



N° d'ordre : Doc/ /2019

THÈSE

PRÉSENTÉE A

L'UNIVERSITE KASDI MERBAH- OUARGLA

FACULTE DES MATHÉMATIQUES ET SCIENCES DE LA MATIÈRE

DÉPARTEMENT DE CHIMIE

POUR OBTENIR LE DIPLÔME DE

DOCTEUR EN SCIENCES

SPÉCIALITÉ: Chimie

OPTION : Chimie organique

PAR :

Omar MECHEROUI

**Etude phytochimique et activité biologique des
huiles fixes de la plante *Nigella sativa* L.**

Soutenu publiquement le : 22/09/2019

Devant le jury composé de :

Lakhdar Sekhri	Professeur	Université Kasdi Merbah-ouargla	Président
Segni Ladjel	professeur	Université Kasdi Merbah-ouargla	Directeur de thèse
Ouanissa Smara	MCA	Université Kasdi Merbah-ouargla	Examineur
Nouredine Gherraf	Professeur	Larbi ben M'hidi Oum El-Bouaghi	Examineur
Abdelkrim REBIAI	MCA	Université Hama Lakhdar - el oued	Examineur
Mouna Mehani	MCA	Université de Ghardaïa	Examineur

Année universitaire: 2019/2020

العنوان: دراسة فيتوكيميائية والنشاط البيولوجي للزيوت الثابتة لنبته حبة البركة (*Nigella sativa L.*).

الملخص

حبة البركة (*Nigella sativa L.*) هي نبتة طبية شائعة الاستعمال في الطب العربي الإسلامي وخصوصا خلال عهد النبي محمد "صلى الله عليه وسلم حيث قال «حبة البركة دواء لكل داء إلا الموت»، وظلت هذه الكلمات لفترة طويلة لغزا محيرا للعلم حتى ظهور التقنيات الحديثة التي نجحت في إثبات الخصائص العلاجية لحبوب هذه النبتة. ان هذا العمل يندرج في هذا الصياغ فقد قمنا بدراسة الزيوت الثابتة والمستخلصات الفينولية للبذور حيث حاولنا تحديد مكوناتها الكيميائية باستعمال طرق التحليل الضوئية والكرماتوغرافيا إضافة إلى تقييم فعاليتها ضد الأكسدة و ضد الجراثيم.

أظهرت نتائج التحليل الى ان بذور حبة البركة غنية نسبييا بالدهون (15%) وأن الأحماض الدهنية السائدة هي: حمض البالمتيك 0: C16 (17.2%) وحمض اللينولييك 2: C18 (58.85%). أما عن التوكوفروولات فلقد اظهرت تحاليل CLHP وجود أربع مركبات منها ثلاث توكوفروولات ومركب واحد عبارة عن توكوترينيونول. كما لاحظنا ان γ -توكوفروول هو المركب السائد (0.0316 ± 1.989 غ/كغ زيت ثابت) و فيما يخص المستخلصات الفينولية فلقد اظهرت نتائج التحليل الكمي و النوعي ب CLHP وجود ثلاثة احماض فنولية (حمض الغاليك, حمض الفانيليك وحمض الكوماريك) وخمس فلافونيدات (الابجنيين, النارينجيين, الروتين, الكرسيتين و الكمفيرول) وذلك بكميات متفاوتة حسب المذيب المستعمل حيث سجلت اعلى كمية للكسب عند استعمال المذيب (ميثانول / ماء (3/7 : حجم/حجم) .

ولقد أوضحت نتائج تقييم مستخلصات بذور حبة البركة (الزيوت الثابتة، مستخلص الميثانولي والمستخلص الاستوني للكسب) كمضادات أكسدة طبيعية باستخدام طريقتين كيميائيتين طريقة DPPH وطريقة تبييض β -كاروتين ان تأثير الزيت الثابت يزداد بزيادة التركيزات المستخدمة منه وكان تأثيره اقوى من المستخلص الكحولي والاستوني للكسب حيث كان نشاطهم يزداد بمعدلات بطيئة نسبييا بزيادة التركيز. كما تظهر المستخلصات فعالية متوسطة ضد البكتيريا والفطريات.

الهدف الثاني من هذا العمل هو دراسة تأثير التحميص على التركيبية الكيميائية للزيوت الثابتة ونشاطها البيولوجي، كشفت النتائج التي تم الحصول عليها أن التحميص أدى إلى زيادة كمية المركبات الفينولية في الزيت، في حين أن محتوى توكوفيرولات قد انخفض وان القدرة المضادة للأكسدة لزيت حبة البركة تزداد بالتحميص.

الكلمات المفتاحية: *Nigella sativa L.*، الزيوت الثابتة، البولفينولات، توكوفيرولات، التحميص، النشاط البيولوجي

Titre: Etude phytochimique et activité biologique des huiles fixes de la plante *Nigella sativa* L.

Résumé

Nigella sativa est une plante recommandée dans la thérapie arabo-musulmane et spécialement durant l'époque du prophète Mohamed «La paix de Dieu soit sur lui». « *habat El-baraka est un médicament pour toutes les maladies sauf la mort* », ces paroles sont restées pour longtemps un mystère pour la science jusqu'à l'arrivée des techniques modernes qui ont réussi à prouver les vertus thérapeutiques des grains de cette plante. Ce travail s'inscrit dans ce cadre, nous avons étudié les huiles fixes et les extraits phénoliques des graines en déterminant leurs compositions chimiques à l'aide des méthodes d'analyse colorimétriques et chromatographiques et nous avons évalué leur activité antioxydante et antimicrobienne.

Les résultats des analyses ont montré que les graines de *Nigella sativa* L. sont relativement riches en graisses (15%) et que les acides gras dominants sont : l'acide palmitique C16 : 0 (17,2%) et l'acide linoléique C18: 2 (58,85%). En ce qui concerne les tocophérols, les analyses par CLHP ont montré la présence de quatre composés, dont trois tocophérols et un tocotrienol. Nous avons également enregistré, que le γ -tocophérol était le composé prédominant (98 1,9989 0,0316 g / kg d'huile fixe). L'analyse quantitative et qualitative par CLHP des composés phénoliques dans les extraits étudiés, a révélