines <i>Nigella sativa</i> (1) Algérienne (2) Indienne	39
Figure 26 : montage de Soxhlet	41
Figure 27 : schéma de l'extraction des flavonoïdes de <i>Nigella sativa</i>	46
Figure 28 : représente les rendements d'huile végétale	52
Figure 29 : huile végétale des graines de <i>Nigella sativa</i> (1) Algérienne et (2) Indienne	53
Figure 30 : Chromatogramme d'analyse de l'huile végétale des graines de <i>Nigella sativa</i>	56
Figure 31 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'acide ascorbique	57

Figure 32 : Pourcentage d'inhibition de DPPH par huile végétale de NS Algérienne.....	57
Figure 33 : Pourcentage d'inhibition de DPPH par huile végétale de NS Indienne.....	58
Figure 34 : Les valeurs d'IC50 des huiles végétales d' <i>Nigella sativa</i> et témoin déterminées par le test au DPPH	58
Figure 35 : Les fractions des graines de <i>Nigella sativa</i> (1) éther diéthylique, (2) acétate d'éthyle, (3) n-butanol, (4) Aqueuse.	60
Figure 36 : Rendements en (%) des extraits étudiés de <i>Nigella sativa</i>	61
Figure 37 : Droite d'étalonnages de l'acide gallique (moyenne \pm SD de trois essais).	62
Figure 38 : Droite d'étalonnages de la Rutine.	62
Figure 39 : plaque CCM des extraits flavonique de <i>Nigella sativa</i> (1) NS Algérienne, (2) NS Indienne	65
Figure 40 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH	69
Figure 41 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'acide ascorbique	69
Figure 42 : Pourcentage d'inhibition de DPPH par l'extrait éther diéthylique	70
Figure 43 : Pourcentage d'inhibition de DPPH par l'extrait acétate d'éthyle	70
Figure 44 : pourcentage d'inhibition de DPPH par l'extrait n- butanol	71
Figure 45 : Pourcentage d'inhibition de DPPH par l'extrait Aqueuse	71
Figure 46 : Les IC50 des différents extraits e <i>Nigella sativa</i> Algérienne et de l'acide ascorbique	73
Figure 47 : pouvoirs réducteurs des quatre extraits	74
Figure 48 :pouvoir réducteur de l'acide ascorbique	74

Liste des Tableaux :

Tableau 01 : Composition générale des graines de <i>Nigella sativa</i>	09
Tableau 02 : Composition des huiles fixes de <i>Nigella sativa</i> tunisienne.....	11
Tableau 03 : Taux des lipides de l'huile fixe de <i>Nigella sativa</i> extraite par différentes Méthodes.....	11
Tableau 04 : Composition (en pourcentage des huiles fixes) des graines <i>Nigella sativa</i> en acides gras selon l'origine de l'échantillon.....	12
Tableau 05 : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Nigella sativa</i> identifiée par GC-MS.....	13
Tableau 6 : Composition chimique des constituants volatils de <i>Nigella sativa</i> L.....	14
Tableau 07 : composition minérale des graines de <i>Nigella sativa</i>	19
Tableau 08 : Rendement de deux variétés de graines de <i>Nigella sativa</i>	52
Tableau 09 : Propriétés organoleptiques de l'huile végétale des graines de <i>Nigella sativa</i>	53
Tableau 10 : Caractéristiques physico-chimiques de l'huile végétale des graines de <i>Nigella sativa</i>	53
Tableau 11 : Composés identifiés dans l'huile végétale des graines de NS par GC/MS.	55
Tableau 12 : variation de pourcentage d'inhibition en fonction de concentration de standard acide ascorbique	56
Tableau 13 : variation du pourcentage d'inhibition en fonction de concentration d'huile végétale de <i>Nigella Sativa</i> Algérienne	57
Tableau 14 : variation de pourcentage d'inhibition en fonction de concentration d'huile végétale de <i>Nigella sativa</i> Indienne	57
Tableau 15 : Valeurs des IC50 des huiles végétale et témoin déterminées par le test au DPPH.....	58
Tableau 16 : Aspects, couleurs et rendements des diverses fractions extraites à partir des graines de <i>Nigella sativa</i>	60
Tableau 17 : variation d'Absorbance en fonction de concentration de standard Acide gallique	62

Tableau 18 : variation de pourcentage d'inhibition en fonction de concentration de standard rutine	62
Tableau 19 : Résultats du dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes condensés dans les extraits de <i>Nigella sativa</i> Algérienne	63
Tableau 20 : Résultats du dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes condensés dans les extraits de <i>Nigella sativa</i> Indienne	63
Tableau 21 : comportement chromatographique des extraits EEt, EAc, n-BuOH , EAq de <i>Nigella sativa</i> Algérienne	66
Tableau 22 : comportement chromatographique des extraits EEt, EAc, n-BuOH , EAq de <i>Nigella sativa</i> Indienne	67
Tableau 23 : Les résultats de la chromatographie sur couche mince des témoins des composés phénoliques Système solvants 1.....	67
Tableau 24 : Les résultats de la chromatographie sur couche mince des témoins des composés phénoliques système 2	68
Tableau 25 : La relation entre la fluorescence et les flavonoïdes	68
Tableau 26 : Variation des inhibitions en fonction des différentes concentrations des standards d'antioxydants acide ascorbique	69
Tableau 27 : Variation des inhibitions en fonction des différentes concentrations d'extrait éther diéthylique	70
Tableau 28 : Variation des inhibitions en fonction des différentes concentrations d'extrait d'acétate d'éthyle	70
Tableau 29 : Variation des inhibitions en fonction des différentes concentrations d'extraitn-butanol	71
Tableau 30 : Variation des inhibitions en fonction des différentes concentrations d'extrait aqueux	72
Tableau 31 : valeurs des IC50 établies pour chaque extrait ainsi que celle de l'acide ascorbique	71
Tableau 32 : Variation des absorbances en fonction des différentes concentrations des standards d'antioxydants	74

Sommaire

Introduction générale	01
-----------------------------	----

Synthèse bibliographique

Chapitre I. présentation de l'espèce de *Nigella sativa*

I. Introduction	05
II. Présentation de l'espèce <i>Nigella sativa</i> .L	05
II.1. Systématique	06
II.2. Noms vernaculaires	06
II.3. Description botanique de l'espèce <i>Nigella sativa</i> .L	07
III. Répartition géographique	08
IV. Composition chimique de l'espèce de <i>Nigella sativa</i>	08
V. Travaux antérieurs déjà réalisés sur l'espèce <i>Nigella sativa</i> .L	09
V.1. Etude chimique de l'espèce <i>Nigella sativa</i> .L	09
V.2. D'autres travaux déjà réalisés sur les graines	19
VI. USAGES	20
VI.1. Usages culinaire	20
VI.2. Usages en médecine traditionnelle	20

Chapitre II : Les huiles végétales

II.1. Introduction	23
II.2. Composition des huiles végétales	23
II.2.1. Les glycérides	24
II.2.2. La fraction insaponifiable	25
II.2.3. Les acides gras	25
II.3. Les méthodes d'extraction des acides gras	25
II.3.1 L'extraction par solvant organique	27
II.3.2. Description de l'extraction par Soxhlet	27

Chapitre III : Les flavonoïdes

III.1. Généralités	30
III.2. Définition des polyphénols	30
III.3. Classification des polyphénols	30
III.3.1. Les acides phénols	30
III.3.2. Les anthocyanes	31
III.3.3. Les tannins	32
III.3.4. Les flavonoïdes	32
III.3.4.1. Structure chimique	33
III.3.4.2. Classification des flavonoïdes	33
III.3.4.2.1. Flavones et flavonols	33
III.3.4.2.2. Flavanones et dihydroflavonols	34
III.3.4.2.3 Flavan-3-ols, flavan-3,4-diols et anthocyanidols	34
III.3.4.2.4. Chalcones et aurones	35
III.3.3. Activité biologiques des flavonoïdes	35
III.3.3.1. Activité antibactérienne	35
III.3.3.2. Activité anticancéreuse	36
III.3.3.3. Activité anti inflammatoire	37

Etude expérimentale

Chapitre I : matériel et méthodes

I.1. Matériel	39
I.1.1. Matière végétale	39
I.1.2. Réactifs	40
I.2. Méthodes	40
I.2.1 Extraction d'huiles végétales par Soxhlet	40
I.2.2. Appareillage	40
I.2.3 Protocole expérimental d'extraction de l'huile végétale	41
I.2.4. Calcul du rendement en huile végétale	41
I.2.5. Propriétés physico-chimiques et organoleptiques de l'huile végétale	42
I.2.6. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS)	42
I.2.6.1. Préparation des dérivés esters méthyliques d'acides gras	42
I.2.7. Évaluation de l'activité antioxydant des huiles végétales	43

I.2.7.1.Méthode de piégeage de radical libre DPPH	43
I.2.7.1.1. Principe	43
I.2.7.1.2. Mode opératoire	44
I.2.7.1.3. Calcul des IC50	44
I.2.8. Extraction des flavonoïdes	44
I.2.8.1.Protocole expérimental	44
I.2.8.1.1. Préparation de l'extrait brut	44
I.2.8.1.2.Fractionnement de l'extrait brut	45
I.2.8.1.3.Les rendements en extraits secs flavonoïques obtenus à partir de l'espèce étudiée	47
I. 2.9. Dosage des polyphénols	47
I.2.9.1. Principe	47
I.2.9.2.Mode opératoire	47
I.2.9.3. Expression des résultats	48
I.2.10. Dosage des flavonoïdes	48
I.2.10.1. Principe	48
I.2.10.2. Mode opératoire	48
I.2.10.3.Expression des résultats	49
I.2.11. Analyse qualitative par chromatographique sur couche mince CCM	49
I.2.12. Etude de l'activité antioxydant des fractions flavonoïdes	49
I.2.12.1.Méthode de piégeage de radical libre DPPH	50
I.2.12.2 Méthode de Réduction du fer : FRAP	50

Chapitre II : Résultats et discussion

II.1.Calcul du rendement d'extraction des huiles végétales	52
II.2.Propriétés organoleptiques de l'huile végétale des graines de <i>Nigella sativa</i>	52
II.3.Caractéristiques physico-chimiques et de l'huile végétale des graines de <i>Nigella sativa</i>	53
II.4. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS)	54
II.5. Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode de DPPH de l'huile végétale extraite	56

II.6. Extraction des flavonoïdes	59
II.6.2. Dosage spectrophotométrique	61
II.6.2.1. Dosage des Polyphénols totaux, des flavonoïdes	61
II.7. Analyse qualitative par chromatographie sur couche mince CCM	65
II.8. Evaluation de l'activité antioxydante	68
II.8.1. Test de piégeage du radical libre DPPH	68
II.8.2. Méthode de Réduction du fer : FRAP	73
Conclusion	77
références bibliographique	81
Annexe	91

Introduction générale

Introduction générale

Les substances naturelles connaissent un intérêt croissant pour des applications dans de nombreux produits de consommation. Depuis des milliers d'années, l'homme qui vit cote à cote avec les plantes, est habitué à les consommer pour leurs propriétés médicinales et nutritives. Les produits naturels présentent un grand intérêt comme matière première destinée aux différents secteurs d'activité tels que : le cosmétique, la pharmacie, l'agroalimentaire et le phytosanitaire [1]. L'utilisation des plantes, a des fins thérapeutiques, est rapportée dans les littératures antiques arabe, chinoise, égyptienne, hindou, grecque, romaine. Le pouvoir thérapeutique des plantes était connu par nos ancêtres de façon empirique [2] Ainsi, on ignorait tout de la composition chimique des remèdes utilisés tous les jours par de nombreuses populations, pour les soins de santé.

Les huiles végétales sont des matières grasses insolubles dans l'eau, généralement liquides à température ambiante, qui sont obtenues par pressage des parties riches en huile (généralement les graines). Ils sont des matières très précieuses dont la composition varie d'une plante à l'autre en fonction des acides gras qui la composent [3]. Un acide gras est une molécule composée d'atomes de carbone liés entre eux et qui forment une chaîne. Cette chaîne est plus ou moins longue selon le nombre d'atomes qui la composent. C'est la qualité des acides gras qui va déterminer la qualité des corps gras et l'utilisation que l'on va en faire. On rencontre dans la nature deux grandes familles d'acides gras : les acides gras saturés et les insaturés [4].

L'étude de la chimie des plantes est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives. Cette matière végétale contient un grand nombre de molécules qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire, en cosmétologie et en pharmacie [5].

Les polyphénols sont en effet doués de multiples vertus thérapeutiques, ils jouent un rôle très important, principalement, dans la lutte contre les cancers, les maladies cardiovasculaires et la peroxydation lipidique. Expliquant de ce fait leur grande utilisation dans la fabrication des médicaments. Ils interviennent aussi dans la protection des plantes contre les différentes attaques microbiennes (surtout fongiques) risquant de causer la perte d'une grande quantité de végétation [6].

Les flavonoïdes constituent un groupe de produits naturels appartenant à la famille des

Polyphénols, largement représentés dans la quasi-totalité des plantes, faisant partie intégrante de notre nourriture quotidienne. Ils possèdent potentiellement des activités biologiques, anti-inflammatoires, anti-cancérogènes, antimicrobiennes et anti-oxydantes.

Cependant, l'évaluation des propriétés phytopharmaceutiques, antioxydante et antimicrobienne demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquente ou non connue dans la médecine traditionnelle. Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs [7].

Parmi les plantes médicinales la plus répandue dans le monde, nous avons choisi d'étudier les graines de *Nigella sativa* L. Est l'une des plantes médicinales, annelle, herbacée appartenant à la famille des Renonculacées la plus utilisée à travers le monde. Depuis plus de 2000 ans, cette plante a été employée comme remède naturel au Moyen-Orient et en Extrême-Orient, et plus particulièrement chez les musulmans influencés par la parole prophétique :

ثبت في الصحيحين : من حديث ابي سلمة عن ابي هريرة رضى الله عنه ان الرسول الله صلى الله عليه وسلم قال " عليكم بهذه الحبة السوداء فان فيها شفاء من كل داء إلا السام و السام : الموت" رواه البخاري.

« Soignez-vous en utilisant la graine de nigelle, c'est un remède contre tous les maux à l'exception de la mort ... ». Les extraits de ses graines sont largement utilisés dans la médecine traditionnelle, notamment dans le traitement de nombreuses maladies telles que le diabète, la fièvre, la migraine, l'inflammation, les problèmes gastro-intestinales...etc. En plus de ces usages, ces graines sont aussi très employées comme épices additionnées à plusieurs préparations culinaires (pain, pâtes, salades, fromages ...etc.) [8].

Notre travail sera réparti en trois parties :

Une première partie relative à une synthèse bibliographique

Une seconde partie réservée à l'étude expérimentale qui comporte:

- ❖ L'extraction de l'huile végétale par Soxhlet à partir des graines de *Nigella sativa*.
- ❖ Caractérisation physicochimique et organoleptique de l'huile végétale.
- ❖ Détermination de la composition chimique de l'huile végétale de *Nigella sativa* par CG/MS
- ❖ Extraction des flavonoïdes ;
- ❖ Analyse qualitative des composés par CCM ;
- ❖ Dosage des Polyphénols totaux et des flavonoïdes
- ❖ Etude de l'activité antioxydante de l'huile végétale et des extraits flavoniques des graines de *Nigella sativa* d'origine algérienne.

Une troisième partie sera consacrée à la présentation et à la discussion des résultats obtenus.

Synthèse bibliographique

Chapitre I: Présentation de l'espèce Nigella sativa

I-Introduction

Nigella sativa est une des plantes médicinales les plus utilisées à travers le monde. C'est une plante aromatique, annuelle herbacée ; appartenant à la famille des Renonculacées.

La famille des Renunculaceae ou Renonculacées est composée d'environ 1500 à 2000 espèces regroupées en une soixantaine de genres. Elle est cosmopolite mais plus particulièrement présente dans les régions tempérées et froides de l'hémisphère nord [9]. Les Renonculacées sont le type même de la famille par enchaînement ; c'est à dire comportant des espèces d'aspect très variable (herbes, arbrisseaux, arbustes) ; les espèces primitives différant fortement des espèces de type évolué avec de nombreux intermédiaires les reliant entre elles. Le seul véritable caractère commun à tous les genres est l'embryon, toujours de petite taille et entouré d'un albumen charnu [10]. Le genre *Nigella* largement utilisé comme condiment dans les pays producteurs méditerranéens et asiatiques, a suscité une attention particulière en thérapeutique. Avec l'espèce *Nigella sativa* L. Depuis plus de 2000 ans, cette plante est employée comme remède naturel au Moyen-Orient et en Extrême-Orient, et plus particulièrement chez les musulmans influencés par la parole prophétique [11].

II-Présentation de l'espèce *Nigella sativa* L.

Nigella sativa appelé aussi cumin noir, Ses graines sont noires, auxquelles elle doit son nom. Elles sont comestibles. *Nigella sativa* L. a été largement étudiée pour ses activités biologiques et ses propriétés thérapeutiques telles que : diurétique, antihypertenseur, antidiabétique, anticancéreuse, immunomodulatrice, analgésiques, vermifuges, analgésique, anti-inflammatoire, antispasmodique, bronchodilatateur, gastroprotecteur, hépatoprotecteur, la bronchite, l'asthme, les rhumatismes et les affections cutanées. Elle est également utilisée comme tonique du foie, digestif, anti-diarrhéiques, emménagogue, pour augmenter la production de lait chez les mères allaitantes à combattre les infections parasitaires et à soutenir le système immunitaire [9]. Elle nettoie aussi le corps de ses toxines, stimule la régénération cellulaire, renforce le système immunitaire et détruit les bactéries [10]

Les graines de *Nigella sativa* sont utilisées traditionnellement dans l'alimentation. Ces données permettent déjà de les qualifier comme ayant une bonne valeur nutritive. Dans le thé et le café, les graines servent d'aromatisants. Elles entrent dans la composition du pain et elles servent aussi comme agents de conservation. La graine broyée mélangée au miel ou mélangée

avec du yaourt, s'est avérée être efficaces dans les nausées, les pertes d'appétit, dans les œdèmes et les maladies liées au postpartum [12]

II.1. Systématique

La classification botanique du *Nigella sativa* est la suivante : [1, 2, 3]

Règne : *Plantae*

Sous règne : *compophytes*

Supra-Embranchement : *Rhizophytes*

Embranchement : *Spermaphytes*

Sous-Embranchement : *Angiospermes*

Classe : *Dicotylédones*

Sous-classe : *Dialypétales*

Série : *Thalamiflores*

Ordre : *Ranales*

Famille : *Renonculacées*

Tribu : *Helleborées*

Genre : *Nigelle*

Espèce : *Nigella sativa*

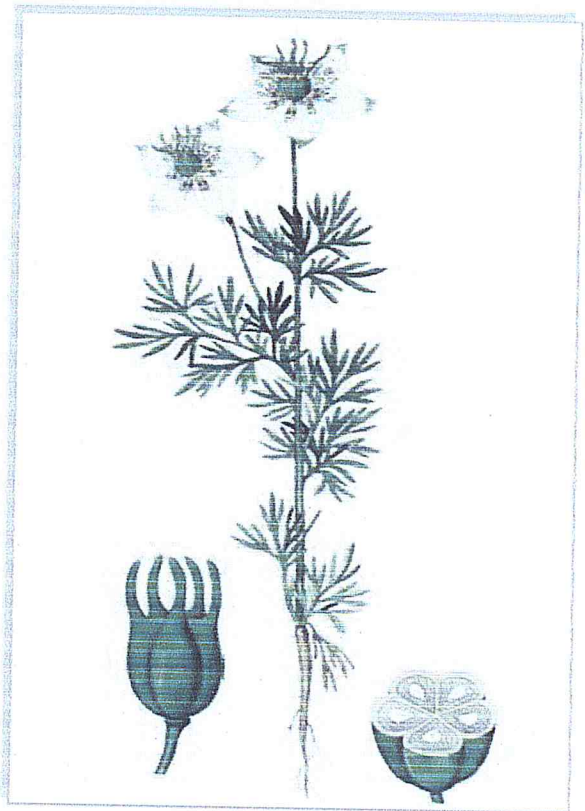


Figure 01 : La plante de *Nigella sativa* [13]

II.2. Noms vernaculaires [11.12.14.15]

Nigella sativa porte différents noms en fonction des pays et des régions ; parmi les appellations relevées :

- **Nom scientifique** : *Nigella sativa*.
- **Français** : Nigelle cultivée ; nielle ; cumin noir ; faux cumin ; poivrete.
- **Anglais**: Nigella, black seed, black cumin.
- **Dans les pays arabes** : al-habba al-saouda, habat al-baraka ; al-karaway al-saouda ;
En Algérie al-sânoudj ; En Tunisie : sinouj
- **En Inde et au Pakistan** : kalonji.

II-3 Description botanique de l'espèce *Nigella sativa*

Nigella sativa est une plante annuelle herbacée atteignant 30 à 60 cm de hauteur [10]. Ses feuilles sont assez petites, de 2 à 2,5cm de diamètre, elles sont divisées en lobes étroits, allongés et souvent un peu élargis à leur sommet. Elles sont multifides ; les feuilles inférieures sont pétiolées et les supérieures sont sessiles [12]. Les fleurs sont petites et blanchâtres. Il s'agit d'une très vieille espèce cultivable de 20 à 30 cm de hauteur, ils sont très riches en nectar et la floraison a lieu du mois d'avril au mois de juin ; produisant des graines noires contenues dans ses gousses [9]. Ses fruits correspondant à l'ensemble des follicules soudés forme la capsule contenant plusieurs graines triangulaires blanchâtres qui, lorsque la capsule s'ouvre à maturité et exposées à l'air, les graines deviennent noires [9]. La plante est hermaphrodite à reproduction autonome dont le fruit est une capsule formée de 3 à 6 carpelles soudés entre eux jusqu'à la base des styles persistants. Chaque capsule contient plusieurs graines, elles sont de couleur mat noires et intérieur blanc, ils sont nombreuses et granuleuses, de 1,5 à 2 mm de longueur et sont disposées sur deux rangs, leur forme est pyramidale, à faces triangulaires sensiblement planes, marquées de rides transversales et finement chagrinées. Les amandes sont blanches et huileuses [10]. Au broyage elles dégagent une odeur fortement aromatique, tenant du poivre et de l'anis et aussi de la noix de muscade [12].

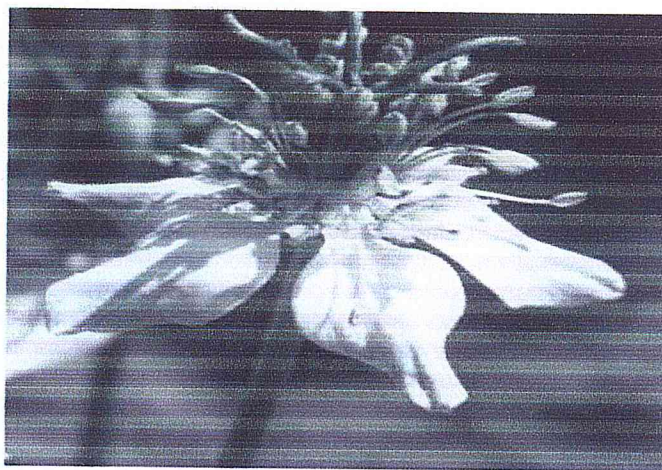


Figure 02 : Fleure de *Nigella sativa* L. [16]

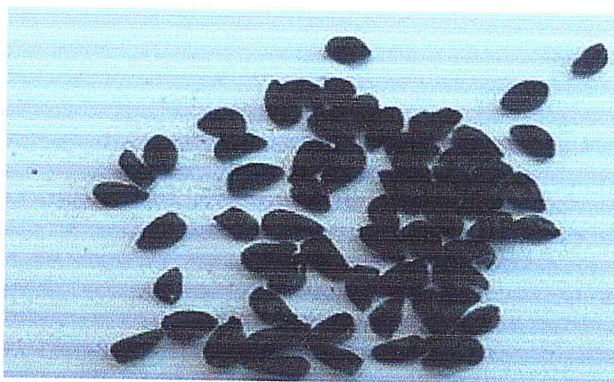


Figure 03 les graines de *Nigella sativa* L. [17]

III. Répartition géographique

Nigella sativa est une herbe originaire du moyen orient, de l'Europe centrale et de l'ouest de l'Asie, elle est maintenant cultivée dans plusieurs régions du monde depuis l'Asie jusqu'à l'Afrique et l'Amérique [18], surtout dans le bassin méditerranéen et en Inde [10]. Elle se développe sur les régions tropicales et semis arides. Les pays producteurs de la nigelle sont principalement la Syrie, l'Égypte, l'Arabie Saoudite, la Turquie, l'Iran, l'Iraq, le Pakistan, l'Inde et les États-Unis [11].

En France, elle peut être exceptionnellement présente dans la région méditerranéenne [11]. La période de floraison de cette espèce est le mois de mai et les graines sont récoltées au mois de juillet [18].

IV. Composition chimique de l'espèce « *Nigella sativa* L. »

Les graines de *Nigella sativa* sont constituées principalement, des huiles végétales (36-38%), de l'huile essentielle (0.4-2.5%), des protéines (16-21%) ; des fibres alimentaires (4.5-6.5%), des glucides(33-34%), des sels minéraux(3.7-7) et des saponines 0,013[1,6]. L'huile végétale est composée principalement des acides gras insaturés, y compris l'acide arachidique et l'acide eicosadiénoïque (3%) [19], l'acide linoléique (50-60%), de l'acide oléique (20%) et l'acide dihomolinoléic (10%). Des acides gras saturés tels que : l'acide palmitique et l'acide stéarique [9] . Les principales composés d'huiles essentielles sont : Le thymoquinone (27,8% - 57,0%), le p-cymène (7,1% - 15,5%), le carvacrol (5,8% -11,6%), le t-anéthole (0,25% E2,3%), de 4-terpinéol (2,0%- 6,6 %), sesquiterpene longifoline (1,0% -8,0%), α -pinène et le thymol, etc.[20,21]. Les graines possèdent aussi des sels minéraux tels que : le Cu, P, Zn et Fe etc. et les vitamines comme les vitamines A, E et k [21,22].

V. Travaux antérieurs déjà réalisés sur l'espèce « *Nigella sativa* »

Plusieurs travaux de recherche ont été réalisés sur cette espèce dont parmi eux nous citons :

V.1. Etude chimique de l'espèce *Nigella sativa* :

En raison de leur large domaine d'usage médicinal, les graines de *Nigella sativa* ont fait l'objet de plusieurs études phytochimiques intensives, dans le but d'identifier ses principes actifs. Ces études ont révélée que ces graines sont très riches en plusieurs constituants tant de métabolites secondaires que primaires, dont la teneur varie selon les conditions géographiques et climatiques, ainsi que les méthodes d'études (extraction et détection)[10].

Cette analyse a été réalisée sur des graines de Nigelle de Turquie en 1993, où les résultats ont montré que la composition chimique des graines de *Nigella sativa* présente une teneur relativement importante en glucides (37,4%), en lipides avec 32% et en protéines avec 20% (tableau 1) [11].

Tableau 01 : Composition chimique des graines de *Nigella sativa*.

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

1/ L'huile végétale : Représente 37,9 à 39,2% du poids de la graine. Elle est constituée principalement de lipides neutres (96,1%-97,2%), des lipides polaires (3%) et des phospholipides (0,32-1,05%).

- M.F.Ramadan et al en (2002) [23] ont réalisé une étude sur l'extraction des phospholipides (PL). L'analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a permis d'identifier sept constituants principaux : la phosphatidyl choline (46% des PL), phosphatidyl éthanolamine (25%), phosphatidyl sérine (12%), phosphatidyl inositol (9,56%), lysophosphatidyl choline (4,23%), phosphatidyl glycérol (1,51%) et lysophosphatidyl éthanolamine (2.7%).
- Une étude complémentaire de M.F.Ramadan et al en (2003) [24] a été aussi réalisée sur les glycolipides de *Nigella sativa* a permis de séparer et d'identifier six composés

dont le plus abondant est le digalactosyldiacyl glycérol avec une teneur de 55,6% des glycolipides totaux.

- Une autre étude réalisée par M.F. Ramadan et al en 2002 [25] sur l'extraction de l'huile végétale des graines de *Nigella sativa* a révélé que le principal acide gras est l'acide linoléique C18: 2n-6, suivie par de l'acide oléique C18: 1n-9. Acide palmitique C16: 0 a été le principal acide gras saturé et détecté dans le niveau appréciable. Une chromatographie sur colonne de silice avec un solvant de polarité croissante a donné 96,1 à 97,2% de lipides neutres (NL) et 3% des lipides polaires. L'analyse par la chromatographie liquide gazeuse avec détecteur à ionisation de flamme (GLC / FID) a montré que la majeure acide gras présent dans toutes les classes de lipides était C18: 2n-6 suivi par C18: 1n-9 et C16: 0 aminés, respectivement.
- D'après S. Cheikh-Rouhou et al en (2007) [26] réalisée l'analyse des acide gras extraits de deux variétés des graines *Nigella sativa* originaire d'Iran et de Tunisie a montré que l'acide palmitique est majoritaire, suivi par l'acide linoléique et l'acide oléique. La présence d'autres acides gras ; myristoleique, palmitoleique, margarique, arachidique, eicosenoique, behénique, lignocérique a été également détectée.
- Une autre étude a été réalisée par S. Cheikh-Rouhou et al en 2008[27], ils ont mis en évidence que l'huile de *Nigella sativa* est riche en stérols (17,41-42,66% de la matière insaponifiable), dont le β -sitostérol est le plus abondant (44-54%), suivi par le stigmastérol (16.57–20.92%), Δ 7-stigmasterol, Δ 7-avenasterol et le cholestérol qui sont également détectés mais à des taux plus faibles.
- H. Khither en 2010 a réalisé l'analyse quantitative et qualitative des huiles fixes de *Nigella sativa* cultivée dans différentes régions. Sa composition en acides gras est fortement influencée par les facteurs de l'environnement (sols, température, climat ...etc). Des travaux effectués sur les huiles fixes de *Nigella sativa* d'origines Iranienne, Tunisienne et Egyptienne montrent une variabilité des taux en différents acides gras (Tableau 2). Cependant, les acides gras insaturés restent majoritairement présents quelque soit l'origine de la plante. Dans ces huiles, les principaux acides gras saturés sont essentiellement l'acide palmitique, l'acide stéarique et l'acide myristique, tandis que les acides gras insaturés majoritaires sont l'acide linoléique et l'acide oléique [21].

Tableau 02: Composition des huiles végétales de *Nigella sativa* tunisienne [25], iranienne [25.28] égyptienne [29].

Acide gras	NS Tunisienne	NS Iranienne	NS Egyptienne
AG saturés	22.70%	17-25.5%	24%
Acide myristique	0.35	0.40 -0.50	09.80
Acide palmitique	17.20	12.50 – 18.40	09.90
Acide stéarique	02.84	03.40 – 03.70	03.30
Autres	02.12	02.80	01
AG insaturés	77.30%	74.8 – 82.5 %	73.50%
Acide oléique	25	23.40 – 23.70	20.1
Acide linoléique	50.31	19.15 – 55.60	49
Autres	01.81	03.20	04.40

- Les huiles fixes de *Nigella sativa* extraits par pression à froid sont majoritairement composées de triglycérides (57,50%) et contiennent une faible fraction de lipides polaires (3,70%), des monoacyl-glycérol et diacyl-glycérol avec des proportions respectives de 4,80% et 5,10%. On y trouve aussi des stérols libres et estérifiés. L'analyse des stérolslibres montre que le β -sitostérol représente le composant majeur suivi par le D5-avenastérol et le D7-avenastérol, alors que le stigmastérol, le campestérol et le lanostérol ont été trouvés à des taux très faibles (tableau 3) [29].

Tableau 03: Taux des lipides de l'huile végétale de *Nigella sativa* extraite par différente Méthodes d'après.

	Extraction par pression à froid (%)	Extraction à chaud par Solvant apolaire (%)
Lipides polaires	03.70	04.80
Monoacyl-glycerol	04.80	05.70
Diacyl-glycerol	05.10	04.10
Stérols libres	03	05
Inconnu	05.40	04.50
Acides gras libres	14.20	08.30
Triacyl-glycerol	57.57	63.20
Stérols esters	02.50	04.40

- D'autres études montrent que les huiles végétales contiendraient 0,17% de thymoquinone et de nombreux acides gras dont la composition varie peu selon l'origine des échantillons. Le tableau 4 présente la composition des échantillons des huiles végétales des graines de *Nigella sativa* selon l'origine de provenance [30].

Tableau 04 : Composition (en pourcentage des huiles fixes) des graines *Nigella sativa* en acides gras selon l'origine de l'échantillon.

Acide gras	Origine de l'échantillon des graines <i>Nigella sativa</i>		
	Éthiopie	Inde	Syrie
Mystique	0.21	0.2	0.22
Palmitique	12.07	13.15	14.64
Stéarique	2.7	2.97	2.6
Oléique	23.46	25.67	24.51
Linoléique	58	54.68	54.13
Arachidique	0.2	0.25	0.2
Linoléique	0.47	0.68	0.69
Eicosadiénoïque	2.87	2.39	3.02
Saturés totaux	15.18	16.57	17.66
Insaturés totaux	84.82	83.43	82.34

2/ L'huile essentielle

Les graines de *Nigella sativa* renferment environ 0,4-2,5% d'huile essentielle.

- D'après M. Burits et al en (2000) [31] ont analysé l'huile essentielle des graines de *Nigella sativa* par GC-MS a permis d'identifier 32 composants, dont la majorité d'entre eux sont des monoterpènes ; la thymoquinone (27,8%-57%), p-cymène (7,07-15,83%), carvacrol (5,8-11,6%), longifolène (1,2-8%), 4-terpinol (1,98-6,59%), et le t-anethol (0,25-4,28%).
- F. Benkaci-Ali et al en (2007) [32] ont fait une étude comparative de l'huile essentielle de *Nigella sativa* cultivée au Sahara algérien (Timimoune et Adrar). Cette huile essentielle est extraite par deux méthodes différentes ; l'hydrodistillation et la distillation assistée par micro-onde et analysée par CPG et GC-MS. De nombreux composés ont été identifiés et caractérisés dont le p-cymène (28.1-32.0%) représente toujours le composé le plus abondant suivi de la thymoquinone (10.8-24.6%).
- J. Salas et al en 2009 [33] ont réalisé l'analyse de l'huile essentielle de *Nigella sativa* par GC-MS. Le tableau 5 présente les différents composés identifiés dont les principaux composants sont : thymoquinone (42,4%), p-cymène (14,1%), le carvacrol (10,3%), longifolène (6,1%) et de 4-terpinéol (5,1%).

Tableau 05 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Nigella sativa* identifiée par GC-MS.

N°	Composant	Pourcentage
1	Camphène	0.06
2	t-Anéthole	2.3
3	β -pinène	0.03
4	α -pinène	0.04
5	γ -Terpinène	0.4
6	β -Myrcène	0.05
7	α -Terpinène	0.01
8	Limonène	1.7
9	1.8-cinéole	0.16
10	Sabinène	1.3
11	ρ -Cymène	14.1
12	α -Terpinolène	0.01
13	ρ -Cymène-8-ol	0.42
14	Carvcrol	10.3
15	Longipinène	0.4
16	Camphre	1.5
17	Linaloolcis	0.21
18	Sabinenehydrate	0.2
19	Longifolène	6.1
20	Bornylacétate	0.53
21	Thymol	1.2
22	4-Terpineol	5.1
23	Bornéol	0.14
24	Carvone	0.08
25	Thymoquinone	42.5
26	2-Tridecanone	0.8
27	Thujone	1.5
28	ρ -Anisaldehyde	0.1
29	2-Undecanone	0.21
30	pic inconnu	3.1
	global	96.6

- B. Nickavara et al en (2003) [28] ont réalisé l'analyse sur les graines de *Nigella sativa* d'origine Iranienne. 32 composés constituants (86,7%) de l'huile essentielle, ont été identifiés. L'huile est composée de : phényle de propanoid (46,1%), 9 composés hydrocarbures monoterpénoïde (26,9%), 4 composés monoterpénoïde cétones (6,0%), 8 composés hydrocarbures nonterpenoid (4,0%), 3 alcools monoterpénoïdes (2,7%), 2

composés hydrocarbures sesquiterpénoïdes (1,0%). Ainsi, l'huile est caractérisée par une grande quantité de phényle propanoïdes. La composition chimique de l'huile essentielle est présentée dans le tableau 6.

Tableau 06 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Nigella sativa L.*

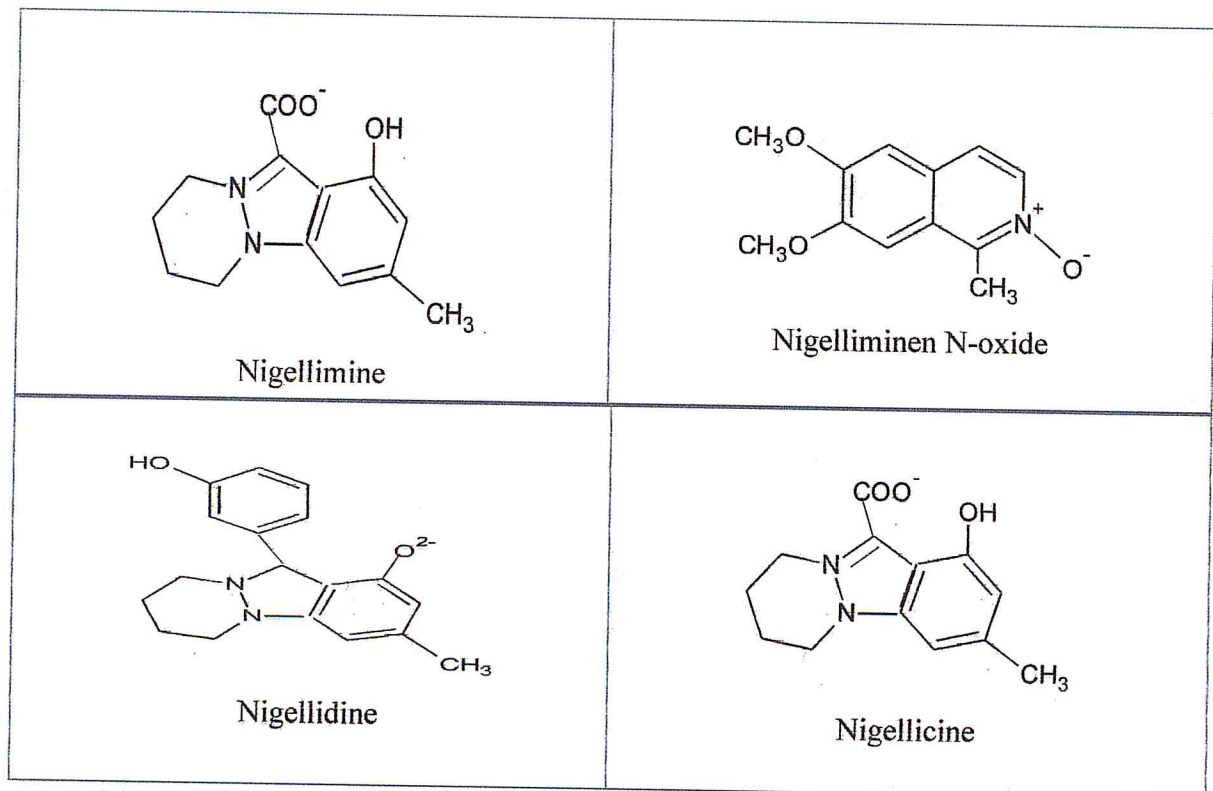
Composés	Pourcentage
<i>Non terpenoides hydrocarbones</i>	04
n-Nonane	1.7
3-Méthyl Nonane	0.3
1,3,5-Triméthylbenzène	0.5
n-Decane	0.4
1-Méthyl-3-propyl benzène	0.5
1-Méthyl-2,3-diméthyl benzène	0.2
n-Tétradécane	0.2
n-Hexadécane	0.2
<i>Nonterpenoid hydrocarbones</i>	26.9
α -Thuyène	2.4
α -pinène	1.2
Sabinène	1.4
β - Pinène	1.3
Myrcène	0.4
α -Phellandrène	0.6
p-Cyrène	14.8
Limonène	4.3
γ -Terpinene	0.5
<i>Monoterpénoides ketones</i>	06
Fenchone	1.1
Dihydrocarvone	0.3
Carvone	4.0
Thymoquinone	0.6
<i>Monoterpenoides alcools</i>	2.70
Terpinen-4-ol	0.7
p-Cymene-8-ol	0.4
Carvacrol	1.6
<i>Sesquiterpénoides hydrocarbones</i>	01
α -Longpinène	0.3
Longifolène	0.7
<i>Phenyl propanoides composants</i>	46.10
Estragole	1.9
Anisaldéhyde	1.7
trans-anéthol	38.3
Myristicine	1.4
Dill apiole	1.8
Apiole	01
Total des composés	86.7

• 3/ Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances présentant un caractère alcalin, contenant de l'azote, le plus souvent inclus dans un hétérocycle. Les alcaloïdes ont, pour la plupart, des actions physiologiques et thérapeutiques à faibles doses. Ils deviennent cependant très toxiques à fortes doses [34].

Les plus importants alcaloïdes de *Nigella sativa*, ont été isolés à partir des graines sont :

- Nigellicine, à noyau indazole
- Nigellimine, une isoquinoléine
- Nigellimine N-oxyde, dérivé N-oxyde de la nigellimine
- Nigellidine, également un indazole



• **Figure 04** : Structure chimique des principaux alcaloïdes de *Nigella sativa*

4/ Les triterpènes saponines

Les triterpènes sont des hétérosides de stérols ou de saponosides. Ce sont des composés très répandus dans le règne végétal, solubles dans l'eau. Il libère par hydrolyse un ou plusieurs oses et une génine (sapogénine). La première saponine isolée par Greenisch en 1882 à partir des graines de *Nigella sativa* est la mélanthine [11].

- Taskin et al en 2005 [35] ont permis d'isoler à partir de l'extrait méthanolique, trois autres saponosides apparentées à l' α -hederine, avec l'élucidation de leurs structures par des méthodes chimiques et spectrales ;

1/ 3-O- β -D-xyl (1-3)- α -L-rha- (1-2)- α -L-ara-28-O- α -L-rha(1-4)- β -D-glu(1-6) - β -D-glu-hédéragénine,

2/ 3-O- α -L-rha-(1-2) α -L-ara-28-O- α -L-rha(1-4)- β -D-glu(1-6)- β -D-glu-hédéragénine,

3/ 3-O- β -D-xyl(1-3)- α -L-rha-(1-2)- α -L-ara-hédéragénine.

- D'après Ansari et al en (1975) [36] : une étude a été réalisée sur un extrait éthanolique des graines de *N. sativa* où ils ont pu isoler d'autres saponosides dont le 3-O-[β -D-xylopyranosyl-(1-3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1-2)- α -L-arabinopyranosyl]-2.
- Une étude a été réalisée d'après Kumara et al en (2001) [37] ont pu isoler et de caractériser un saponoside à partir des graines de *Nigella sativa*. Le saponoside identifié est l' α -hederine (figure 06), une saponine triterpénique monodesmosique caractérisée ainsi :
3-O- [α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2) - α -L-arabinopyranosyl] -hédéragénine.

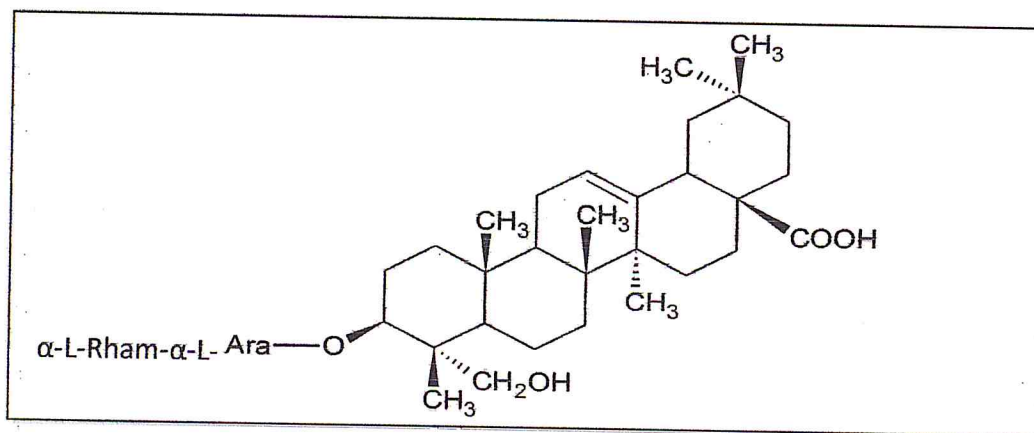


Figure 05 : Le saponoside l' α -hederine

5/ Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés aromatiques dont la biosynthèse constitue l'un des processus fondamentaux de la phytochimie. Ils font partie de ce que l'on appelle les composés phénoliques. Les flavonoïdes sont des substances généralement colorées très

répandues chez les végétaux. Les Renonculacées sont un groupe riche en flavonols et en flavones.

Merfort, I et al en (1997) [38], ont isolés trois nouveaux flavonoïdes triglycosylés à partir des graines de *Nigella sativa* et leurs structures ont été déterminées (figure 07).

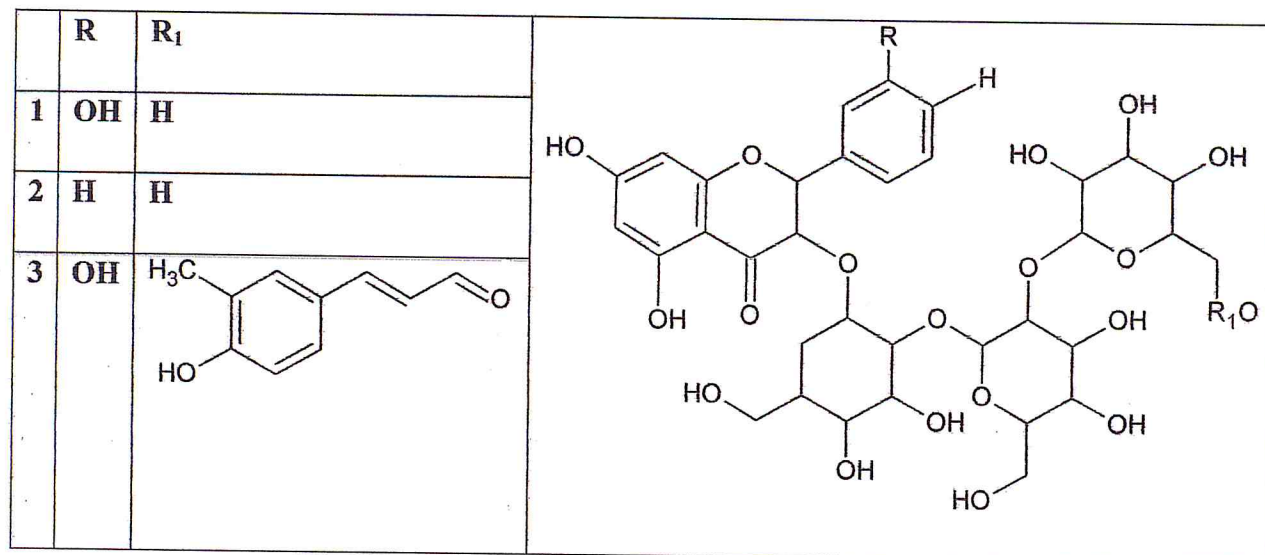


Figure 06 : Trois flavonoïdes isolés des graines de *N. sativa*

1. quercétine 3-glycosyl (1→2) galactosyl (1→2) glucoside
 2. kœmpférol 3-glycosyl (1→2) galactosyl (1→2) glucoside
 3. quercétine 3-(6-feruloglucosyl) (1→2) galactosyl (1→2) glucoside.
- D'après B. Bourgo et al en (2008) [39], Quatorze composés phénoliques ont été isolés à partir d'un extrait méthanolique de *N. sativa* d'origine tunisienne. Les différents composés identifiés sont : l'acide gallique, l'acide parahydroxybenzoïque, l'acide chlorogénique, l'acide vanillique, l'acide para-coumarique, l'acide férulique, l'acide trans-2-hydroxycinnamique, l'acide trans-hydroxycinnamique, l'épicatéchine, la catéchine, la quercétine, l'apigénine, l'amentoflavone et la flavone.
 - En 2004 A. H. Gilani [40] et en 2006 K. Ghedira [41], ont pu isolés et identifiés 04 composés polyphénoliques de *Nigella Sativa* par HPLC et RMN. les plus actifs pharmacologiquement (figure 08).

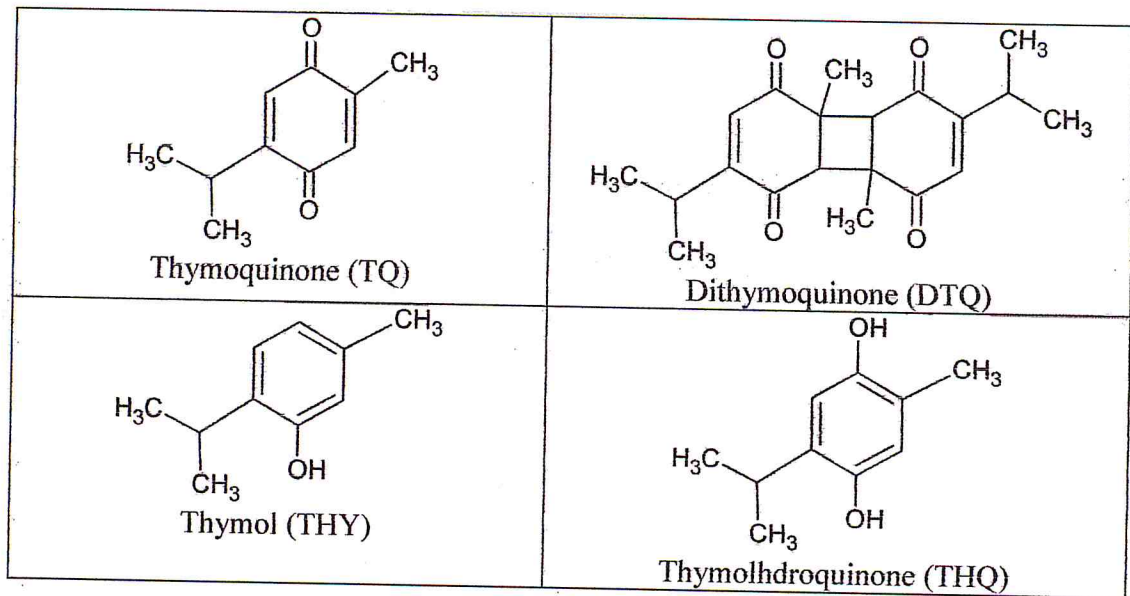


Figure 07: Structure des polyphénols de *Nigella sativa*

6/ Les vitamines et sels minéraux

La composition en vitamines a été déterminée et révèle la présence des vitamines B₁, B₂, B₆, PP et de l'acide folique.

- Nergiz,C et al en (1993) [30] ont pu identifier toutes les classes des tocophérols totaux constituent 0,05% de l'huile de *Nigella sativa*, ils sont constitués majoritairement de l' α -tocophérol (48%) et du γ -tocophérol (28%). Ces mêmes chercheurs ont pu également identifier d'autres vitamines liposolubles; la β -carotène (0,05%) et la vitamine K (0,1%). Des travaux sur la composition minérale de la graine de *Nigella sativa* ont rapporté que la teneur en potassium est importante (1,18 % de poids total de la graine), le calcium, le fer, le sodium représentent 0,188 ; 0,0575 et 0,0853 % respectivement . La teneur des graines en sélénium a été également déterminée, elle représente 0,27 à 0,54 mg/kg de graines [42].
- D'après I. Al-Saleh et al en (2006) [43] ont affirmé après analyse par HPLC que les teneurs en α et γ -tocophérols sont relativement élevées: de 5, 65 à 11,39 et de 2, 26 à 6,95 mg/kg respectivement alors que celle de all-trans-rétinol est très faible de 0 à 0,54 mg /kg des graines.

Tableau 07 : composition minérale des graines de *Nigella sativa*.

Compostion	Teneur en mg/100g
Potasssium	527.70 ± 47.70
Phosphore	526.50 ± 30.16
Sodium	49.60 ± 6.13
Fer	10.50 ± 1.56
Zinc	6.04 ± 0.38
Calcium	185.90 ± 18.27
Cuivre	1.84 ± 0.34

Les graines de Nigelle présentent une teneur intéressante en fer, zinc et phosphore. Il est dommage que la teneur en magnésium n'ait pas été évaluée. Une autre étude confirme l'absence de métaux lourds (cadmium, plomb et arsenic).

V.2. D'autres travaux déjà réalisés sur les graines de l'espèce « *Nigella sativa* »

- 1) S. Gharby et al en (2013) [44] ont étudié la composition chimique de l'huile végétale des graines de Nigelle originaire de Maroc. Cette huile a été extraite par solvants ou à froid. Le rendement en huile était de l'ordre de 37% dans le cas de l'extraction par solvant et 27% pour le procédé expression à froid, respectivement. L'analyse de la composition chimique a montré que l'huile de *Nigella sativa* était similaire à celle d'autres pays méditerranéens.
- 2) M. Kiralan et al en (2014) [45] ont étudié les propriétés physico-chimiques et la stabilité d'huile de *Nigella sativa* isolée en utilisant différentes techniques d'extraction : expression à froid et extraction par Soxhlet assisté par micro-ondes. L'analyse d'huile a permis de déterminer la composition des acides gras et des composés bioactifs (stérols, tocophérols, chlorophylle, des caroténoïdes et des composés phénoliques).
- 3) H. Jrah Harzallah et al en (2011) [46] ont fait l'étude sur la composition chimique, le pouvoir antimicrobien contre les bactéries cariogènes et l'activité cytotoxique de l'huile essentielle de *Nigella sativa* originaire de Tunisie. Quarante-quatre composés ont été identifiés dans l'huile essentielle où le p-cymène était le composé majoritaire (49,48%), tandis que thymoquinone ne représentaient que 0,79%.

VI. USAGES

VI.1. Usages culinaires

Les graines de *Nigella sativa* a une forte saveur, piquante et poivrée; ils sont le utilisée en cuisine [12]. Dans la cuisine Arabe, ils entre dans la composition des épice « *ras el hanout* », une mélange de 24 à 27 épices [9] et utilisée aussi pour saupoudrer le pain traditionnel et les pâtisseries, les plats sucrés, les fromages, les sauces et les soupes pour les rendre plus appétissants. Ils sont pulvérisées aromatisent le café à raison de 6 cuillères à café pour une cuillère de nigelle. Et en France sont utilises comme le poivre; Elles sont également utilisées en accompagnement des graines de sésame dans la cuisine traditionnelle d'Asie, et sont ajoutées à différents plats selon les envies [9].

VI.2. Usages en médecine traditionnelle

La nigelle sativa prend une place importante parmi les plantes médicinales les plus utilisées et ce, depuis plus que 2000 ans. Elle est très réputée dans le monde musulman. Rapportée dans deux Sahîhs et dans la médecine prophétique de Ibn Qayyim al-Jawziyya, une communication orale du prophète de l'islam aurait indiqué à propos de la nigelle : « Soignez-vous en utilisant la graine noire, car elle contient un remède pour toutes les maladies à l'exception de celle qui est toxique, donc équivaut la mort » [47].

- ❖ En médecine arabe : Les graines sont utilisées dans le traitement de l'hypertension artérielle et du diabète.
- ❖ En Algérie : Les graines grillées sont mélangées à du beurre et administrées pour traiter la toux ou à du miel en cas de colique.
- ❖ Au Koweït : On les utilise traditionnellement pour contrôler l'épistaxis (saignements de nez).
- ❖ En Arabie Saoudite, l'huile est utilisée en usage externe en cas de raideur et de douleurs articulaires, ainsi qu'en cas d'asthme et d'eczéma.
- ❖ En Égypte, elle est utilisée contre l'asthme. En usage externe sous forme de pommade, les graines sont utilisées dans le traitement d'abcès, d'hémorroïdes, d'inflammation des testicules et de pédiculose.

- ❖ En Turquie, l'huile de graine est employée par voie orale pour ses vertus carminatives, bronchodilatatrices, expectorantes, antihypertensives, diurétiques, diaphorétiques, stomachiques et pour lutter contre l'indigestion ; en friction elle est préconisée contre les spasmes musculaires, la sciatique et les rhumatismes.
- ❖ En médecine *Unani*, la graine de nigelle est considérée comme abortive et diurétique, elle est utilisée pour les ascites, la toux, la douleur oculaire, l'ictère, la paralysie, les hémorroïdes et la fièvre tierce.
- ❖ En Indonésie, les graines sont ajoutées à des médicaments astringents pour lutter contre les désordres intestinaux.
- ❖ En Malaisie, des cataplasmes de graines sont utilisés pour les maux de tête, les abcès, les ulcères nasaux, l'orchite et le rhumatisme. Les femmes Arabes utilisent la graine de *N. sativa* comme galactogène.
- ❖ Au Pakistan : Les graines de Nigelle entreraient dans le traitement des congestions de poitrine, des dysménorrhées, des infections mycosiques et bactériennes, des paralysies et hémiplésies [48].

Chapitre II: Les huiles végétales

II.1. Introduction

En général, les huiles végétales proviennent de la substance dure et ligneuse des graines ou du noyau et se trouvent enfermées dans les cellules oléifères sous forme de petites gouttes. On les retrouve dans l'enveloppe charnue du fruit. Elles sont présentes dans plusieurs plantes notamment les fruits du palmier et de l'olivier, du coprah, de l'arachide, des fleurs de tournesol ou de colza ou encore du coton ou du soja. Elles sont utilisées dans différents domaines de l'industrie tels que les secteurs agro-alimentaire, cosmétique, pharmaceutique ou chimique. [49]

Les huiles végétales comme les huiles d'origine animale sont constituées de 98% de triglycérides. Ce sont des triesters d'acides gras et de glycérol. Néanmoins, on observe des constituants mineurs. Il s'agit entre autres, d'acides gras libres, de phosphatides, de stérides et de cérides ou de triglycérides partiels. Une huile végétale est définie par les différents acides gras qui la composent en proportions variées [49 ,50].

II.2. Composition des huiles végétales

Le mot « huile » se rapporte aux triglycérides qui se trouvent dans leur état liquide à température ambiante. La composition dépend de la nature de la plante, de ses conditions de culture, du sol et de la saison et les paramètres qui différencient les huiles et affectent leurs propriétés physiques et chimiques sont le nombre de carbones qui composent les acides gras, le degré d'insaturation et enfin, la stéréochimie des doubles liaisons. [50]

Les huiles végétales sont composées essentiellement de triglycérides et chaque triglycéride est composé de trois acides gras rattachés à une molécule de glycérol. Les trois acides gras peuvent être soit identiques (triglycérides homogènes), soit différents (triglycérides hétérogènes). Les acides gras sont des molécules organiques composées de chaînes carbonées allant de 12 à 24 carbones et la fonction carboxylique est portée par le premier carbone. Les acides gras qui entrent dans la composition des huiles végétales possèdent généralement un nombre pair d'atomes de carbones à cause de la biosynthèse (ou de biodégradation) qui se fait par addition (ou par suppression) de deux carbones à la fois. Ils sont caractérisés par le nombre de doubles liaisons présentes sur la chaîne carbonée et par leur point de fusion [51].

Les corps gras d'origine végétale sont essentiellement des glycérides (98-99 %). Une fraction quantitativement mineure, appelée fraction insaponifiable, est également présente dans ces corps gras. D'autres composés n'appartenant pas à ces deux catégories peuvent y être

présents dans de faibles proportions : les phospholipides, les cérides, les chlorophylles et les produits d'altération, issus de la dégradation des triglycérides durant le stockage.

II.2.1. Les glycérides

Les glycérides sont des esters formés à partir d'acides gras (C_{12} à C_{22}) et de glycérol. Les graisses et les huiles ne sont pas des glycérides simples. Elles contiennent un certain nombre d'acides gras différents ou non, distribués plus ou moins au hasard parmi les différentes molécules de glycérides. Ce qui leur confère des propriétés physiques, une réactivité chimique et un comportement physiologique bien spécifiques [52].

La fraction glycéridique des corps gras d'origine végétale renferme en majeure partie des triglycérides (les acides gras estérifiant le glycérol pouvant être de diverses natures : chaîne hydrocarbonée (R), plus ou moins longue, plus ou moins insaturée), mais des mono et diglycérides, ainsi que des acides gras, y sont présents en faibles quantités.

Les phospholipides (phosphatides), présents dans les corps gras végétaux bruts (jusqu'à 2% de certaines huiles), sont essentiellement des phosphoglycérides (c'est à dire des dérivés du phosphoryl 3 glycérol), des sphingolipides (dérivés de la phytosphingosine) et des phospholipides comportant en outre des motifs glucidiques (glucolipides).

Les cérides sont des esters d'acides gras et de mono (éventuellement di) alcools de masse moléculaire suffisamment élevée pour que ces alcools soient insolubles dans l'eau. Aussi, parmi eux, on compte : les cires naturelles (esters d'acides gras et mono alcools aliphatiques), les stérides (esters de stérols, de méthyl-stérols ou d'alcools triterpéniques), les caroténocérides (esters d'acides gras et d'hydroxycaroténoïdes ou xantophylles) [52].

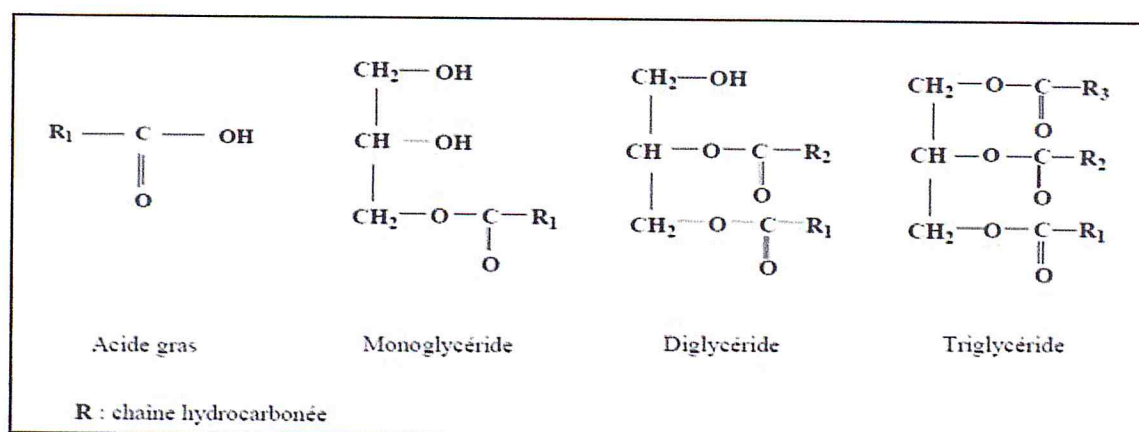


Figure 08 : Quelques constituants de la fraction glycéridique [53].

II.2.2. La fraction insaponifiable

Elle représente 0,2 à 2% d'un lipide non raffiné. Ses constituants chimiques sont extrêmement variés en nature et en proportions. Les principaux sont des hydrocarbures divers, des composés terpéniques (alcools triterpéniques, 4-méthylstéroïdes, stéroïdes,...), des alcools gras, des vitamines liposolubles (vitamines A, D, E (tocophérols et tocotriénols)) et des constituants extrêmement divers [54].

II.2.3. Les acides gras

Les acides gras, molécules peu abondantes sous forme libre dans les matières grasses fraîches, sont des acides carboxyliques à chaîne aliphatique hydrophobe, saturés ou non saturés selon qu'ils ne contiennent pas ou contiennent des doubles liaisons (figure 09).

Ils sont notés $n : m$, où n représente le nombre d'atomes de carbone et m est le nombre de doubles liaisons. Les acides gras diffèrent donc entre eux non seulement par la longueur de la chaîne carbonée, mais aussi par le nombre, la position et la structure spatiale (*cis*, *trans*) des doubles liaisons (figure 10).

La longueur de la chaîne carbonée permet une classification des acides gras en 4 catégories : les acides gras volatils, avec 2, 3 ou 4 atomes de carbone, les acides gras à chaîne courte qui possèdent entre 6 et 10 atomes de carbone, les acides gras à chaîne moyenne, avec 12 à 14 atomes de carbone et les acides gras à chaîne longue, avec 16 ou plus de 16 atomes de carbone[55].

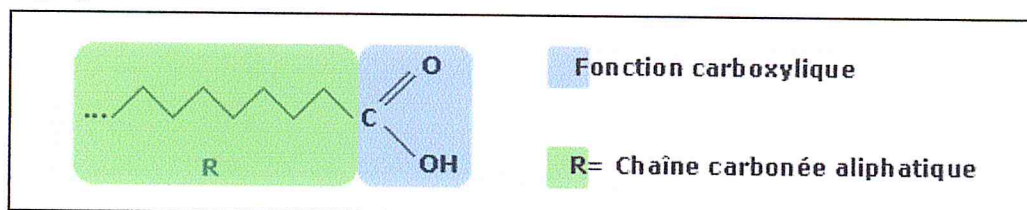


Figure 09: l'acide gras

Acide oléique $C_{18:1}$: $CH_3 - (CH_2)_7 - CH=CH - (CH_2)_7 - COOH$

Acide linoléique $C_{18:3}$: $CH_3 - CH_2 - CH=CH - CH_2 - CH=CH - CH_2 - CH=CH - (CH_2)_7 - COOH$

Acide palmitique : $CH_3 - (CH_2)_5 - CH=CH - (CH_2)_7 - COOH$

Figure 10 : Quelques exemples d'acides gras insaturés (doubles liaisons *cis*)

II.3. Les méthodes d'extraction des acides gras

L'extraction est une opération ancienne utilisée pour retirer des plantes et de certains organes d'animaux, des produits alimentaires, pharmaceutiques ou odoriférants, sous formes

de breuvages, drogues ou parfums. Les opérations d'extraction solide-liquide regroupent plusieurs méthodes différentes consistant toutes à faire interagir le solvant sur le matériau solide afin de dissoudre ses composants solubles.

La percolation : consiste à laisser couler un solvant (généralement très chaud) sur un lit de solides finement divisés. La préparation du café relève de cette opération [56].

La décoction : est l'opération dans laquelle le solide (la matière végétale) est plongé dans le solvant liquide mis en ébullition. Il s'agit d'une opération brutale qui doit être réservée à l'extraction de principes actifs non thermolabiles. Elle est cependant très rapide et parfois indispensable [56].

L'infusion : est une décoction durant laquelle le solvant est chauffé sans être mis en ébullition, suivie du refroidissement du mélange. La préparation du thé est l'exemple type de cette opération [56].

La macération : est une infusion dans un solvant à froid. L'opération bien que généralement longue et le rendement souvent médiocre, elle est la seule méthode utilisable dans le cas de l'extraction d'un ensemble de molécules fragiles. Pour être efficace, une macération, peut durer de 4 à 10 jours environ ; ceci peut présenter quelques inconvénients, en termes de fermentation, ou de contamination bactérienne notamment.

si le solvant utilisé est l'eau. Ces phénomènes peuvent entraîner une dégradation rapide des molécules actives. En vue d'éviter ou de réduire ces inconvénients, la macération peut être opérée dans un récipient couvert, le tout à l'abri de la lumière et, dans certains cas, maintenue dans un réfrigérateur [57].

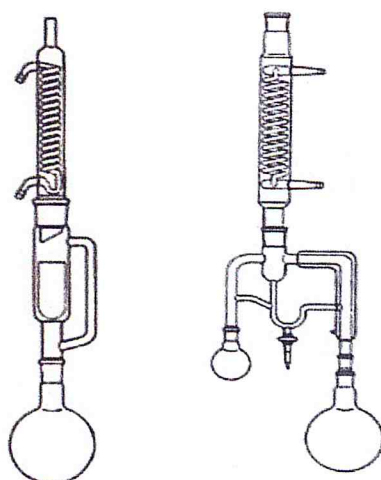
La digestion : est une macération à chaud. Cette opération et la macération sont utilisées particulièrement en pharmacie et en parfumerie. Il s'agit là d'une opération plus rapide que la précédente, ne posant généralement aucun problème de conservation ni de contamination bactérienne [57].

L'éluion : consiste à enlever un soluté fixé à la surface d'un solide par simple contact avec un solvant. Elle est fréquemment utilisée dans les méthodes d'analyse [56].

II.3.1 L'extraction par solvant organique :

L'extraction par solvant organique volatil reste la méthode la plus pratiquée. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol, le méthanol, le dichlorométhane et l'acétone. Le solvant choisi, en plus d'être autorisé devra posséder une certaine stabilité face à la chaleur, la lumière ou l'oxygène, sa température d'ébullition sera de préférence basse afin de faciliter son élimination, et il ne devra pas réagir chimiquement avec l'extrait. Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils mais également bon nombre de composés non volatils tels que les cires, les pigments, les acides gras et bien d'autres substances [58].

L'extraction est réalisée avec un appareil de Soxhlet ou un appareil de Lickens-Nickerson (Figure 11).



Appareil de Soxhlet Appareil Lickens-Nickerson

Figure 11 : montage extraction par solvant

II.3.2. Description de l'extraction par Soxhlet

L'extracteur Soxhlet est représenté sur la figure 10. Le solide est placé dans une cartouche poreuse. Le solvant, contenu dans le ballon, est porté à ébullition, ce qui le transfère dans la partie supérieure. Là, il est condensé grâce à un réfrigérant situé en haut de l'installation et s'accumule autour et à l'intérieur de la cartouche. Lorsque le solvant atteint le niveau supérieur du siphon, le mélange est renvoyé dans le ballon par différence de pression, où il est à nouveau évaporé. Plusieurs cycles d'extraction sont ainsi effectués, la durée de l'opération

est laissée libre à l'utilisateur. On considère avoir alors atteint l'épuisement total en soluté du substrat solide et avoir concentré l'extrait [59,60].

Chapitre III : les flavonoïdes

III.1. Généralités

Les plantes possèdent des métabolites dites « secondaires » par opposition aux métabolites primaires qui sont les protéines, les glucides et les lipides. Les métabolites secondaires sont classés en plusieurs grands groupes : parmi ceux-ci, les composés phénoliques, les terpènes, les stéroïdes et les composés azotés dont les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités biologiques [61].

III.2. Définition des polyphénols

Les polyphénols sont des molécules synthétisées par les végétaux lors du métabolisme secondaire pour se défendre contre les agressions environnementales. Ils sont localisés dans différentes parties des plantes selon l'espèce végétale et le groupe polyphénolique considérés. Ces composés regroupent une multitude de molécules et représentent l'un des groupes les plus importants présents dans le règne végétal [62.63].

Comme définition, nous pouvons dire que les polyphénols sont des composés phénoliques hydrosolubles, de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Dalton, et ayant, outre les propriétés habituelles des phénols, la capacité de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et autres protéines. [64]

Les polyphénols regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique, et un ou plusieurs groupes hydroxyles, en plus d'autres constituants. Ils peuvent aller de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés, de plus de 30000 Dalton, comme les tannins. [65]

III.3. Classification des polyphénols

Les polyphénols possèdent plusieurs groupements phénoliques avec ou sans autres fonctions (alcooliques, carboxyles...). Dans cette famille de molécules, se trouvent de nombreuses substances, qui peuvent se classer selon leur structure en cinq groupes principaux:

III.3.1. Les acides phénols :

Les acides phénols, ou acides phénoliques, ont une fonction acide et plusieurs fonctions phénols. Ils sont incolores et plutôt rares dans la nature. Ils se divisent en deux catégories :

1. Les acides phénols dérivés de l'acide benzoïque sont très communs, aussi bien sous forme libre que combinée à l'état d'esters ou d'hétérosides [66]. Exemple : l'acide gallique qui est un élément principal de la structure des tannins hydrolysables (Figure12).

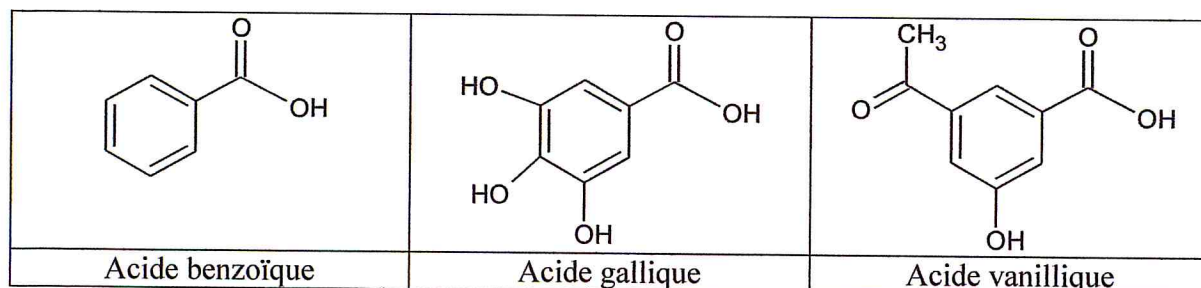


Figure 12 : Exemple de quelques acides phénols de la série benzoïque

2. Les acides phénols dérivés de l'acide cinnamique sont souvent estérifiés. Les plus courants sont l'acide cinnamique, l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide *p*-coumarique et l'acide sinaptique [66.67] ; dont certains sont représentés dans la (figure 13).

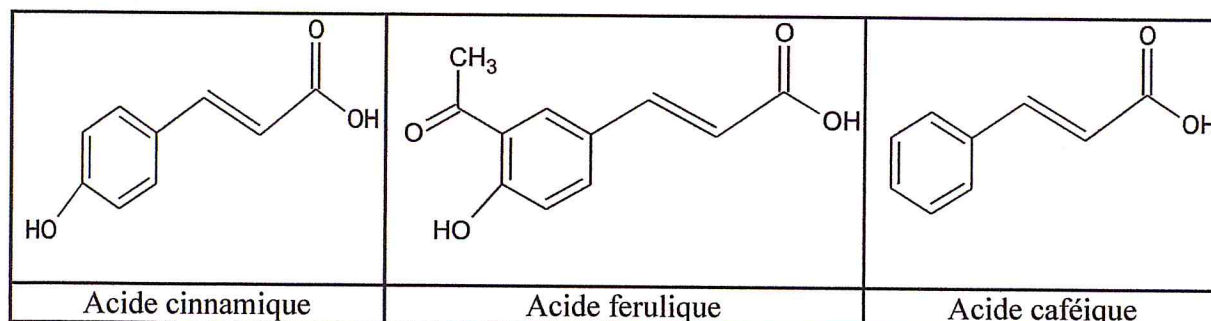


Figure 13 : Exemple de quelques acides phénols de la série cinnamique

III.3.2. Les anthocyanes

Les anthocyanes donnent des couleurs très variées : bleu, rouge, mauve, rose ou rouge. Ces molécules ont, comme les flavonoïdes, un squelette de base en C15 formé de deux cycles A et B, et d'un hétérocycle (cycle C) ; mais leur caractéristique principale est que ce dernier est chargé positivement. Cette charge est due à leur structure de base commune : le cation flavylum ou 2-phenyl-1-benzopyrylium (Figure 14) [68].

Les trois anthocyanes principaux sont :

- La pélagonidine : qui a un OH en 4' et donne une couleur rouge-orange.

- La cyanidine : qui a deux OH en 3', 4' ou en 4', 5'. Elle donne une couleur rouge magenta.
- La delphinidine : qui a trois OH en 3', 4', 5'. Elle donne une couleur mauve.

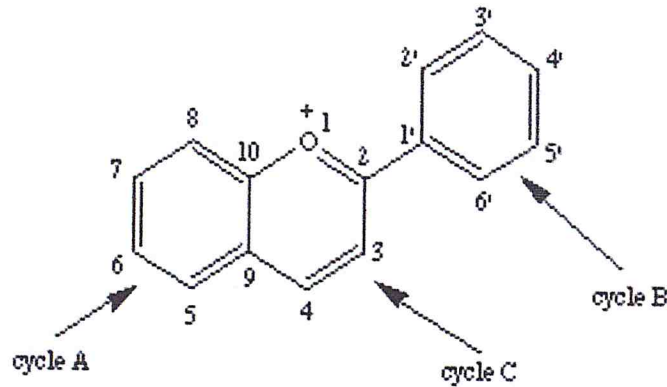


Figure 14 : Structure de cation flavylum ou 2-phényl- 1-benzopyrylium

III.3.3. Les tannins

Les tannins sont des macromolécules qui se divisent selon leur structure en deux groupes principaux :

- Les tannins hydrolysables : sont des esters d'acide gallique qui se lient aux molécules de glucose. Plus précisément, un glucose se lie à plusieurs molécules d'acide gallique [69].
- Les tannins condensés : proanthocyanidines : ce sont des composés phénoliques hétérogènes. Ils se trouvent sous forme d'oligomères ou polymères de flavanes, flavan-3-ols, 5 desoxy-3-flavonols et flavan-3,4-diols.

Les polymères donnent une structure hérissée d'OH phénoliques capable de former des liaisons stables avec les protéines [70].

III.3.4. Les flavonoïdes

Le terme « flavonoïde » est dû à leur couleur jaune (= *flavus* en latin) désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols.

Les flavonoïdes sont des pigments quasi universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs et des fruits. Ils existent le plus souvent à l'état naturel sous forme d'hétérosides : les flavonosides. Ils sont très largement répandus dans le règne végétal (les fruits, les légumes, les graines ou encore les racines des plantes) [71]. Les familles les plus riches en flavonoïdes sont : *Fabacées*, *Myrtacées* et *Polygonacées* [72].

III.3.4.1. Structure chimique

Les flavonoïdes ont un squelette de base formé par deux cycles en C6 (A et B) reliés entre eux par une chaîne en C3 qui peut évoluer en un hétérocycle (cycle C) (Figure 15). Ils donnent des couleurs allant du jaune clair au jaune or. Selon les détails structuraux les flavonoïdes se divisent en 6 groupes : flavones, flavonols, flavonones, isoflavones, chalcones, aurones.

Ces composés existent sous forme libre dite aglycone ou sous forme d'hétérosides, c'est à dire liée à des oses et autres substances [68].

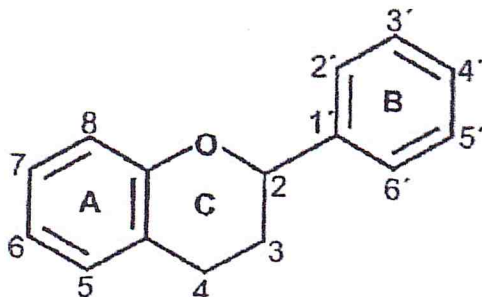


Figure 15 : Structure de base d'un flavonoïde [68].

III.3.4.2. Classification des flavonoïdes

Les principaux groupes de flavonoïdes peuvent être définis et différenciés comme suit :

III.3.4.2.1. Flavones et flavonols : Le cycle A de ces deux types de molécules est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C5 et en C7. Ces hydroxyles peuvent être libres ou estérifiés. D'autre part, le cycle B est substitué en C4' ou di-substitué en C3' et C4' par des groupements OH ou méthoxyles (OCH₃). Les flavonols se distinguent des flavones par un OH en C3 [73].

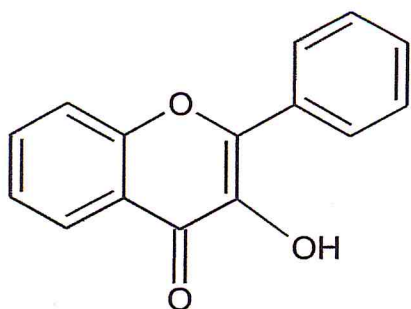


Figure 16: Structure base de Flavonols

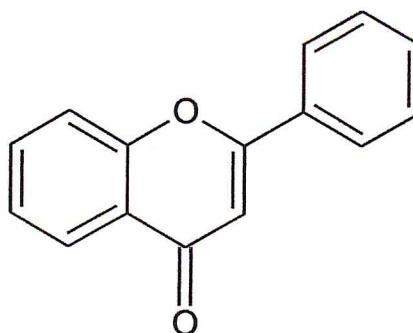


Figure 17: Structure base de Flavones

III.3.4.2.2. Flavanones et dihydroflavonols :

Se caractérisent par l'absence de la double liaison entre le C2 et le C3 et par la présence des centres d'asymétrie. Les variations structurales sont ici de même nature que celles décrites pour les flavones et les flavonols. Les dihydroflavonols se distinguent des flavanones par l'hydroxylation de la position C3 [74].

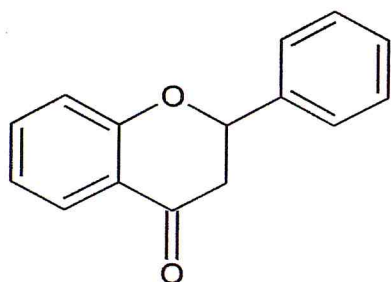


Figure 18: Structure base de Flavanones

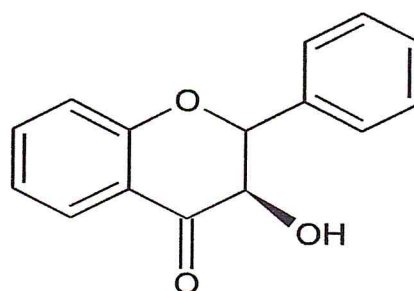


Figure 19: Structure base de dihydroflavonols

III.3.4.2.3 Flavan-3-ols, flavan-3,4-diols et anthocyanidols :

Ces molécules sont toujours hydroxylées en C3 et se caractérisent par l'absence du groupe carboxyle en C4. Cette position peut être libre (flavan-3-ols et anthocyanidols) ou hydroxylée (flavan-3,4-diols).

Les anthocyanosides sont caractérisées par l'engagement de l'OH en C3 dans une liaison hétérosidique. On trouve parmi ces composés, le palargonidol-3,4-O-glucoside et le cyanidol-3-O-rutinoside ou keracyanine.

Les flavan-3-ols et les flavan-3,4-diols sont souvent à l'origine des polymères flavoniques appelés proanthocyanidols ou tannins condensés [75].



Figure 20: Structure base de Flavan-3-ols

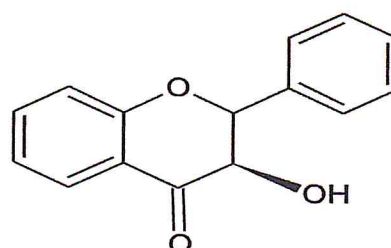


Figure 21: Structure base de flavan-3,4-diols

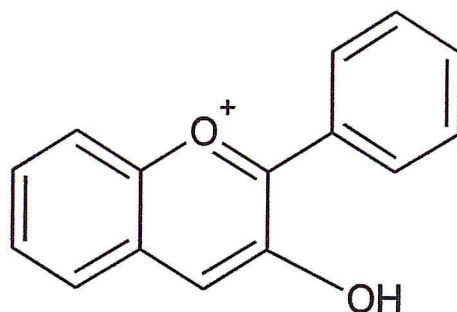


Figure 22: Structure base d'anthocyanidols

III.3.2.4. Chalcones et aurones :

Les chalcones ont leur noyau pyranique central ouvert et sont constituées par deux unités aromatiques reliées par une chaîne tricarbonée, cétonique et insaturée. Le noyau B est assez fréquemment non substitué, alors que les substitutions sur le cycle A sont plus souvent identiques à celles des autres flavonoïdes. Les aurones sont caractérisées par une structure de 2-benzylidène coumarone [74.75].

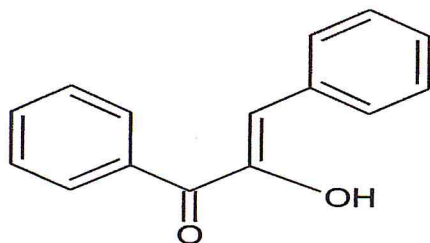


Figure 23 : Structure base de chalcones

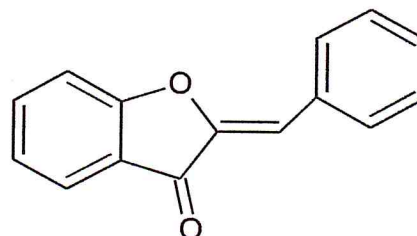


Figure 24 : Structure base d'aurone

III.3.3. Activités biologiques des flavonoïdes

III.3.3.1. Activité antibactérienne

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents a entraîné la sélection de souches multirésistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes, sous forme de métabolites secondaires dont les composés phénoliques, sont toujours utilisés dans l'industrie alimentaire et cosmétique et comme agents antimicrobiens en médecine populaire.

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiens, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire [76].

Le mécanisme des effets antimicrobiens des flavonoïdes est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées, on va citer : [77]

- ❖ Inhibition de la synthèse d'acide nucléique,
- ❖ Inhibition des fonctions de la membrane cytoplasmique,
- ❖ Séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne,
- ❖ Inhibition du métabolisme énergétique microbien.

III.3.3.2. Activité anticancéreuse

Le cancer se présente habituellement comme une tumeur formée d'une masse cellulaire qui est l'aboutissement d'une série de transformation pouvant se dérouler pendant plusieurs années, donc la cancérogénèse est un processus complexe multi-séquentiel menant une cellule de l'état sain à un état précancéreux et finalement à un stade précoce de cancer [78].

Depuis longtemps, on associe le cancer et le type d'alimentation, de nombreux chercheurs ont étudié le rôle des nutriments dans le développement des cancers. Plus récemment des recherches expérimentales suggèrent que les flavonoïdes sont parmi les substances susceptibles de retarder voire d'empêcher l'apparition de certains cancers, tout en réduisant d'une manière spécifique les risques d'en avoir chez les sujets humains [79].

L'activité anticancéreuse des flavonoïdes est assurée par l'intervention de plusieurs mécanismes : [79]

- ❖ piégeage des radicaux libres,
- ❖ Inhibition du métabolisme d'acide arachidonique,
- ❖ Formation d'un complexe inactif avec le carcinogène,
- ❖ Prévention de l'activation des métabolites carcinogènes,
- ❖ Inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses,
- ❖ Arrêt du cycle cellulaire des cellules cancéreuses,
- ❖ Induction de l'apoptose,

- ❖ Inhibition des processus d'angiogénèse [80].

III.3.3.3. Activité anti inflammatoire

Une inflammation par définition est une réaction de défense immunitaire stéréotypée du corps à une agression (infection, brûlure, allergie...) qui se manifeste par une rougeur, un gonflement, une sensation de chaleur, une douleur qui semble pulser [81].

De nombreuses études semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par inhibition de l'activité des enzymes qui peuvent être responsables des inflammations, ils peuvent aussi moduler l'adhésion des monocytes durant l'inflammation athérosclérotique en inhibant l'expression des médiateurs inflammatoires [82] d'autres flavonoïdes sont capables d'inhiber l'histamine [83].

Les flavones et les flavonols sous forme glycosylée ou libre comme la quercétine, kaempférol, myricétine ont une activité inhibitrice de COX (Cyclooxygénase) [84].

Etude expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthodes

Ce chapitre est consacré à :

- L'extraction de l'huile végétale des graines de *Nigella sativa* provenant de deux régions différentes (Algérie et Inde).
- Détermination des propriétés physico-chimiques et analyse par CG/MS de l'huile végétale de *Nigella sativa*.
- Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode de DPPH de l'huile végétale extraite.
- Extraction des flavonoïdes des graines de *Nigella sativa*, le dosage et l'étude analytique de l'extrait flavonique. La raison principale pour le choix de ces substances (flavonoïdes) réside dans le fait que la majorité des effets pharmacologiques des plantes leurs sont attribués.
- Evaluation de l'activité antioxydante du contenu flavonique extrait par la méthode de DPPH et la méthode de réduction de fer (FRAP).

I.1. Matériel

I.1.1. Matière végétale

Notre étude a été réalisée sur les graines de *Nigella sativa* provenant de deux régions différentes. Une espèce algérienne collectée de la région d'Ain Salah, située au centre sud du Sahara Algérienne et au nord de La wilaya de Tamanrasset. Cette espèce a été récoltée en Mai 2014. Les graines ont été séchées à température ambiante, à l'abri de la lumière et dans des endroits bien aérés et conservées dans des sacs. Le deuxième échantillon des graines de nigelle d'origine Indienne a été acheté dans un magasin se trouvant à Blida. L'identification et la systématique de cette espèce ont été confirmées au niveau du laboratoire botanique du jardin d'essais d'El Hamma (Alger).



(1)



(2)

Figure 25 : Les graines *Nigella sativa* (1) Algérienne (2) Indienne.

I.1.2. Réactifs

N°	Réactif	Marques	Grade
1	Ether diéthylique	Sigma Aldrich (Allemagne)	analytique
2	Ethanol 96%	/	/
3	Méthanol	/	/
4	Hexane	/	/
5	Hydroxyde de potassium KOH	Panreac Quimica (Espagne)	/
6	Sulfate de sodium anhydre Na ₂ SO ₄	Sigma Aldrich (Allemagne)	/
7	Acide ascorbique	/	/
8	DPPH	Alfa Aesar (Allemagne)	/
9	Acide formique	Sigma Aldrich (Allemagne)	/
10	Acétate d'éthyle	/	/
11	n-butanol	/	/
12	Acide gallique	/	/
13	acide ascorbique	/	/
14	Rutine	Natural Factors (Canada)	/

I.2. Méthodes**I.2.1 Extraction d'huiles végétales par Soxhlet :**

La méthode d'extraction solide-liquide la plus utilisée dans les laboratoires reste néanmoins la méthode de Soxhlet. La technique consiste à placer un échantillon solide dans une cartouche de cellulose poreuse. Ce réceptacle est ensuite positionné dans un extracteur de Soxhlet muni d'un réfrigérant et d'un ballon de distillation contenant le solvant adapté à l'extraction de l'analyte cible. Son fonctionnement consiste en un lavage itératif de l'échantillon solide par l'intermédiaire de volumes de solvant fraîchement distillés. Les volumes de solvant sont siphonnés régulièrement dans le ballon de distillation créant des cycles de lavage répétés jusqu'à épuisement complet du solide considéré ou jusqu'à obtention d'un pourcentage suffisant d'extrait. Suite à l'évaporation totale du solvant contenu dans le ballon de distillation, l'extrait sec peut être recueilli en vue de son analyse [85].

I.2.2. Appareillage

L'extraction d'huile végétale des graines de *Nigella sativa* par Soxhlet en utilisant le dispositif expérimental schématisé dans la figure 26.



Figure 26 : montage de Soxhlet

Il est composé de :

- Une source de chaleur (chauffe ballon),
- Un ballon de distillation de capacité de 500 ml rempli au 300ml d'hexane surmonté par un Soxhlet contenant la matière végétale,
- Un coude reliant le Soxhlet au réfrigérant,
- Le réfrigérant est alimenté par un système de refroidissement.

I.2.3 Protocole expérimental d'extraction de l'huile végétale

L'extraction a été réalisée à l'aide d'un extracteur de Soxhlet, une masse de 30 g d'échantillon solide (graine *Nigella sativa L.*) broyée et sans broyage, pesée est placée dans un papier filtre bien fermé de manière à éviter les transferts des particules d'échantillon solides dans le ballon de distillation à son tour placé dans la chambre d'extraction d'un appareil de Soxhlet de 200 ml de capacité. L'échantillon solide est ensuite extrait sous reflux durant 4 h. Le papier filtre est alors retiré de la chambre du Soxhlet. L'huile végétale est récupérée après l'évaporation de l'hexane dans un évaporateur rotatif à 67°C, ensuite elle est mise dans un flacon propre, pesée et conservée pour d'autres utilisations.

I.2.4. Calcul du rendement en huile végétale : [86]

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile végétale extraite et la masse de la matière végétale, il est exprimé en pourcentage % et calculé par la formule suivante :

$$R (\%) = [M(HV)/M(MV) \times 100] \quad (\text{Eq 1})$$

R (%) : Rendement en huile végétale (en g) pour 100 g de matière sèche

M(HV) : Masse de l'huile végétale (g)

M(MV) : Masse de la matière végétale sèche utilisée (g)

I.2.5. Propriétés physico-chimiques et organoleptiques de l'huile végétale

La détermination des propriétés organoleptiques (aspect, couleur, odeur) et physico-chimiques suivant la norme A.F.N.O.R. [87] constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'huile végétale de *Nigella sativa L.*

Les modes opératoires sont données en annexe 1.

I.2.6. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS)

I.2.6.1. Préparation des dérivés esters méthyliques d'acides gras

Les triglycérides contenus dans les extraits ont été dérivés sous forme d'esters méthyliques d'acide gras. Les dérivés méthyliques d'acides gras ont été préparés par *trans*-estérification selon la méthode officielle AOCS Ce 2-66 [88]. Ainsi, une catalyse basique est utilisée pour la dérivatisation des acides gras en utilisant une quantité définie (4 ml) de soude méthanolique 0,5M additionnée à une masse spécifique (100 – 250 mg) d'huile brute extraite. Le mélange ainsi préparé est chauffée pendant 10 min dans un ballon de 50 ml surmonté d'un réfrigérant, et un volume de 5 ml de réactif BF₃-méthanolique est ajouté à la solution. Le ballon est alors porté à ébullition pendant 2 min et 5 mL de *n*-heptane sont ajoutés par le réfrigérant. Après 1min, le ballon est retiré du chauffage et un volume de 15 mL de solution saturée en chlorure de sodium est ajouté. Le ballon est ensuite bouché puis agité vigoureusement pendant 15 sec.

Une petite quantité de la phase heptanique surnageante est prélevée puis transférée dans un tube à hémolyse contenant une pointe de spatule de sulfate de sodium anhydre. Les échantillons sont ensuite filtrés sur filtre en cellulose régénérée 0,2 µm avant d'être injectés directement en chromatographie gazeuse couplée à une détection par spectrométrie de masse. Après dérivatisation, les analyses sont réalisées trois fois au minimum.

Conditions opératoires:

L'huile a été analysée par CG/MS en utilisant un chromatographe HP (Agilent technologies) 6800 plus couplé à un spectromètre de masse HP (Agilent technologies) MSD 5973.

Injecteur

Température : 260°C

Mode d'injection : Split 20 :1

Volume injecté : 0.2 µl

Colonne

Type : hp-5MS

Dimensions : long 30 m * D int 0.25 mm * épaisseur film 0.25 µm

Température du four :70°C pendant 2 min, 10°C/min jusqu'à 220°C, isotherme pendant 20 min, 5°C/min jusqu'à 280°C, isotherme pendant 3 min

Gaz vecteur : Hélium pure

Débit GV : 0,5 ml/min

Détecteur de masse : Mode d'analyse : Scan (de 34 à 550)

Température de l'interface : 280 °c

Type d'ionisation : Impact électronique

Intensité du filament : 70 év

Type de l'analyseur de masse : Quadripôle

Température du quadripôle : 150 °c

Température de la source : 230 °c

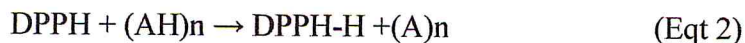
I.2.7. Évaluation de l'activité antioxydante de l'huile végétale

L'activité antioxydante a été déterminée par la méthode du test au DPPH.

I.2.7.1.Méthode de piégeage de radical libre DPPH**I.2.7.1.1. Principe :**

Le DPPH est un radical stable ; cette stabilité est due à la délocalisation des électrons libres au sein de la molécule. La présence de ces radicaux DPPH donne lieu à une coloration violette foncée de la solution qui absorbe aux environs de 517 nm. La réduction des radicaux DPPH par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution [95].

On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation :



Où (AH)_n représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en Diphényle picryl hydrazine (jaune). Ceci permet de suivre la cinétique de décoloration à 515 nm.

I.2.7.1.2. Mode opératoire :

On introduit 1 ml de chaque solution méthanoïque des extraits à différentes concentrations ou le standard (acide ascorbique) sont ajoutés à 1 ml de la solution méthanoïque du DPPH (0,0025g/l). En parallèle, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 1 ml de méthanol avec 1 ml de la solution méthanoïque de DPPH [96].

La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 515nm après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante.

Les résultats obtenus pour chaque extrait testé sont comparés à ceux obtenus pour l'acide ascorbique pris comme antioxydant standard. L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'activité anti radicalaire} = [(\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}) / \text{Abs contrôle}] \times 100 \quad (\text{Eq 3})$$

I.2.7.1.3. Calcul des IC50 :

IC50 ou concentration inhibitrice de 50 % (aussi appelée EC50 pour Efficient concentration 50), est la concentration de l'échantillon testée nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH. Les IC50 sont calculées graphiquement par la méthode de régression linéaire des graphes tracés, pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées.

I.2.8. Extraction des flavonoïdes

Nous avons réalisé l'extraction des flavonoïdes de *Nigella sativa* à l'échelle laboratoire par macération dans un mélange de solvant organique /aqueux.

I.2.8.1. Protocole expérimental

I.2.8.1.1. Préparation de l'extrait brut:

Les flavonoïdes sont extraits du matériel végétal par macération dans un mélange hydroalcoolique : éthanol/eau (50/50 : V/V) à température ambiante et à l'obscurité, cette opération est renouvelée trois fois toute les 24h. Le rapport solvant / matériel végétal utilisé

était de 10/1 (ml / g). L'extrait hydro alcoolique est récupéré après filtration. Ensuite le mélange éthanol/eau est éliminé du filtrat par évaporation permettant d'obtenir l'extrait brut de *Nigella sativa*.

L'extrait brut est repris dans de 100 ml de l'eau distillée bouillante solubilisant quantitativement les flavonoïdes, ensuite il est laissé décanter à température ambiante pendant 24 heures. La décantation est nécessaire pour éliminer les boues, les graisses et les résines risquant de gêner la suite des opérations. Un volume 50 ml de cet extrait a été soumis à une évaporation jusqu'à l'élimination de l'eau puis conservé jusqu'à usage. Le volume restant sera fractionné ultérieurement [89].

I.2.8.1.2. Fractionnement de l'extrait brut :

Dans des ampoules à décanter, l'extrait brut est épuisé successivement par 3 solvants (éther diéthylique ; l'acétate d'éthyle et le n- butanol) L'extrait brut est initialement mélangé avec 20 ml d'éther diéthylique le mélange est laissé décanter pendant 30 min ; la phase organique supérieure est récupérée. L'extraction est refaite deux fois, l'éther diéthylique est par la suite évaporé à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif puis pesées et reprises par 5 ml du méthanol, et conservés jusqu'à utilisation. L'extrait résultant est considéré comme étant la fraction d'éther diéthylique. La phase aqueuse résiduelle est soumise à une autre extraction liquide-liquide par l'acétate d'éthyle et le n-butanol, en suivant les mêmes étapes que la première extraction.

La série d'extraction permet d'obtenir quatre fractions ; la fraction d'éther diéthylique (EEt), la fraction d'acétate d'éthyle (EAc), la fraction du n-butanol (En-BuOH), et la fraction aqueuse (EAq) résiduelle. Le schéma suivant (figure 27) présente les différentes étapes de l'extraction des flavonoïdes.

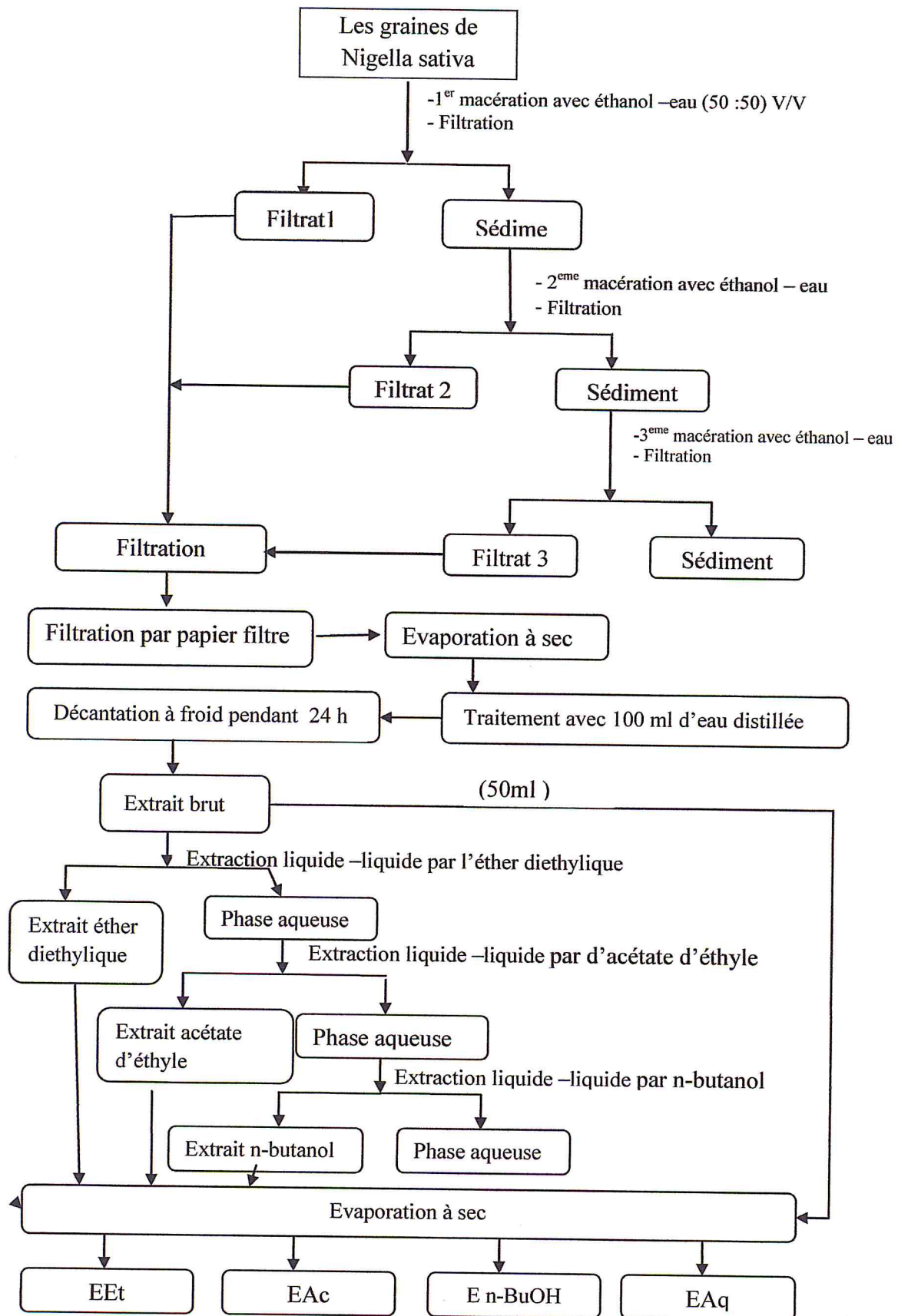


Figure 27 : schéma de l'extraction des flavonoïdes de *Nigella sativa*

I.2.8.1.3. Les rendements en extraits secs flavonoïques obtenus à partir de l'espèce étudiée

Le calcul du rendement de l'extrait brut et le rendement de chaque extrait flavonoïque (fraction éther d'éthylique, acétate d'éthyle, 1-butanol et aqueuse) a été déterminé par rapport à 100 g du matériel végétal sec selon la relation suivante :

$$\text{Rdt (\%)} = [(M1 - M2) / M3] \times 100 \quad (\text{Eq 4})$$

M1 : masse du ballon après évaporation.

M2 : masse du ballon avant évaporation (ballon vide).

M3 : masse de la matière végétale de départ.

I. 2.9. Dosage des polyphénols

Le dosage des Polyphénols a été effectué avec le réactif colorimétrique Folin-Ciocalteu selon la méthode citée par (Wong *et al.*, 2006)[90].

I.2.9.1. Principe :

Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyyles présents dans l'extrait. Le réactif de Folin-Ciocalteu consiste en une solution jaune acide contenant un complexe polymérique d'ions (hétéropolyacides). En milieu alcalin, le réactif de Folin-Ciocalteu, oxyde les phénols en ions phénolates et réduit partiellement ses hétéropolyacides, d'où la formation d'un complexe bleu. Cette coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans le milieu donne un maximum d'absorption à 765 nm [91].

I.2.9.2. Mode opératoire [92] :

- Introduire 200 µl de la solution de l'acide gallique à différentes concentrations dans les tubes d'une première série,
- 200 µl de chaque extrait dilué dans 5 ml du méthanol dans les tubes d'une deuxième série
- Ajout de 1 ml du réactif Folin Ciocalteu dilué 10 fois,
- laisser agir 4 minutes puis ajouter 800 µl de la solution de carbonate de sodium (Na₂CO₃) à 7.5% dans chaque tube,
- Agitation puis incubation à l'obscurité pendant 2 heures,
- Lecture des absorbances à 765 nm.

Le blanc est représenté par 200 µl de méthanol, additionnée de 1 ml du réactif de Folin-Ciocalteu et 800µl de carbonate de sodium à 7.5 %.

I.2.9.3. Expression des résultats :

La concentration en composés phénoliques extractibles totaux est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique, les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait de plante (µg EAG / g E).

Le total des composés phénoliques est déterminé selon l'équation suivante

$$T = C.V/M \quad (\text{Eq 5})$$

T : Représente le total des composés phénoliques (µg EAG / g d'extrait sec de la plante)

C : Concentration d'extrait éthanolique équivalente à l'acide gallique, obtenue à partir de la courbe d'étalonnage (µg/ml)

V : le volume d'extrait éthanolique (ml)

M : masse sec d'extrait éthanolique de la plante (g)

I.2.10. Dosage des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits de *Nigella sativa*. (Markham, K.R (1982)) [93].

I.2.10.1. Principe :

La méthode de chlorure d'aluminium est basée sur la formation d'un complexe Flavonoïdes-aluminium, ce dernier à un maximum d'absorption 420nm.

I.2.10.2. Mode opératoire :

Une gamme de 12 concentrations de rutine allant de 0.9 à 40 µg /ml a été préparée à partir d'une solution mère de 40 µg /ml de concentration 1 ml de chaque extrait et du standard a été ajouté à un volume égal d'une solution d'AlCl₃ (2% dans le méthanol). Le mélange a été vigoureusement agité et l'absorbance à 430 nm a été lue après 10 minutes d'incubation à l'aide d'un spectrophotomètre [93].

I.2.10.3. Expression des résultats :

La quantification des flavonoïdes a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y = a x + b$) réalisé par un standard étalon "la rutine" et les résultats sont exprimés en microgrammes d'équivalent de rutine par gramme d'extrait ($\mu\text{g EQ/g d'extrait}$).

I.2.11. Analyse qualitative par chromatographique sur couche mince CCM

La chromatographie (CCM) est une méthode d'analyse chimique qualitative permettant la séparation et l'identification des espèces chimiques d'un mélange. Elle repose principalement sur des phénomènes d'adsorption. La chromatographie d'adsorption est basée sur la différence d'affinité existant entre ses composés. La phase mobile « l'éluant » est un solvant ou un mélange de solvant qui se progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant. Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans la cuve, l'éluant monte à travers la phase stationnaire, essentiellement par capillarité. En outre, chaque composé de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant [94].

Dans le cas de substances colorées, on visualise plusieurs taches traduisant une séparation. Dans le cas de substances non colorées, il faut les rendre visible, trois solutions s'offrent : Placer la plaque sous lampe UV, utiliser de la vapeur d'iode pour colorer les taches ou utiliser un révélateur chimique.

Chaque constituant migre d'une certaine hauteur, caractéristique de la substance que l'on appelle rapport frontal ou rétention frontale RF avec : $R_f = \text{hauteur de la tache} / \text{hauteur du front du solvant}$. Chaque tache correspond à un constituant et on l'identifie par comparaison du R_f avec un témoin.

I.2.12. Etude de l'activité antioxydant des fractions flavonoïdes

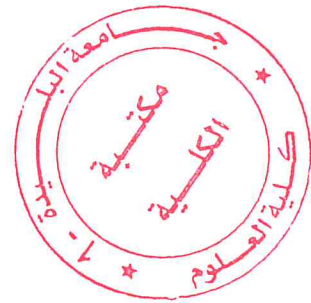
Des nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydant des extraits flavonique purs ou des extraits. La plupart de ces méthodes sont basées sur la coloration ou décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel. Dans notre étude nous avons utilisé deux méthodes différentes : la méthode du test DPPH et la méthode de FRAP.

I.2.12.1. Méthode de piégeage de radical libre DPPH :

Le principe et le mode opératoire de l'activité antioxydante par la méthode du test au DPPH a été déjà décrite au niveau du paragraphe I.2.7.

I.2.12.2 Méthode de Réduction du fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

500 μ l de l'échantillon à différentes concentrations, est mélangé avec 1.25 ml d'une solution tampon phosphate à 0.2 M (pH= 6.6) et 1.25 ml d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. Le tout est incubé à 50°C pendant 20 min, puis refroidi à la température ambiante. Puis 2.5ml d'acide trichloracétique à 10% est ajouté pour stopper la réaction, ensuite les tubes sont centrifugés à 3000 tours pendant 10 min. 1,25ml de surnageant est ajouté à 1.25 ml d'eau distillée et 250 μ l d'une solution de chlorure de fer ($FeCl_3, 6H_2O$) à 0.1%. La lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La même expérience a été faite en remplaçant les échantillons par le standard « l'acide ascorbique » dans les mêmes conditions [97].



Chapitre II : *Résultats et discussion*

II.1. Calcul du rendement d'extraction des huiles végétales :

- L'huile végétale des graines de *Nigella sativa* provenant de deux régions différentes : Algérie et Inde a été extraite par Soxhlet à l'échelle laboratoire (tableau 8).

Tableau 08 : Rendement obtenu de graines de *Nigella sativa*

	Huiles végétales de NS Algérienne	Huiles végétales de NS Indienne
Avec broyage	16.64 ± 0.34	17.23 ± 0.69
Sans broyage	0.37 ± 0.008	0.36 ± 0.03

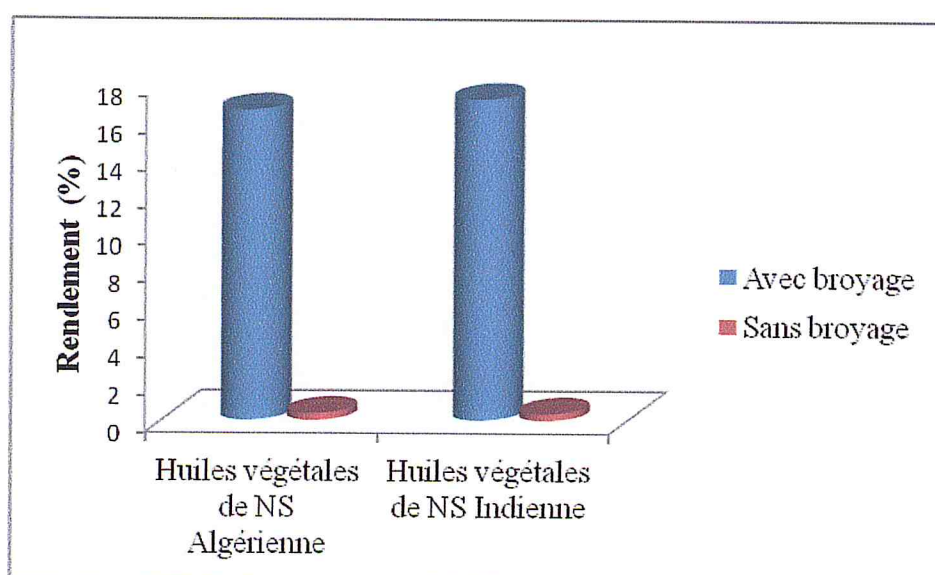


Figure 28: représente les rendements d'huile végétale

On constate d'après ces résultats que le rendement de l'huile végétale des graines de *Nigella sativa* Algérienne donne un rendement de 0.37, 16.44 pour les graines sans et avec broyage respectivement.

Pour la deuxième variété de graines d'origine Indienne donne un rendement de 0.36, 17.23 pour les graines sans et avec broyage respectivement. On conclut que les graines pour les deux variétés donnent le meilleur rendement avec broyage.

II.2. Propriétés organoleptiques de l'huile végétale des graines de *Nigella sativa*

L'huile végétale des graines de *Nigella sativa* obtenue par Soxhlet présente les caractères organoleptiques regroupés dans le tableau 09.

Tableau 09 : Propriétés organoleptiques de l'huile végétale des graines de *Nigella sativa*

	Aspect	Couleur	Odeur
NS Algérienne	Liquide huileux limpide	jaune-orangé	Très aromatique, épicée, piquante, très caractéristique
NS Indienne	Liquide huileux limpide	vert-jaune	Aromatique, épicée, piquante, caractéristique



(1)



(2)

Figure 29 : huile végétale des graines de *Nigella sativa* (1) Algérienne et (2) Indienne

II.3. Caractéristiques physico-chimiques de l'huile végétale des graines de *Nigella sativa*

Les résultats des analyses physico-chimiques sont donnés sur le tableau 32:

Tableau 10 : Caractéristiques physico-chimiques de l'huile végétale des graines de *Nigella sativa* :

	I _A	I _S	I _E	I _R	Densité	I _P
NS Algérienne	3.76	58.06	54.30	1.3684	0.998492	18.96
NS Indienne	2.41	51.33	48.92	1.3688	0.998867	20.21

Les paramètres physico-chimiques sont influencés par les conditions édaphiques et climatiques ainsi que les conditions de culture des plantes.

- La densité des huiles est généralement inférieure à 1 (sauf quelques exceptions), ce qui est vérifié pour notre huile.
- L'indice de réfraction dépend de la composition chimique qui augmente en fonction des longueurs des chaînes d'acides, de leurs degrés d'insaturation et de la température. Il varie essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé. Les valeurs d'indice de réfraction mesurées est légèrement supérieure à l'indice de réfraction de l'eau à 20°C (1,333) et légèrement inférieure à l'indice de l'huile d'olives à 20°C 1.460. Le faible indice de réfraction d'huile végétale indique leur faible réfraction de la lumière, ce qui pourrait favoriser leur utilisation dans les produits cosmétiques [98].
- L'indice d'acide donne une idée sur le taux d'acides libres ; Une huile de bonne qualité doit présenter une acidité faible. Dans notre étude, cet indice est un peu élevé pour les deux échantillons. Cela peut trouver une explication dans la dégradation de l'huile végétale durant sa conservation [99].
- L'indice de saponification nous révèle la longueur des chaînes hydrocarbonées des acides gras, il caractérise le poids moyen de la matière grasse auquel il est inversement proportionnel : plus le poids moléculaire est élevé, plus l'indice de saponification est faible [98].
- L'indice de peroxydes : en général une matière grasse présente un goût de rance lorsque l'indice de peroxydes atteint de 100 à 320, ce qui correspond de 10 à 20 millimolécules de peroxydes / Kg [99].

La détermination des propriétés physico-chimiques est une étape nécessaire mais non suffisante pour caractériser les huiles végétales. Il est donc nécessaire de la compléter par des analyses chromatographiques : GC/MS.

II.4. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS) pour les graines de *Nigella sativa* Algérienne :

L'huile végétale extraite par Soxhlet, a été ensuite, analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. 28 composés, représentant 99% de l'huile végétale de *Nigella sativa* dont 5 composés majoritaires avec une teneur qui dépassent

96.14% sont identifiés. Les composés sont listés dans le tableau 11. Le chromatogramme de l'huile obtenue est donné dans la figure 30.

Tableau 11 : Composés identifiés dans l'huile végétale des graines de *Nigella sativa* Algérienne par GC/MS

N°	Temps de rétention	Composés	Pourcentage	Famille chimique	Composition chimique
1	18.56	Acide palmitique	14.8 %	AG saturé	$C_{16}H_{32}O_2$
2	21.479	Acide linoléique	54.3 %	AG poly insaturé	$C_{18}H_{32}O_2$
3	21.56	Acide oléique	22.2 %	AG insaturé	$C_{18}H_{34}O_2$
4	21.92	Acide stéarique	2.8 %	AG saturé	$C_{18}H_{36}O_2$
5	26.67	Acide Eicosadienoïque	2.04 %	AG poly insaturé	$C_{20}H_{36}O_2$

Les résultats obtenus montrent que l'huile totale des graines de *Nigella sativa* est très riche en acides gras insaturés représentant 80,6 % de l'huile totale. Alors que la teneur en acides gras saturés ne représente que 19,4 % de l'huile totale. Elle est composée majoritairement de : l'acide linoléique (54,3 %), l'acide oléique (22,2%) et l'acide palmitique (14,8%).

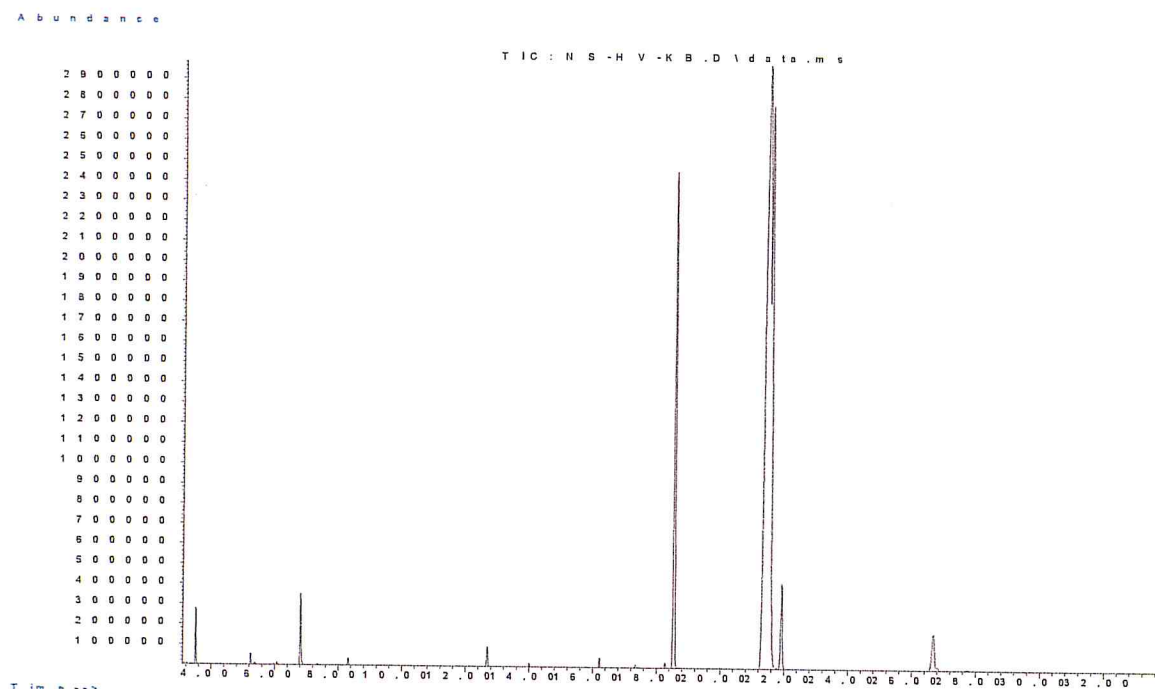


Figure 30 : Chromatogramme d'analyse de l'huile végétale des graines de *Nigella sativa*

II.5. Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode de DPPH de l'huile végétale extraite

La mesure de l'activité antioxydante est évaluée par spectrophotométrie en suivant la réduction du radical DPPH qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 515 nm.

Dans notre travail nous avons étudié l'activité antioxydante des huiles végétales des graines étudiées. La coloration, mesurée au spectrophotomètre, est inversement proportionnelle à l'activité anti-radicalaire des composés dont on souhaite déterminer leurs activités. Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes ayant une allure linéaire présentée dans les figures ci-dessous.

Tableau 12 : variation de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de standard d'acide ascorbique.

Concentration (µg/mL)	0,1	0,15	0,25	0,5	1	1,25
Acide ascorbique	36,98	40,1	44,2	58,2	81,3	91,23

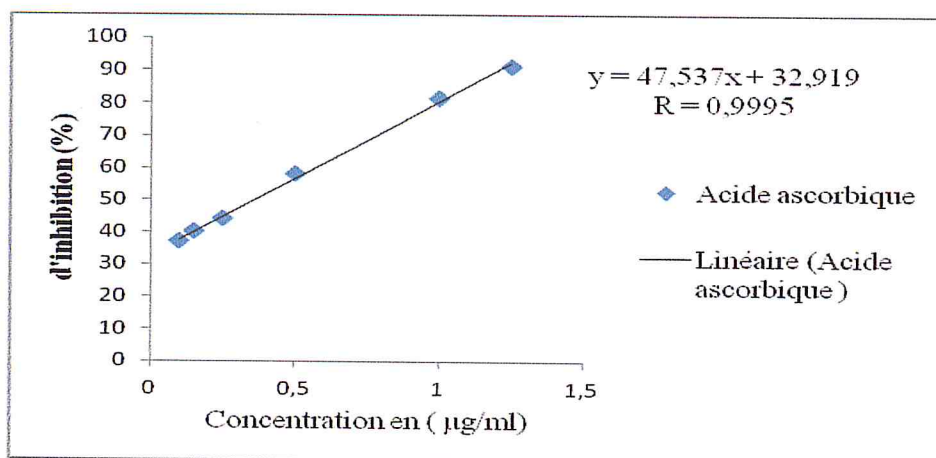


Figure 31 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'acide ascorbique

Tableau 13 : variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration d'huile végétale de *Nigella sativa* Algérienne.

Concentration (µg/ml)	0,4	0,6	0,8	1	1,2	1,4
HV de NS Algérienne	3,205	15,955	25,223	38,602	49,08	62,476

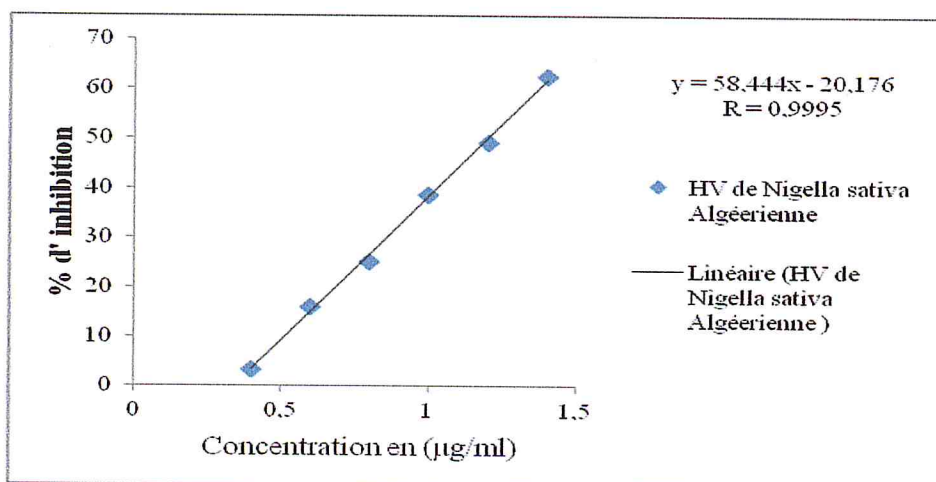


Figure 32 : Pourcentage d'inhibition de DPPH par huile végétale de *Nigella Sativa* Algérienne.

Tableau 14 : variation du pourcentage d'inhibition en fonction de concentration d'huile végétale de *Nigella sativa* Indienne

Concentration (µg/ml)	0,4	0,6	0,8	1	1,2	1,4	1,6
HV de NS Indienne	1,66	10,611	19,939	32,025	41,881	49,63	59,874

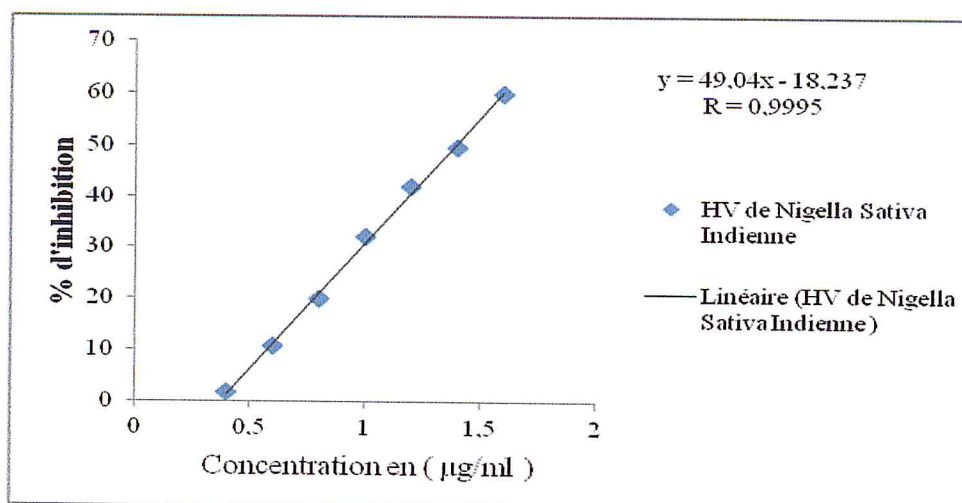


Figure 33 : Pourcentage d'inhibition de DPPH par huile végétale de NS Indienne.

A partir des résultats obtenus et pour mieux caractériser le pouvoir antioxydant, nous avons introduit le paramètre IC_{50} .

Calcul d' IC_{50} : il définit la concentration efficace du substrat qui cause la réduction de 50% du DPPH en solution. Les valeurs d' IC_{50} des huiles végétales de *Nigella sativa* sont enregistrées dans le tableau 15 et dans la figure 34.

Tableau 15: Valeurs des IC_{50} des huiles végétale et témoin déterminées par le test au DPPH.

	HV de NS Algérienne	HV de NS Indienne	Acide ascorbique
IC_{50}	1,2	1,391	0,351

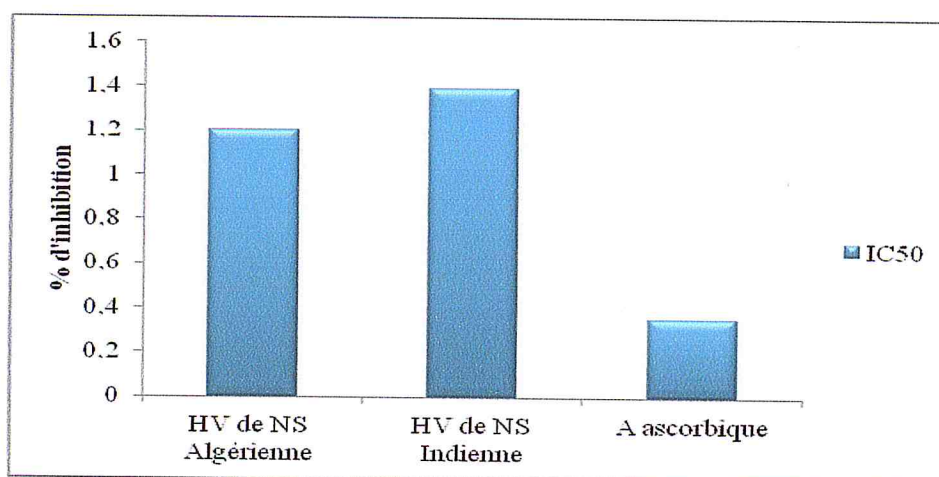


Figure 34 : Les valeurs d' IC_{50} des huiles végétales d'*Nigella sativa* et témoin déterminées par le test au DPPH

Nous constatons que l'EC50 deux huiles végétales de « *Nigella sativa* » est supérieure à ce lui de l'acide ascorbique qui est très actif à cause de son hydro-solubilité marquée. Nous déduisons par conséquent que l'action de notre huile est inférieure à celle de la vitamine C.

En Effet, le pouvoir antioxydant est d'autant plus important que la capacité de piéger le radical libre DPPH soit élevée.

D'après les résultats illustrés dans l'histogramme on remarque que nos échantillons ont un pouvoir antioxydant moyen.

On conclut que l'huile végétale de graines de *Nigella sativa* Algérienne est plus active que celles d'huile végétale de *Nigella sativa* provenant de l'Inde.

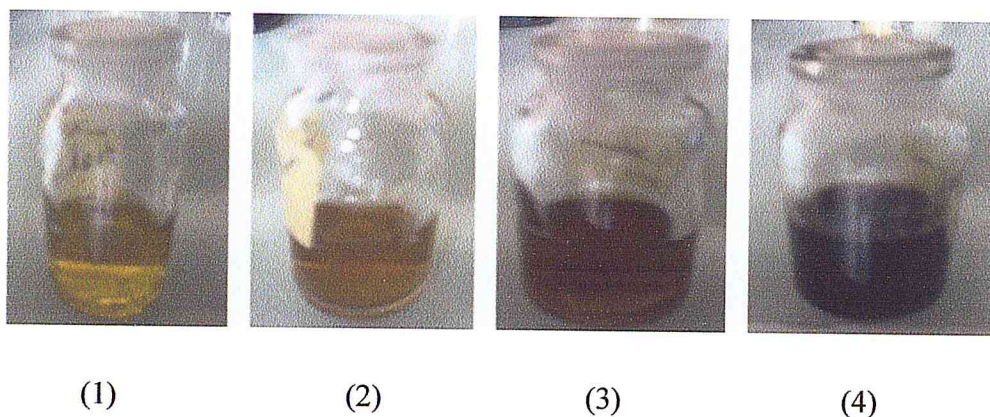
II.6. Extraction des flavonoïdes

La préparation des extraits à partir des graines de *Nigella sativa* a été effectuée selon la méthode de (Wong et al,2006) [90] modifiée, qui est très recommandée pour l'extraction des flavonoïdes. Cette extraction a été effectuée en deux grandes étapes, la première est une extraction par un mélange hydroalcoolique éthanol/eau (50/50 V/V) pour obtenir initialement l'extrait brut contenant les flavonoïdes totaux. La deuxième étape de fractionnement a été réalisée par une série de solvants à polarité croissante (éther diéthylique → acétate d'éthyle → n-butanol) permettant ainsi de séparer les composés de l'extrait brut selon leur degré de solubilité dans les solvants d'extraction et donc selon leur degré de glycosylation (flavonoïdes aglycones, mono, di et tri-glycosylés) [100]. Après le fractionnement de l'extrait hydroalcoolique ; différents extraits ont été obtenus successivement: l'extrait éther diéthylique (EEt), l'extrait d'acétate d'éthyle (EAc), l'extrait n-butanol (E-BuOH) et l'extrait aqueux (EAq).

Le rendement a été déterminé par rapport à 100 g du matériel végétal sec et broyé et exprimé en pourcentage (P/P). La couleur, l'aspect ainsi que le rendement de chaque extrait par rapport au poids sont représentés dans le tableau 16 ci-dessous.

Tableau 16 : Aspects, couleurs et rendements des diverses fractions extraites à partir des graines de *Nigella sativa*

Extrait	Aspect	Couleur	Rendement de NS Algérienne	Rendement de NS Indienne
EEt	Poudre	Jaune	0.28	0.38
EAc	Pâteux	Jaune foncé	0.21	0.05
En-BuOH	Pâteux	Brunâtre foncé	1.76	1.41
EAq	Poudre	Brunâtre	2.40	2.22

**Figure 35 :** Les fractions des graines de *Nigella sativa* (1) éther diéthylique, (2) acétate d'éthyle, (3) n-butanol, (4) Aqueux.

Les résultats obtenus montrent que dans les deux variétés des graines de *Nigella sativa*, les extraits En-BuOH et EAq ont donné les proportions les plus élevées en comparaison avec les extraits EAc et EEt. Pour les graines de *Nigella sativa* Algérienne, l'extrait aqueux représente le rendement le plus élevé (2.40 %) suivi de l'En-BuOH avec un rendement de (1.76%), les extraits EEt et EAc ont les plus faibles rendements (0.28% et 0.21 % respectivement).

Pour les graines de *Nigella sativa* Indienne, l'extrait aqueux représente le rendement le plus élevé (2.22 %) suivi de l'En-BuOH (1.41%), les extraits EEt et EAc ont les plus faibles rendements avec 0.38% et 0.05 % respectivement.

Cette méthode d'extraction menée à température ambiante permet d'extraire le maximum de composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction.

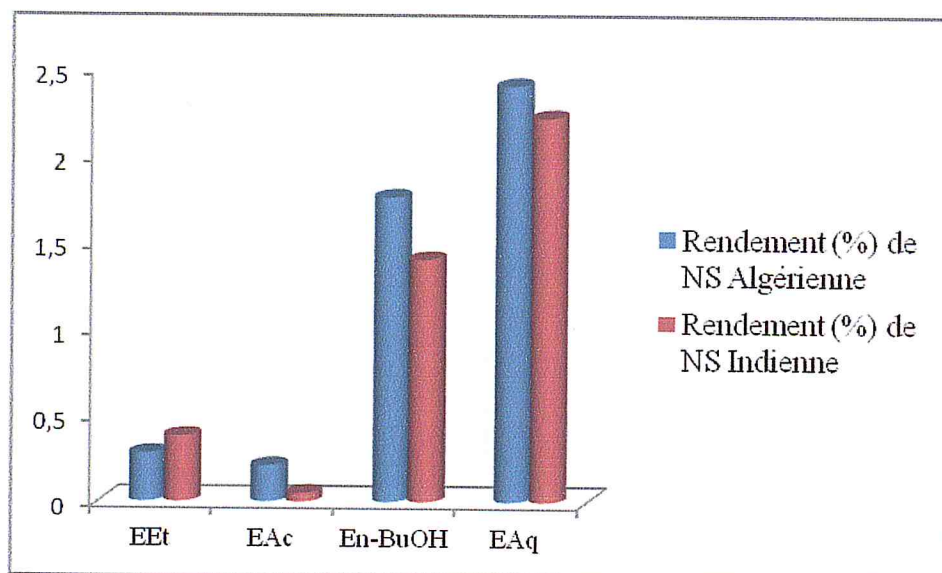


Figure 36: Rendements en (%) des extraits étudiés de *Nigella sativa*

D'après les résultats obtenus ; on remarque que le rendement le plus élevé est celui de l'extrait aqueux pour les deux variétés des graines, il est de; 2.4% ; 2.12 % respectivement. Cependant, l'extrait Acétate d'éthyle présente un faible rendement par rapport aux autres extraits.

Aussi, les résultats mentionnés montrent que tous nos extraits sont solubles dans l'eau.

Toutefois, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie, car le rendement n'est que relatif et semble être lié aux propriétés génétiques des graines ainsi qu'à l'origine géographique, aux conditions et à la durée de stockage de la récolte et aussi aux méthodes d'extraction appliquées.

II.6.2. Dosage spectrophotométrique

II.6.2.1. Dosage des Polyphénols totaux, des flavonoïdes :

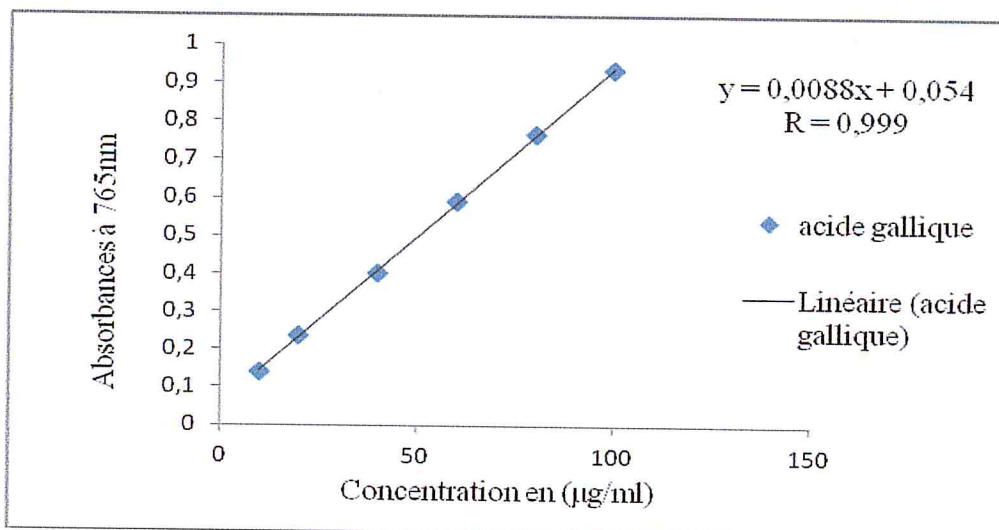
L'estimation quantitative des Polyphénols totaux a été réalisée en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu (Wong *et al*, 2006) [94]. L'acide gallique a été utilisé comme standard.

Le dosage des flavonoïdes totaux a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium (Markham, K.R (1982)) [93]. La rutine a été utilisée comme standard.

Les résultats du dosage sont représentés dans les tableaux 19 et 20, et les courbes d'étalonnages dans les figures 37, 38.

Tableau 17 : variation d’Absorbance en fonction de concentration de standard Acide gallique.

Concentration (µg/ml)	10	20	40	60	80	100
acide gallique	0,14	0,235	0,4	0,59	0,765	0,933

**Figure 37** : Droite d'étalonnages de l'acide gallique**Tableau 18** : Variation des absorbances en fonction des différentes concentrations de standard la rutine.

Concentration (µg/ml)	0	1,7	2,5	3,5	5	10	15	20	25	30	40
Abs	0,019	0,051	0,07	0,098	0,141	0,275	0,4	0,548	0,688	0,819	1,058

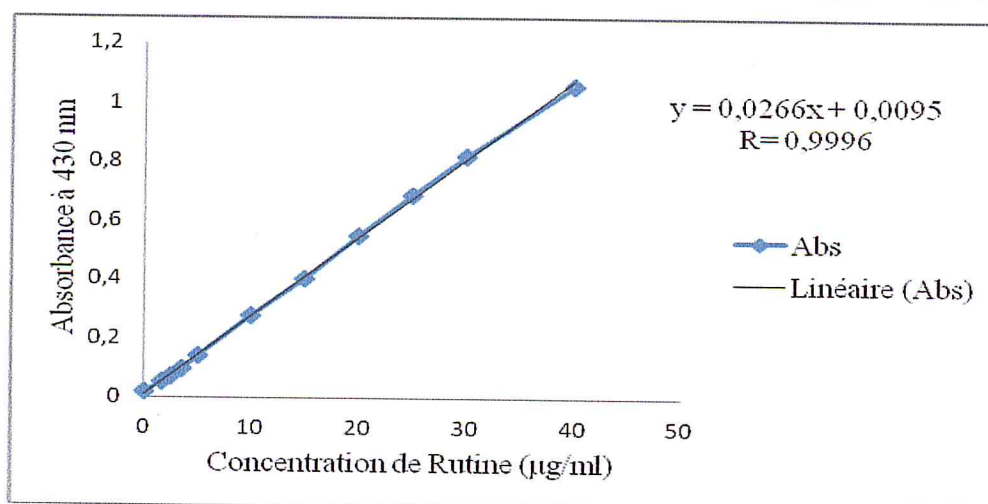
**Figure 38** : Droite d'étalonnages de la Rutine.

Tableau 19 : Résultats du dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes condensés dans les extraits de *Nigella sativa* Algérienne

Extraits	Polyphénols (a)	Flavonoïdes (b)
EEt	75.320 ± 0.465	2.338 ± 0.389
EAc	161.914 ± 0.520	17.960 ± 0.143
En-BuOH	125.001 ± 0.453	24.338 ± 0.219
Eaq	180.245 ± 0.216	8.302 ± 0.295

Tableau 20 : Résultats du dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes condensés dans les extraits de *Nigella sativa* Indienne

Extraits	Polyphénols (a)	Flavonoïdes (b)
EEt	22.090 ± 0.322	1.050 ± 0.362
EAc	94.369 ± 0.152	12.534 ± 0.229
En-BuOH	87.725 ± 0.532	1.569 ± 0.400
Eaq	163.205 ± 0.443	9.687 ± 0.273

(a) μg d'équivalent d'acide gallique par mg d'extrait (μg EAG/mg d'extrait).

(b) μg d'équivalent de rutine par mg d'extrait (μg ER/mg d'extrait).

Selon les résultats illustrés ci-dessus, on distingue que les fractions de NS Algérienne sont les plus riches en phénols totaux par rapport aux fractions de NS Indienne qui présente une teneur faible.

Les résultats du dosage des Polyphénols totaux révèlent que :

- Pour les fractions de NS algérienne : la teneur en composés phénoliques de l'extrait aqueux ($180.245 \pm 0.216 \mu\text{g}$ EAG/g d'extrait) est supérieure à celle de l'extrait d'acétate d'éthyle ($143.914 \pm 0.250 \mu\text{g}$ EAG/g d'extrait), l'extrait En-BuOH renferme ($125.001 \pm 0.453 \mu\text{g}$ EAG/g d'extrait), tandis que l'extrait éther diéthylique ne contient que ($75.320 \pm 0.467 \mu\text{g}$ EAG/g d'extrait).
- Pour les fractions de NS Indienne : l'extrait aqueux est plus riche en composés phénolique ($163.205 \pm 0.443 \mu\text{g}$ EAG/g d'extrait) suivi par l'extrait d'acétate d'éthyle ($94.396 \pm 0.152 \mu\text{g}$ EAG/g d'extrait), l'extrait En-BuOH renferme ($87.725 \pm 0.532 \mu\text{g}$

EAG/g d'extrait), alors que l'extrait éther d'éthyle ne contient que ($22.090 \pm 0.322 \mu\text{g}$ EAG/g d'extrait) respectivement.

La détermination quantitative des flavonoïdes par la méthode du trichlorure d'aluminium révèle que :

- Pour les fractions de NS Algérienne : l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait butanol sont les plus riches en flavonoïdes avec des teneurs de ($24.33 \pm 0.219 \mu\text{g ER/g}$ d'extrait) et ($17.960 \pm 0,143 \mu\text{g ER/g}$ d'extrait) respectivement. Par la suite vient l'extrait aqueux ($8.302 \pm 0.295 \mu\text{g ER/g}$ d'extrait) suivi par l'extrait éther d'éthyle ($2.33 \pm 0.389 \mu\text{g ER/g}$ d'extrait).
- Pour les fractions de NS Indienne : l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait aqueux sont riches en flavonoïdes avec des teneurs de ($12.534 \pm 0.229 \mu\text{g ER/g}$ d'extrait) et ($9.687 \pm 0.273 \mu\text{g ER/g}$ d'extrait) respectivement. Par la suite vient l'extrait butanol ($1.569 \pm 0.400 \mu\text{g ER/g}$ d'extrait) suivi par l'extrait éther d'éthyle ($1.050 \pm 0.362 \mu\text{g ER/g}$ d'extrait).

D'après les résultats de Boudiaf en 2006 [104], l'extrait Acétate d'éthyle est riche en Polyphénols ($79.48 \pm 8.80 \mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait) et pauvre en flavonoïdes ($5.96 \pm 0.25 \mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait), cependant dans l'extrait aqueux que renferme à ($23.81 \pm 2.67 \mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait) des Polyphénols et ne contient que ($3.17 \pm 0.16 \mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait) des flavonoïdes.

D'après M.Asma en 2008 [20], l'extrait Acétate d'éthyle contient une teneur de polyphénols ($72.43 \pm 8.80 \mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait), les flavonoïdes ($4.19 \pm 0.09 \mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait) et l'extrait aqueux renferme que des Polyphénols ($27.57 \pm 0.58 \mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait) et des flavonoïdes ($4.19 \pm 0.09 \mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait).

H.Talbi et al en 2015 [92] à trouvé la teneur de Polyphénols totaux et les flavonoïdes sont ($163.32 \pm 10.26 \mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait), ($169.26 \pm 5.78 \mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait) respectivement dans l'extrait aqueux de *Nigella sativa* cultivée dans la région d'Arfoud (Maroc).

En effet, la teneur en polyphénols totaux n'est pas stable et se diffère d'une plante à une autre même entre les espèces du même genre, Ceci pourrait être attribués aux différences de polarité des solvants, aux techniques d'extraction et aussi bien à d'autres facteurs environnementaux tels que le climat, l'exposition au soleil et la composition du sol, qui peut changer le métabolisme phénolique des plantes [101,102].

II.7. Analyse qualitative par chromatographique sur couche mince CCM

Pour avoir les empreintes flavoniques de nos extraits, et avoir une idée sur leurs compositions chimiques, une chromatographie analytique sur couche mince a été réalisée en utilisant deux systèmes solvants moyennement polaires. Sous lumière UV à 365 nm Les différentes taches de produits qui se présentent sur les chromatogrammes ont été délimitées.

Les couleurs des spots et leurs Rf observés sous UV suite à une analyse par chromatographie sur couche mince, nous ont permis de révéler la présence des flavonols.

Nous avons adopté deux systèmes de solvants :

Système 1 : Chloroforme/ méthanol/acide acétique/eau ; (40 : 6 : 0,1 : 0,2) (v : v : v :v)

Système 2 : Acétate d'éthyle/ acide formique/ eau distillée ; (32 : 8 :10) ; (v : v : v)

Les deux systèmes de migration ont permis d'avoir une séparation chromatographique et une visibilité acceptable des spots. La révélation est réalisée par l'observation sous lumière ultraviolette à 365 nm ont permis d'avoir une visibilité acceptable des spots.

Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 06 et présentés dans les figures 36.

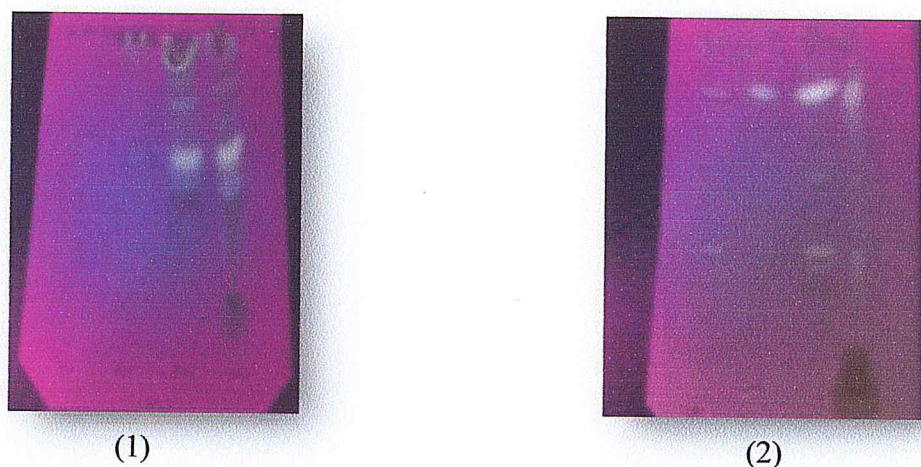


Figure 39 : plaque CCM des extraits flavonique de *Nigella sativa* (1) NS Algérienne, (2) NS Indienne

- Pour le système 01 : mauvaise séparation pour les deux variétés
- Pour le système 2 :

Les fractions de NS Algérienne : nous avons pu mettre en évidence cinq composés pour la fraction Ether diéthylique, un seul composé pour la fraction Acétate d'éthyle, six pour l'extrait butanolique et quatre composés pour l'extrait aqueux.

Les fractions de NS Indienne : nous avons pu mettre en évidence deux composés pour la fraction Ether diéthylique et Acétate d'éthyle et sept composés pour l'extrait butanolique et aqueux.

Comme il est illustré sur les figures ci-dessus, nous avons déterminé le Rf de chaque couleur et les résultats sont représentés dans les tableaux suivants.

Tableau 21 : comportement chromatographique des extraits EEt, EAc, n-BuOH, EAq de *Nigella sativa* Algérienne dans le système 2 :

	Extrait	Rf	Observation
NS Algérienne	EEt	0.38	Violet
	EAc	0.17	Violet
		0.74	Violet
	En-BuOH	0.17	Violet
		0.23	marron
		0.27	Bleu
		0.31	Jaune fluorescent
		0.41	Bleu
		0.64	Jaune
		0.70	Jaune
		0.80	Violet
	EAq	0.06	marron
		0.17	marron
		0.25	Bleu
		0.31	Jaune fluorescent
		0.41	Violet
		0.52	Bleu
0.58		Violet	
0.67		Bleu	
0.74		Violet	
0.82	Violet		

Tableau 22 : comportement chromatographique des extraits EEt, EAc, n-BuOH , EAq de *Nigella sativa* Indienne dans le système 2 :

	Extrait	Rf	Observation
NS Indienne	EEt	0.2	Violet
		0.31	Violet
		0.34	Jaune
		0.52	Bleu
		0.76	Violet
	EAc	0.76	Violet
	En-BuOH	0.23	Violet
		0.31	Violet
		0.36	Jaune
		0.47	Violet
		0.54	Bleu
		0.76	Violet
	EAq	0.10	Marron
		0.32	Jaune
		0.52	Bleu
0.76		Violet	

Tableau 23: Les résultats de la chromatographie sur couche mince des témoins des composés phénoliques Système solvants 1 [100].

Témoins	Rf	Couleurs des spots (365 nm)	Classes phénolique
Rutine	0.04	violet	Flavonol
catéchine	0.09	violet	Flavonol
Acide gallique	0.13	Bleu violet	Acide phénol
Quercétine	0.41	jaune	Flavonol
Acide paracoumarique	0.64	violet	Acide phénol
Pyrocatechol	0.71	violet	Phénol simple
Acide férulique	0.55	Bleu	Acide phénol
Myricétine	0.08	Jaune	Flavonol
Résorcinol	0.40	violet	Phénol simple
Hydroquinone	0.36	Violet	Phénol simple

Tableau 24: Les résultats de la chromatographie sur couche mince des témoins des composés phénoliques système 2 [103].

Témoins	Rf	Couleurs des spots (365 nm)	Classes phénolique
Rutine	0.74	Violet	Flavonol
Catéchine	0.87	Violet	Flavonol
Acide gallique	0.9	Bleu	Acide phénol
Quercétine	0.75	Violet	Flavonol
Quercétagetine	0.76	Violet	Flavonol
Acide syringique	0.94	Bleu	Acide phénol
Acide férulique	0.95	Bleu	Acide phénol
Acide paracoumarique	0.92	Bleu	Flavone glycoside

L'examen sous lumière UV fournit des informations très importantes sur la configuration structurale des molécules isolées. En effet, le chromatogramme du contenu flavonique des différents extraits EEt, EAc ; BuOH ,EAq, des graines de *Nigella sativa L.* s'est distingué par l'apparition de plusieurs bandes de couleur, mais en absence de témoins authentiques, il nous est impossible à ce stade, de confirmer l'identité de ces flavonoïdes.

Par ailleurs des études antérieures, ont démontré qu'il existe une relation entre la structure d'un composé et sa fluorescence sous UV. Ces résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau 25: La relation entre la fluorescence et les flavonoïdes [106].

Couleur observée sous UV 365 nm	Type de flavonoïdes possibles
Jaune	Flavonols
Bleu clair	Flavones sans 5-OH libre Flavones sans 5-OH libre avec 3 OH
Bleu fluorescent	Flavonols, flavones, isoflavones, flavones
Jaune pale	Dihydroflvonol
Violet	Flavone

II.8. Evaluation de l'activité antioxydante

II.8.1. Test de piégeage du radical libre DPPH :

L'activité antioxydante des extraits des graines *Nigella Sativa L.* et de l'antioxydant standard (acide ascorbique) vis-à-vis du radical DPPH à été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre en

suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH•) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurable à 517nm (Figure 3). Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti-radicalaires [23].

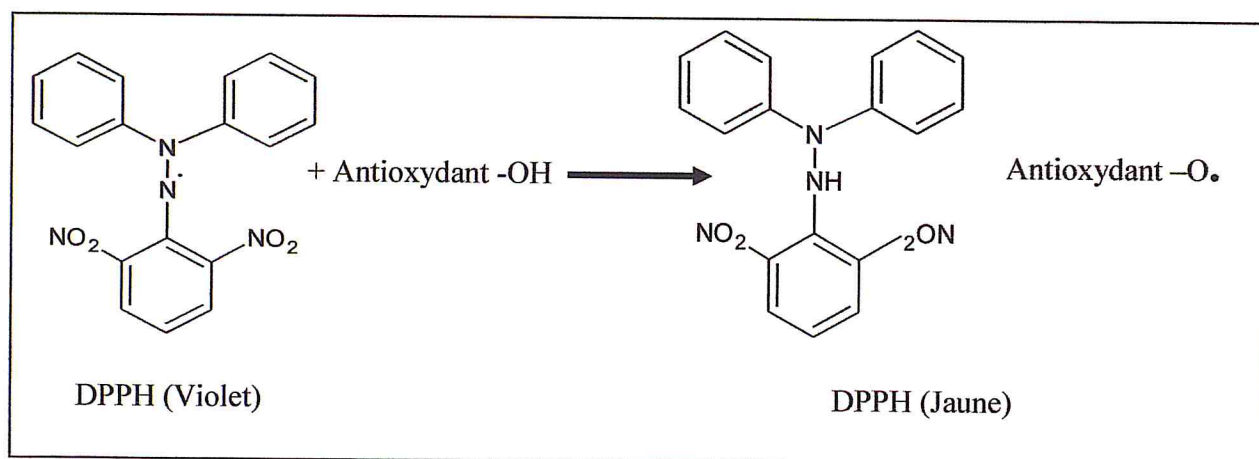


Figure 40: Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH

Tableau 26: Variation des inhibitions en fonction des différentes concentrations des standards d'antioxydants acide ascorbique.

Concentration	0,1	0,15	0,25	0,5	1	1,25
Acide ascorbique	36,98	40,1	44,2	58,2	81,3	91,23

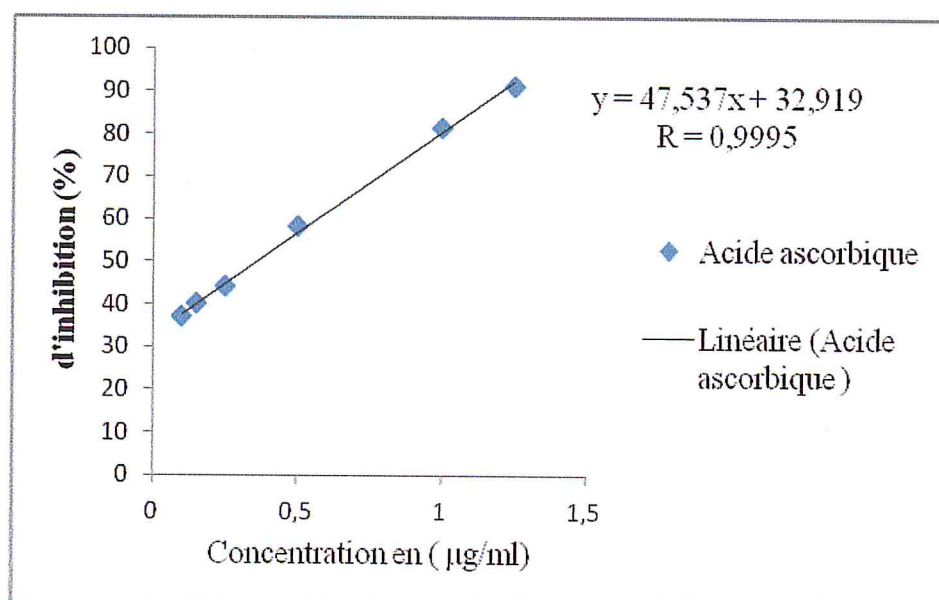
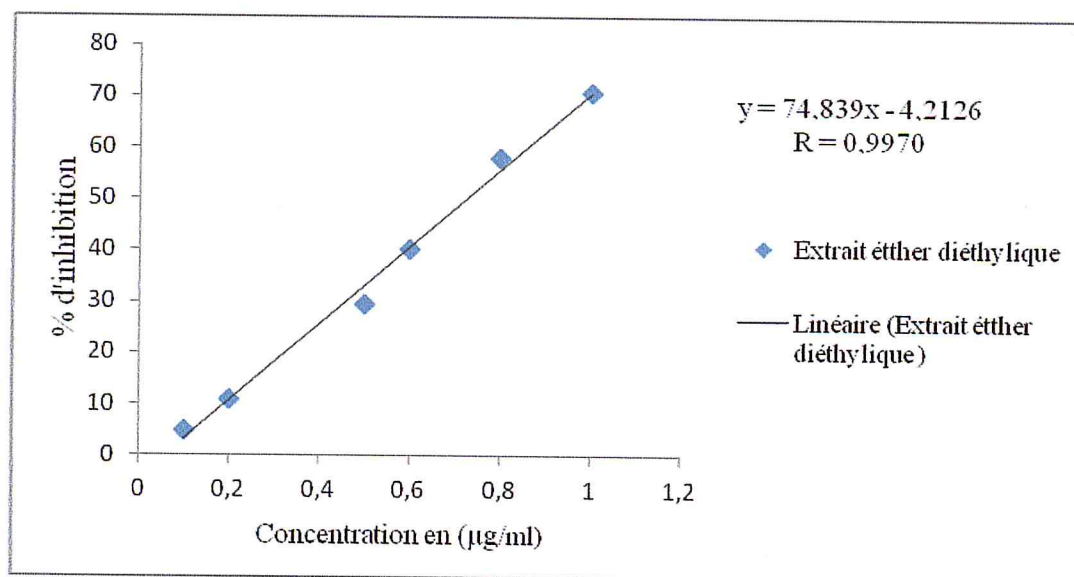


Figure 41 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'acide ascorbique

Tableau 27 : Variation des inhibitions en fonction des différentes concentrations d'extrait éther diéthylique.

Concentration (mg/ml)	0,1	0,2	0,5	0,6	0,8	1
Ether diéthylique	4,82	10,89	29,64	40,3	57,85	70,71

**Figure 42** : Pourcentage d'inhibition de DPPH par l'extrait éther diéthylique**Tableau 28** : Variation des inhibitions en fonction des différentes concentrations d'extrait d'acétate d'éthyle.

Concentration (µg/ml)	0,05	0,1	0,2	0,3	0,8	1
Acétate d'éthyle	2,56	8,05	13,36	22,52	57,32	67,94

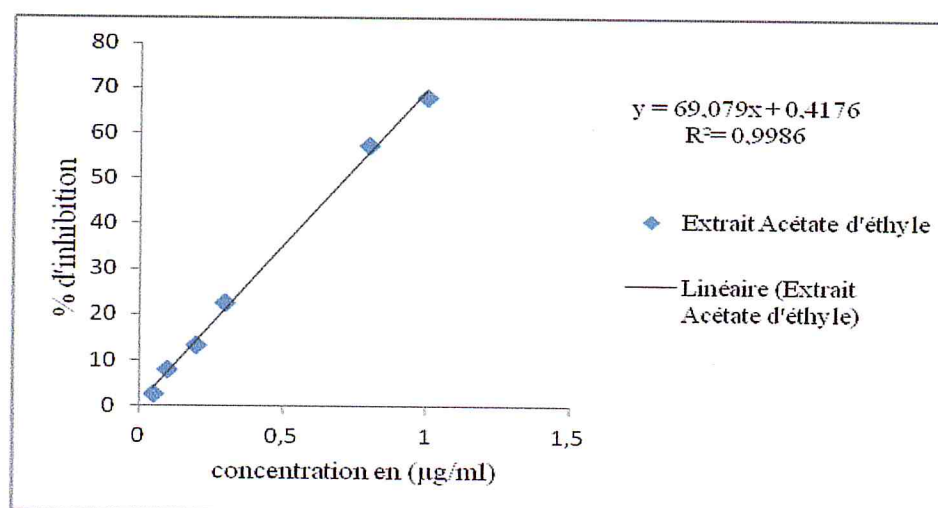
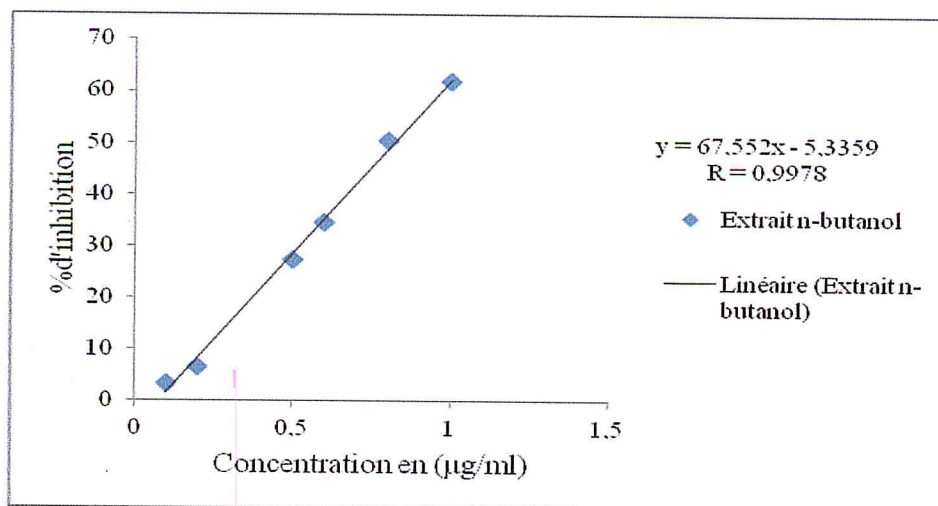
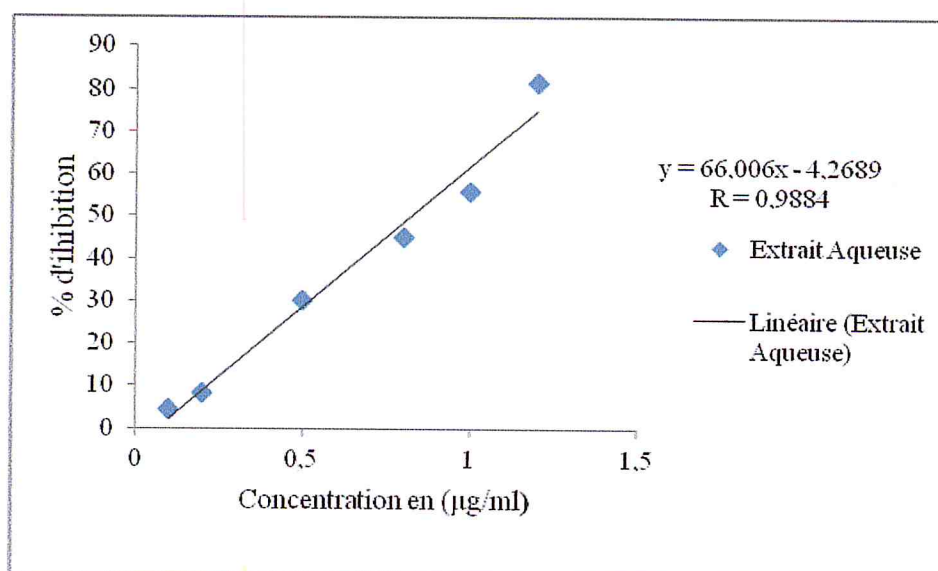
**Figure 43** : Pourcentage d'inhibition de DPPH par l'extrait acétate d'éthyle

Tableau 29 : Variation des inhibitions en fonction des différentes concentrations d'extrait n-butanol.

Concentration (µg/ml)	0,1	0,2	0,5	0,6	0,8	1
E n-BuOH	3,42	6,5	27,4	34,45	50,49	61,89

**Figure 44** : pourcentage d'inhibition de DPPH par l'extrait n- butanol.**Tableau 30** : Variation des inhibitions en fonction des différentes concentrations d'extrait aqueuse.

Concentration (µg/ml)	0,1	0,2	0,5	0,8	1	1,2
E aqueuse	4,5	8,18	30,09	45,09	55,72	81,63

**Figure 45** : Pourcentage d'inhibition de DPPH par l'extrait Aqueuse

Calcul d'IC₅₀ : il définit la concentration efficace du substrat qui cause la réduction de 50% du DPPH en solution. Les valeurs de IC₅₀ des extraits :EEt, EAc, n-BuOH ,EAq de *Nigella sativa* sont enregistrés dans le tableau 13.

Tableau 31 : valeurs des IC₅₀ établies pour chaque extrait ainsi que celle de l'acide ascorbique

Echantillon	IC ₅₀ (µg/ml)
Acide ascorbique	0.359
EEt	0.724
EAc	0.717
En-BuOH	0.819
EAq	0.822

L'activité antiradicalaire de nos extraits est exprimée en IC₅₀. Pour chaque extrait, l'IC₅₀ est déduite de la droite d'étalonnage correspondante.

Comme figurant dans le tableau ci-dessus, l'antioxydant standard Acide ascorbique a montré une activité antioxydante puissante avec une IC₅₀ de l'ordre de 0.359 µg/ml.

Parmi les quatre extraits de *Nigella sativa* NS Indienne , l'extrait l'acétate d'éthyle et éther diéthylique représente le extrait le plus actif avec IC₅₀ de l'ordre de 0.717 et 0.724 µg/ml respectivement, suivi par l'extrait butanol e et l'extrait Aqueuse représente une bonne activité anti radicalaire avec IC₅₀ de l'ordre de 0.819 et 0.829 µg/ml respectivement. L'activité de l'extrait l'acétate d'éthyle est inférieure à celle de l'Acide ascorbique (0.35 µg/ml.).

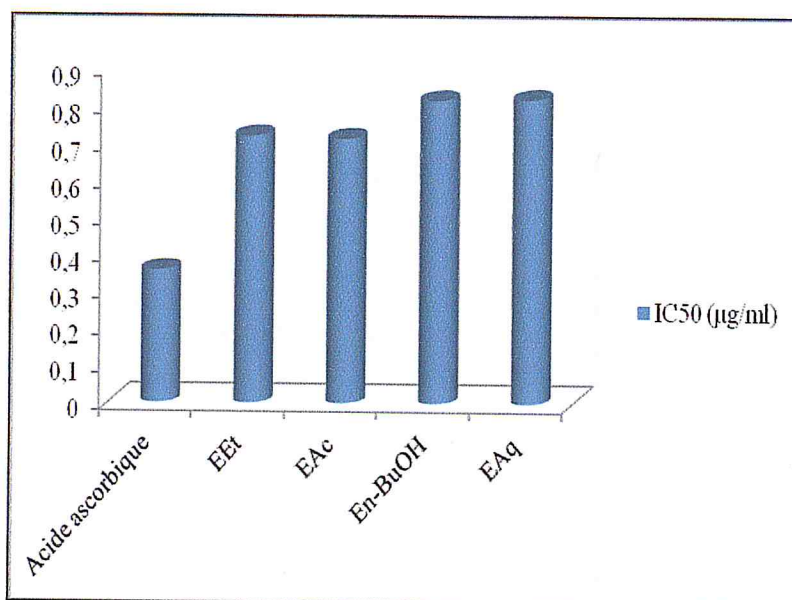


Figure 46 : Les IC50 des différents extraits e *Nigella sativa* Algérienne et de l'acide ascorbique

À des fins comparatives, un antioxydant standard est utilisé : l'acide ascorbique a montré une activité antiradicalaire puissante avec IC50 de l'ordre de 0,134µg/ml. En comparaison avec l'acide ascorbique, tous les extraits testés s'avèrent actifs. Parmi les quatre fractions l'extrait acétate d'éthyle le plus actif avec un IC50 égale à 0.717 µg/ml et l'extrait acétate d'éthyle est le moins actif.

II.8.2.Méthode de Réduction du fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) :

L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de réduction de fer est une méthode facile et reproductible, pour cela elle est très utilisée pour distinguer les extraits les plus actifs. La présence des réductants dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe^{+3} / complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, Fe^{+2} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700nm (Oyaizu,M 1986) [97]. Les figures 47 et 48 représentent le pouvoir réducteur des extraits d'*Nigella sativa* et de l'acide ascorbique à différentes concentrations.

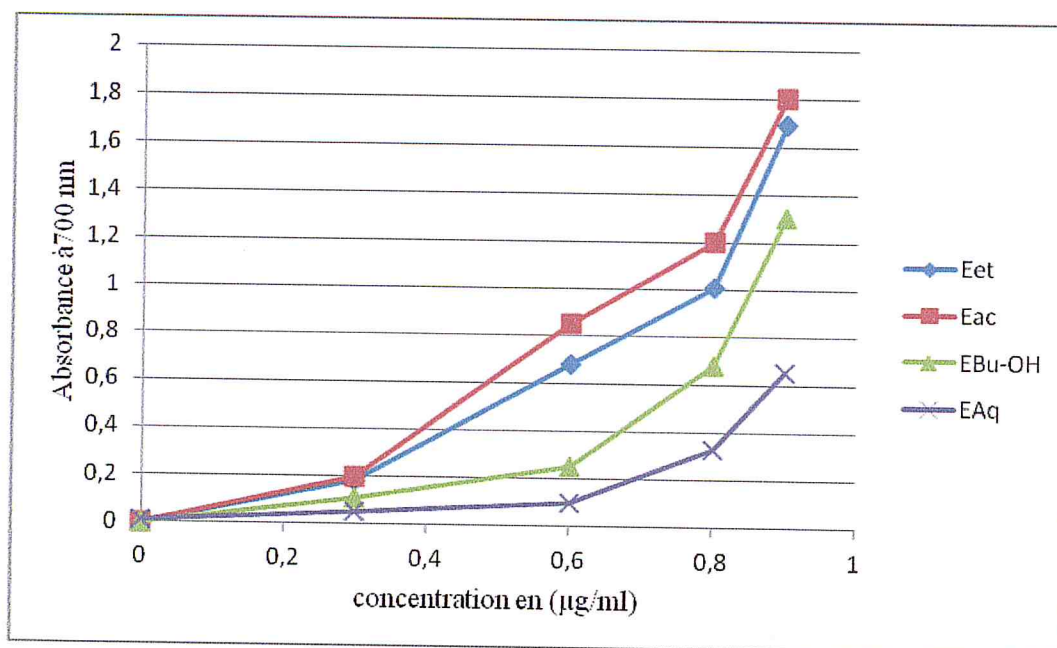


Figure 47 : pouvoirs réducteurs des quatre extraits

Tableau 32 : Variation des absorbances en fonction des différentes concentrations des standards d'antioxydants

Concentration (µg/ml)	0,2	0,5	0,7	1	1,2	1,5
acide ascorbique	0,523	2,001	2,541	2,798	2,844	2,855

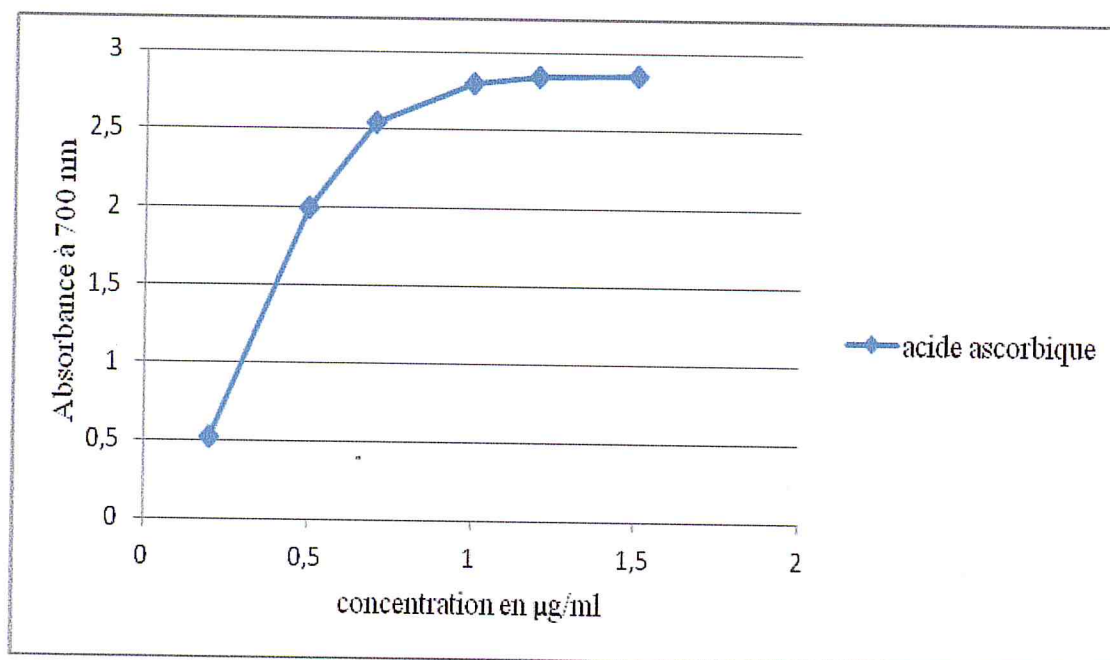


Figure 48: pouvoir réducteur de l'acide ascorbique

Les résultats obtenus montrent que les extraits d'*Nigella sativa* possède un pouvoir réducteur et ils présentent une activité antioxydante, mais qui est nettement inférieure à celle de la référence (acide ascorbique) dont la réduction est presque totale à partir d'une concentration de 0.9 mg/ml.

Il est à signaler que l'extrait acétate d'éthyle est le plus actif, il possède une bonne action vis-à-vis de Fe⁺³ présent dans la solution testée et s'avère plus puissant vis-à-vis la réduction de fer à partir d'une concentration de 5mg/ml. Ainsi, l'extrait aqueux possède une faible puissance de réduction de fer suivi de l'extrait butanolique et l'extrait éther d'ethyl. on conclure la fraction acétate d'éthyle était la plus active suivi de l'extrait éther d'ethyl ensuite la fraction n-butanolique et finalement l'extrait aqueux.

Le pouvoir réducteur des extraits *Nigella sativa* est probablement du à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants peuvent être considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants.

Conclusion

Conclusion

En raison de la tendance vers les produits naturels à cause de leurs rôles potentiels en soins de santé et comme précurseurs chimiques pour le développement. De nombreux chercheurs ont été intéressés par les composés biologiquement actifs isolés des extraits de plantes.

- Dans cette étude a été réalisée l'extraction de l'huile végétale des graines de *Nigella sativa* provenant de deux régions différentes (Algérie et Inde).
- Le rendement obtenu est de 16.64% ; 0.37% pour l'huile végétal de *Nigella sativa* Algérienne avec et sans broyage et 17.23%, 0.36% pour l'huile végétal de *Nigella sativa* Indienne respectivement.
- Une étude analytique a permis de caractériser l'huile végétale par ses indices physico-chimique. Les résultats obtenus montrent que La composition chimique de l'HV a été déterminée par l'analyse CG/MS et qui a révélé l'existence de différents composés l'huile totale des graines de *Nigella sativa* est très riche en acides gras insaturés (80,58 % de l'huile totale), dont le composé majoritaire est l'acide linoléique (54,3 %)
- Le pouvoir antioxydant de l'huile végétale déterminé par la méthode au DPPH a révélé que l'huile végétale présentait un pouvoir antioxydant relativement moyenne ; 1.391 mg/ml pour l'huile de NS Indienne et 1.200 µg/ml l'huile de NS Algérienne avec le standard acide ascorbique d'IC50 égale à 0,351 µg/ml.

Dans la deuxième partie de cette étude on a réalisé l'extraction des flavonoïdes des graines de *Nigella sativa*, le dosage et l'étude analytique de l'extrait flavonique. La raison principale pour le choix de ces substances (flavonoïdes) réside dans le fait que la majorité des effets pharmacologiques des plantes leurs sont attribués. Et finalement évaluation de l'activité antioxydante du contenu flavonique extrait par la méthode de DPPH et la méthode de réduction de fer (FRAP).

- L'extraction des flavonoïdes à partir des graines de *Nigella sativa* L. a été réalisée par macération dans un mélange hydroalcoolique (éthanol/eau) en première étape pour obtenir l'extrait brut et puis par affrontement par divers solvants organiques à polarité croissante (éther d'éthyl ; acétate d'éthyle et n-butanol). Le calcul du rendement de chaque extrait a montré le rendement le plus élevée est celui de l'extrait Aqueux.

L'estimation quantitative des polyphénols totaux des flavonoïdes totaux a montré que les teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes sont variables. Les résultats du dosage des polyphénols montrent que :

- Pour les variétés Algérienne l'extrait aqueux résiduel constitue la fraction phénolique la mieux représentée ($180.245 \pm 0.216 \mu\text{g EAG/g d'extrait}$) suivi par l'extrait acétate d'éthyle ($161.914 \pm 0,520 \mu\text{g EAG/g d'extrait}$), alors que l'extrait n-butanolique renferme ($125.001 \pm 0,453 \mu\text{g EAG/g d'extrait}$) et l'extrait de la fraction éther diéthylique ne contient que ($75.320 \pm 0,465 \mu\text{g EAG/g d'extrait}$).
- Pour les variétés Indienne l'extrait aqueux résiduel constitue la fraction phénolique la mieux représentée ($163.205 \pm 0.443 \mu\text{g EAG/g d'extrait}$) suivi par l'extrait acétate d'éthyle ($94.369 \pm 0,152 \mu\text{g EAG/g d'extrait}$), alors que l'extrait n-butanolique renferme ($87.725 \pm 0.532 \mu\text{g EAG/g d'extrait}$) et l'extrait de la fraction éther diéthylique ne contient que ($22.090 \pm 0.322 \mu\text{g EAG/g d'extrait}$).

La détermination quantitative des flavonoïdes totaux révèle que :

- Pour les graines Algérienne; L'extrait n-butanol est l'extrait le plus riche en flavonoïdes avec une teneur de ($24.338 \pm 0,219 \mu\text{g ER/g d'extrait}$), suivi par l'extrait acétate d'éthyle ($17.960 \pm 0,143 \mu\text{g ER/g d'extrait}$). Par la suite vient l'extrait aqueux avec une teneur de ($8.302 \pm 0,295 \mu\text{g ER/g d'extrait}$), suivi par l'extrait de la fraction éther diéthylique ($2.338 \pm 0,0389 \mu\text{g ER/g d'extrait}$).
- Pour les graines Indienne; L'extrait acétate d'éthyle est l'extrait le plus riche en flavonoïdes avec une teneur de ($12.534 \pm 0,229 \mu\text{g ER/g d'extrait}$), suivi par l'extrait aqueux ($9.687 \pm 0,273 \mu\text{g ER/g d'extrait}$). Par la suite vient l'extrait n-butanol et éther diéthylique avec une teneur de ($1.569 \pm 0,400 \mu\text{g ER/g d'extrait}$), ($1.050 \pm 0.362 \mu\text{g ER/g d'extrait}$) respectivement.
- D'après ce résultat on conclut que les graines des variétés algérienne sont riche en Polyphénols et on flavonoïdes par rapport a celle des variétés Indiennes.
- L'analyse qualitative des extraits de *Nigella sativa* par CCM.la révélation sous UV a permis d'avoir des bandes colorées d'où l'existence de certains composés flavoniques.
- L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode FRAP a montré que tous les extraits de ces graines ont la capacité de réduire le fer. L'extrait aqueux est le plus

actifs possédant une bonne action vis-à-vis de Fe^{+3} à partir d'une concentration de 5mg/ml.

- Ces résultats ont été confirmés par la méthode de piégeage du radical libre au DPPH et en comparant les IC50 des différents extraits testés de *Nigella sativa* L par rapport à celle de l'acide ascorbique, les résultats ont montré que les extraits EAc et EEt sont les plus actifs comme piégeurs de radical libre DPPH.
- Enfin, Ces résultats restent préliminaires, il serait donc intéressant de poursuivre des études plus approfondies sur cette graine en se focalisant sur les différents extraits et plus précisément sur l'extrait n-butanol et l'extrait aqueux, en réalisant des analyses de CCM en présence d'autres témoins.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Sorkhabi H.A., Seifzadeh D., Hosseini M.G., *Corros. Sci.* 50 (2008) 3363.
- [2] Satapathy A.K., Gunasekaran G., Sahoo S.C., Kumar Amit, Rodrigues P.V., *Corros. Sci.* 51 (2009) 2848.
- [3] Aldona Mueller-Bieniek a, Piotr Kittel b, Błażej Muzolf c, Przemysław Muzolf d .Useful plants from the site Lutomiersk–Koziówki near Łódź (central Poland) with special reference to the earliest find of *Xanthium Strumarium* L. seeds in Europe. *Journal of Archaeological Science: Reports* 3 (2015) 275–284.
- [4] P.N. Black, C.C. DiRusso, Transmembrane movement of exogenous long-chain fatty acids: proteins, enzymes, and vectorial esterification, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67 (2003) 454e472.
- [5] Mabeku LBK, Kouam J, Paul A, Etoa FX. Phytochemical screening and toxicological profile of methanolic extract of *Picralima nitida* fruit rind (Apocynaceae). *Toxicol Environ chem* 2008; 90(4): 815-828.
- [6] Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. mdicales internationales Editions Technique & Documentation, Cachan, [S.I.], 1999, p. 647-673.
- [7] Teixeira da Silva J. A. Mining the essential oils of the *Anthemideae*. *Afr. J. Biotechnol.* 2004; 3: 706-720.
- [8] Cihan TOPARSLAN « À propos de *Nigella sativa* L» thèse docteur en Pharmacie Le 25 septembre 2012.
- [9] Mohammadi zohra « Etude du pouvoire antimicrobienn et antioxydant des Huiles esntielles et flavonoides de quelques plante de la région de Tlemcen » Magistere en biologie option produits Naturels ,Activés biologique et synthese en 2005/2006.
- [10] MABBERLEY, D. (1987). *The plant-book. A portable dictionnary of the vascular plants.* New York: Cambridge University Press.
- [11] Ali BENHADDOU ANDALOUSSI « Étude des propriétés antidiabétiques de *Nigella sativa* : sites d'action cellulaires et moléculaires»Thèse d'obtention du grade de Philosophiae Doctorae (PhD) février, 2009
- [12] Fabienne Orsi-Llinares « La nigelle, une _épice d'intérêt médicinal » *Pharmaceutical sciences*.HAL2006.

[13] www.boutique-vegetale.com

[14] ZOHARY, M. (1983). *The genus Nigella (Ranunculaceae)-a taxonomic revision*. Springer-Verlag.

[15] Benkaci–Ali, F., Baaliouamer, A., Meklati, B.Y., Chemat, F. (2007) Chemical composition of seed essential oils from Algerian *Nigella sativa* extracted by microwave and hydrodistillation. *Flavour & Fragrance Journal*. 22: 148-153.

[16] https://fr.wikipedia.org/wiki/Nigelle_cultivée.

[17] www.2ememain.be/graine-nigelle-habba-sawda-al-235660940.html

[18] ATTA-UR-RAHMAN, M., HASSAN, S., COUDHARY, M., NI, C., & CLARDY, J.(1995). Nigellidine : a new indazole alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Tetrahedron letters* (36), pp. 1993-1996.

[19] Rym Akloul, Farid Benkaci-Ali, Meriem Zerrouki, Gauthier Eppe «Composition and biological activities of the essential oil of *Nigella sativa seeds* isolated by accelerated microwave steam distillation with cryogenic grinding » *American Journal of Essential Oils and Natural Products* ;2014.

[20] MEZITI ASMA « Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa L* » thèse de Magister EN BIOCHIMIE APPLIQUÉE Option: Molécules Bioactives 2008-2009.

[21] KHITHER Hanane « Etude des effets des huiles polaires et apolaires des graines de *Nigella sativa L*. sur l'activité de l'élastase: Application à la maladie pulmonaire obstructive chronique et à l'emphysème pulmonaire » thèse de Magister 2010-2011.

[22] ATTA-UR-RAHMAN ; SOHAIL M.S. ; SADIQ H. ; CHOUDARY M.I. ; CHAO-ZHOU N. ; CLARDY J. Nigellidine – a new indazole alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Tetrahedron Lett*. 1995 : 36 1993-6.

[23] Ramadan, M.F., Mörsel, J.T. (2002a) Characterization of phospholipid composition of black cumin (*Nigella sativa L.*) seed oil. *Nahrung Food*. 46: 240-244.

[24] Ramadan, M. F., Mörsel, J.T. (2003) Analysis of glycolipids from black cumin (*Nigella sativa L.*), coriander (*Coriandrum sativum L.*) and niger (*Guizotia abyssinica Cass.*) oil seeds. *Food Chemistry*. 80: 197-204.

- [25] Mohamed F. Ramadan · Jörg-Thomas Mörsel (2002) Neutral lipid classes of black cumin (*Nigella sativa* L.) seed oils. *Eur Food Res Technol* (2002) 214:202–206.
- [26] Cheikh-Rouhou, S., Besbes, S., Hentati, B., Blecker C., Deroanne C., Attia, H. (2007) *Nigella sativa* L. chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction. *Food Chemistry*. 101: 673-681.
- [27] Cheikh-Rouhou, S., Besbes, S., Lognay, G., Blecker, C., Deroanne, C., Attia, H. (2008) Sterol composition of black cumin (*Nigella sativa* L.) and Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) seed oil.
- [28] Nickavar, B., Mojaba, F., Javidniab, K., Amolia, M. A. R. (2003). Chemical Composition of the Fixed and Volatile Oils of *Nigella sativa* L. from Iran. *Journal of Biosciences*, 58: 629-631.
- [29] Atta, M. B. (2003). Some characteristics of nigella (*Nigella sativa* L.) seed cultivated in Egypt and its lipid profile. *Food Chemistry*, 83: 63–68.
- [30] Houghton, PJ., Zarka, R., de las Heras, B. Hoult JR. (1995). Fixed oil of *Nigella sativa* and eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation derived thymoquinone inhibit. *Planta Med*, 61, pp. 33-36.
- [31] Burits, M., Bucar, F. (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*, 14: 323-328.
- [32] Benkaci–Ali, F., Baaliouamer, A., Meklati, B. Y., Chemat, F. (2007). Chemical composition of seed essential oils from Algerian *Nigella sativa* extracted by microwave and hydrodistillation. *Flavour and fragrance journal*, 22: 148–153.
- [33] Salas J. J., Bootello M. A., Martinez-Force E., Garces R., “Tropical vegetable fats and butters: properties and new alternatives”, *OCL*, 2009, 16, 254-258.
- [34] ATTA-UR-RAHMAN, M., HASSAN, S., COUDHARY, M., NI, C., & CLARDY, J. (1995). Nigellidine : a new indazole alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Tetrahedron letters* (36), pp. 1993-1996.
- [35] TASKIN, M., ALANKUS-CALISKAN, O., ANIL, H., ABOU-GAZAR, H., AKHAN, I., & BEDIR, E. (2005). Triterpène saponins from *Nigella sativa* L. *Turkish J Chem* (29), 561-569.

- [36] ANSARI, A., OSMAN, S., & SUBBARAM, R. (1975). Component acids of minor seed oils. *J Oil Technol Assoc India* (7), 26-27.
- [37] KUMARA S.S.M. ; HUAT B.T.K.Extraction, isolation and characterization of antitumor principle, α -hederin, from the seeds of *Nigella sativa*. *Planta Med.* 2001 : 67 29-32.
- [38] MERFORT, I., WRAY, V., BARAKAT, H., HUSSEIN, S., NAWWAR, M., & WILLUHN, G. (1997). Flavonoid triglycerides from seeds of *Nigella sativa*. *Phytochemistry* (46), pp. 359-363.
- [39] BOURGOU, S., KSOURI, R., BELLILA, A., SKANDRANI, I., FALLEH, H., & MARZOUK, B. (2008). Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *C. R. Biologies* (331), 48-55.
- [40] Gilani, A. H., Jabeen, Q., Khan, M. A. U. (2004). A review of medicinal uses and pharmacological activities of *Nigella sativa*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7: 441-451.
- [41] Ghedira, K. (2006). La nigelle cultivée: *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae). *Phytothérapie*, 4: 1-7.
- [42] Nergiz and Ötles, 1993 C. Nergiz, S. Ötles Chemical composition of *Nigella sativa* L. seeds *Food Chem.*, 48 (1993), pp. 259–261.
- [43] AL-SALEH, I., BILLEDO, G., & EL-DOUSH, I. (2006). Levels of selenium, DL- α -tocopherol, DL- γ -tocopherol, all-trans-retinol, thymoquinone and thymol in different brands of *Nigella sativa* seeds. *J Food Comp Analysis* (19), 167-175.
- [44] Said Gharby et al « Chemical investigation of *Nigella sativa* L. seed oil produced in Morocco » *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. Received 12 October 2013; accepted 4 December 2013.
- [45] Mustafa Kiralana, « Physicochemical properties and stability of black cumín (*Nigella sativa*) seed oil as affected by different extraction methods » *journal of Industrial Crops and Products*. Accepted 19 March 2014.
- [46] Hanene Jrah Harzallah « Chemical composition, antimicrobial potential against cariogenic bacteria and cytotoxic activity of Tunisian *Nigella sativa* essential oil and thymoquinone » *journal of Food Chemistry*. 129 (2011) 1469–1474.

- [47] AGGARWAL, B. B., & KUNNUMAKKARA, A. B. (2009). *Molecular Targets and Therapeutic Uses of Spices, Modern Uses for Ancient Medicine*. Singapore: World Scientific Publishing.
- [48] AKHTAR, M., & ASLAM, M. (1997). Anticestodal principles of *Nigella sativa* Linn. (Kolanji) seeds. *Pak J Pharmacol*, 14 (2), pp. 7-14.
- [49] Selmi S. et Sadok S. 2008. The effect of natural antioxidant (Thymus vulgaris Linnaeus) on flesh quality of tuna (Thunnus Linnaeus) during chilled storage. *Pan-American Journal of aquatic sciences*, 3 (1) : 36-45.
- [50] Montero de Espinosa L., Meier A.R.M., *Eur. Polym. J.*, 2011,47, 837–852
- [51] Nassima Kemache « Hydrogénation des huiles végétales en présence de catalyseurs bimétalliques à base de Pd et monométalliques à base de Pd dopé au soufre et supportés sur une silice mésoporeuse » mémoire doctorat Université Laval Québec en 2010.
- [52] Cuvelier C., Cabaraux J.-F., Dufrasne I., Hornick J.-L., Istasse L. « Acides gras : nomenclature et sources alimentaires » *Ann. Méd. Vét.*, 2004, 148, 133-140.
- [53] Spécification technique n° E4-05 du 31 mars 2005 relative aux huiles végétales alimentaires.
- [54] Didier B « huiles et fractions insaponifiables de huit espèces de palmiers amazoniens » mémoire doctorat en sciences des agroressources l'institut national polytechnique de toulouse ,2001p 51.
- [55] cédrick E « nouveaux agrotensioactifs glycolipidiques: synthèse, propriétés physico-chimiques et application en polymérisation » mémoire doctorat en chimie , l'institut national des sciences appliquées de Lyon , 2011.
- [56] Bouthaina ben Amor « Maîtrise de l'aptitude technique de la matière végétale dans les opérations d'extraction principes actifs : texturation par détente instantanée contrôlée » mémoire doctorat en génie des procédés industriels, 2008.
- [57] Leybros, J. and P. Frémeaux (1990). "Extraction solide-liquide aspects théoriques." *techniques de l'ingénieur, traité Génie des procédés J1 077 06*.
- [58] Groubert, A. (1984). *techniques d'extraction végétale*. Montpellier, pharmacie.
- [59] Gerin, M. (2002). *Solvants industriels : Santé, Sécurité, Substitution*. . Paris, Ed. Masson.
- [60] Dibert, K. (1989). *contribution à l'étude de l'extraction solide-liquide de l'huile et de l'acide chlorogénique du café vert*. LYON, Claude Bernard LYON I.

- [61] Richter G. Métabolisme des végétaux. Physiologie et Biochimie. Ed. Presses Polytechniques et Universitaire Romandes, 1993, 322-323.
- [62] Milane, H., (2004) La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat. Strasbourg.
- [63] Dacosta, E. (2003) Les phytonutriments bioactifs. Yves Dacosta (Ed). Paris, 317p.
- [64] Dangles O, Stoeckel C, Wigand MC, Brouillard R. Two very distinct types of anthocyanin complexation: Copigmentation and inclusion. Tetrahedron Lett. 1992, 33: 5227-30.
- [65] Hagerman AE, Riedl KM, Jones GA, Sovik KN, Ritchard NT, Hartzfeld PW, Richel TL. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. J. Agric. Food Chem. 1998, 46: 1887-92.
- [66] Haslam E. Natural polyphenols (vegetable tannins): Gallic Acid metabolism. Nat. Prod. 1994, 11: 41-66.
- [67] Bruneton J. Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales. 4^e Ed. Éditions médicales internationales (Tec & Doc), Paris, 2009, 1288
- [68] Heller W, Forkmann G. The flavonoids. Advances in research since 1986. In Harborne JB. Secondary Plant Products. Encyclopedia of plant physiology. Ed. Chapman & Hall, London, 1993, 399-425.
- [69] Jakupovic J, Paredes L, Bohlmann F, Watson L. Prenyl flavanes from *Marshallia* species. Phytochem. 1988, 27 (10): 3273-5.
- [70] Sarni-Manchado P, Cheynier V. Les polyphénols en agroalimentaire, Ed. Lavoisier (Tec & Doc), Paris, 2006, 300-398.
- [71] Dewick PM. The biosynthesis of shikimate metabolites. Nat. Prod. Rep. 1995, 12: 579-607.
- [72] Fiorucci S., 2006. Activités biologiques de composés de la famille de flavonoïdes : approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse de doctorat. Nice, 211p.
- [73] Ghestem A., Seguin E., Paris M., Orecchioni A.M., 2001. Le préparateur en pharmacie. Dossier 2, Botanique-Pharmacognosie-Phytothérapie-homeopathie. Tec et Doc (Ed), 272p.
- [74] Morreel K, Goeminne G, Storme V, Sterck L, Ralph J, Coppieters W, Breyne P, Steenackers M, Georges M, Messens E, Boerjan W. Genetical metabolomics of flavonoid biosynthesis in *Populus*: a case study. Plant J. 2006, 47: 224-37.

- [75] Ono E, Hatayama M, Isono Y, Sato T, Watanabe R, Yonekura-Sakakibara K, Fukuchi-Mizutani M, Tanaka Y, Kusumi T, Nishino T, Nakayama T. Localization of a flavonoid biosynthetic polyphenol oxidase in vacuoles. *Plant J.* 2006, 45: 133-43.
- [76] Bruneton J. Les tanins. Ed. Editions médicales internationales, Paris, 1999, 369-404.
- [77] Cowan M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews.*, 12 (4) : 564-570.
- [78] YAKHLEF Ghania « étude de l'activité biologique des extraits de feuilles de *thymus vulgaris* L. et *laurus nobilis* L. » mémoire de magister en biochimie appliquée université el hadj lakhdar –Batna– en 2010.
- [79] Pincemail J., Meurisse M., Imet R. L. et Defraigne J. O. 1999. Espèces oxygénées activées, antioxydants et cancer. *vaisseaux, coeur, poumons.*,
- [80] Hertog M. G. 1996. Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids. *Proceeding of the nutrition society.*, 55 (1B) : 385-397.
- [81] Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L. et Zhang L. 2003. Flavonoids : Promising anticancer agents. *Medicinal research reviews.*, 23 (4) : 519-539.
- [82] González-Gallego J., Sánchez-Campos S. et Tuñón M. J. 2007. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutrición hospitalaria*, 22 (3) : 287-293.
- [83] Kim H. P., Son K. H., Chang H. W. et Kang S. S. 2004. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences.*, 96 (3) : 229-245.
- [84] Tapas A. R., Sakarkar D. M. et Kakde R. B. 2008. Flavonoids as nutraceuticals. *Topical journal of pharmaceutical research.*, 7 (3) : 1089-1099.
- [85] Rachel poirot « Methodologie pour le passage en continu d'extraction de soluté A partie de matière végétale » génie des procédés et Environnement, 2007.
- [86] M.Barriada-pereira et all « Microwave-assisted extraction versus Soxhlet extraction in the analysis of 25 organochlorine pesticides in plants » *journal of chromatography A* ;1008 (2003) 115-122
- [87] Martínez-Cayuela M., 1995. Oxygen free radicals and human disease. *Biochem*, 77: 147-161.
- [88] AOCS Official Method Ce 2-66 (1989). Sampling and analysis of commercial fats and oils, Preparation of Methyl esters of long-chain fatty acids, *American Oil Chemists' Society*, Champaign, IL, 1989.].
- [89] Merghem R., " Etude du Polymorphisme génétique à l'aide de marqueurs biochimique chez une plante d'intérêt économique Thymus ", These de Magister , Institut de Biologie,(1985).

- [90] [Wong, C.C., Li H.B., Cheng, K.W., Chen, F. (2006) A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chem.* 97: 705-711.
- [91] Daels rakotoarison D. (1999). Extraits phénoliques d'aubépine, de cola et d'églantier. Thèse de doctorat, université de Lille-II, France.
- [92] H.Talbi, A. Boumaza, K. El-mostafa, J. Talbi, A. Hilali ; « Evaluation de de l'activité antioxydant et la composition physico-chimie des extraits méthanolique et aqueuse de la *Nigella sativa* » *Mater. Environ. Sci.* 6 (4) (2015) 1111-1117.
- [93] Markham, K.R (1982) Techniques of flavoide identification Academic press. » London, ,Chap. 1 and 2: 1-113p.
- [94] A.pettcoline Nucléaire « Développement d'une méthode rapide de chromatographie sur couche mince pour le contrôle qualité de ^{99m}Tc-HMPAO en routine » *Médecine Nucléaire*, volume 37, Issue 5, May 2013, page 171.
- [95] Wu, H. (2007) « Isolation and caractérisation of natural productions from *Immer* and *Allium ursium* proquest edition p 28.
- [96] [Sanchez –Moreno. C « Methods used to evaluate the free radical systems ; *International of Food science and Technology* 2002 p 121-137.
- [97] Oyaizu, M (1986) studies on productions of browning reaction prepared from glucosamin *Japanese journal of Nutrition* 44, 307-315.
- [98] Pharmacopée européenne, Direction de la qualité du médicament, Ed Council of Europe, p2623, 2002.
- [99] NDIAVII, S Etude des corps gras utilisés au Sénégal: les huiles végétales Rev. Bibliographique, ENDA Tiers Monde Dakar, SYSPRO, 1991, 37p.
- [100] Benhammou, N. Bekkara, F. Anovska, T.K « Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts » *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* Vol. 2(2). 2008 ,pp. 22-28.
- [101] Chan K. W, Iqbal .Sh, Nicholas M. H. Khong and Abdul Salam .B « Preparation of deodorized antioxidant rich extracts from 15 selected spices through optimized aqueous extraction » *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 5(25), 2011 ,pp. 6067-6075.
- [102] Madi .A, « caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques » .Mémoire de Magistère ,2009, pp 54-55
- [103] Kanoun .K « Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L. (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaïne) » Mémoire de Magister en biologie, 2011.

[104] Boudiaf, K. (2006) Etude des effets anti-xanthine oxydoréductase et anti-radicalaires des extraits des graines de *Nigella sativa*. Thèse de magistère. Département de biologie. Université Ferhat abbas. (Sétif) Algérie.

Annexe

Annexe 1 :

1. Mesure des indices physiques

1.2. Détermination de la densité

La densité est définie comme étant la masse volumique de l'extrait rapportée à celle de l'eau pour une température donnée. La mesure a été faite à l'aide d'un pycnomètre (figure 08) en utilisant la méthode de dilution, par la formule :



Figure : Pycnomètre

$$D = \frac{m_2}{m_1[1 + \alpha(t - 20^\circ C)]}$$

Avec :

m_2 = masse en grammes de l'huile ou de la matière grasse utilisée pour l'examen .

m_1 = masse en grammes de l'eau utilisée dans le test d'étalonnage.

Coefficient de dilatation cubique du verre à la température donnée.

$\alpha = 0.000\ 03$ pour le verre à la soude.

$\alpha = 0.000\ 01$ pour le verre au borosilicate.

1.3. Détermination de l'indice de réfraction : (Norme NF T 75-112)

C'est le rapport entre le sinus des angles d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'HE maintenue à une température constante.

On mesure l'indice de réfraction à l'aide d'un réfractomètre (figure 12) à la température ambiante puis ramenés à 20°C par la formule :

$$I_{20} = I_t + 0,00045 (T - 20^\circ C)$$

I_{20} : indice à 20°C.

I_t : indice à la température ambiante ou de mesure.

T : Température ambiante ou de mesure.



Figure : Réfractomètre

2. Mesure des indices chimiques

2.1. Indice d'acide

C'est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1g d'huile végétale. Il est déterminé par la formule suivante :

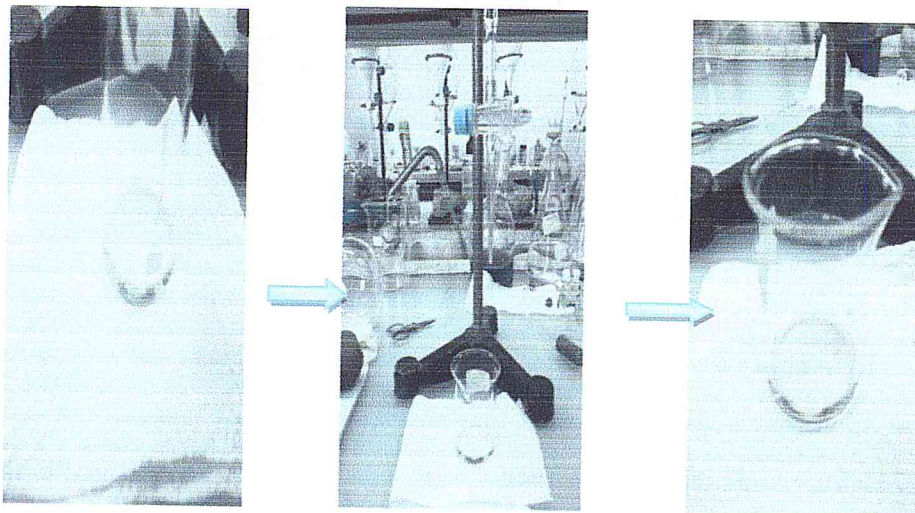
$$IA = \frac{5,61 * V}{m}$$

IA : indice d'acide.

V : volume, en millilitres, de la solution d'hydroxyde de potassium utilisée.

m : masse, en grammes, de la prise d'essai.

La figure suivante représente les différentes étapes de la détermination d'indice d'acide



2.2. Indice de saponification :

C'est correspond à la masse de d'hydroxyde de potassium en milligrammes nécessaire pour saponifier les esters d'acides gras et neutraliser les acides gras non estérifiés dans un gramme de matière grasse/corps gras. La quantité de potasse KOH utilisée varie avec la masse molaire des acides gras. Plus la masse molaire est élevée, plus l'indice de saponification est faible : l'indice de saponification est donc une mesure indirecte de la masse molaire des acides gras.

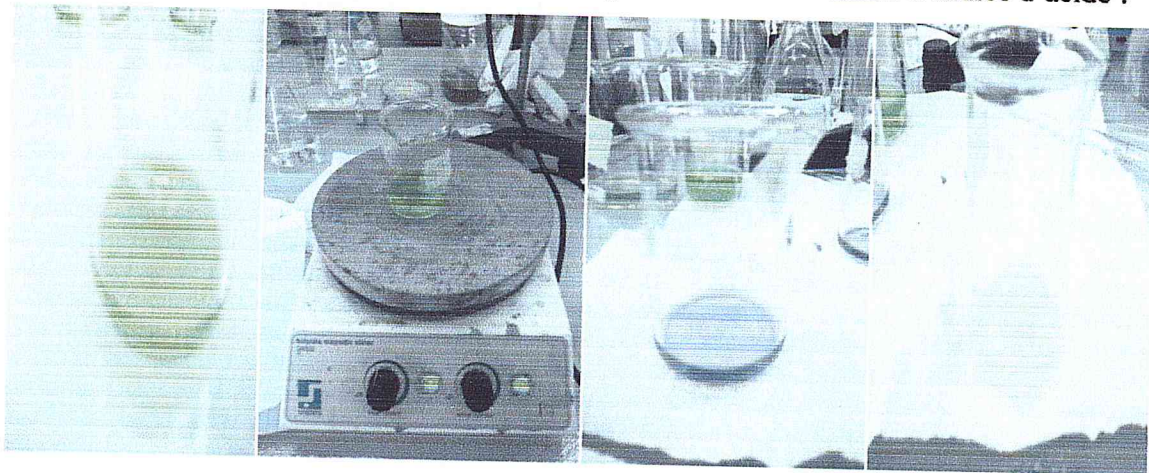
Il est déterminé par la formule suivante :

$$IS = \frac{(V_T - V_E) \times C_{HCl} \times M_{KOH}}{m}$$

Avec :

- IS : Indice de saponification
- V_T : Volume versé au témoin en l
- V_E : Volume de l'essai en l
- C_{HCl} : concentration de la solution d'acide chlorhydrique en mol/l
- M_{KOH} : masse molaire du KOH en g/mol
- m : masse d'huile exactement pesée en g

La figure suivante représente les différentes étapes de la détermination d'indice d'acide :



2.3. L'indice de peroxyde :

L'indice de peroxyde est le nombre de microgrammes d'oxygène actif pour un gramme de matière grasse. Il permet d'apprécier le degré d'oxydation d'une huile. Cet indice permet de

suivre l'état de conservation d'une huile ou état d'avancement de l'oxydation. Lorsqu'une huile n'est pas soumise à de bonnes conditions de conservation ou à un bon traitement, sa qualité peut se détériorer de diverses manières, mais le plus souvent par hydrolyse ou par oxydation. Elle devient ainsi impropre à la consommation. L'indice de peroxyde en milliéquivalent d'O₂/kg est calculé selon l'équation :

$$I_p = \frac{(V - V_0) \times N}{m} \times 1000$$

Avec :

V : est le volume de thiosulfate de Na de l'échantillon

V_0 : est le volume requis pour titrer le blanc

N : normalité de la solution de thiosulfate de sodium.

m : est la prise d'essai en grammes.

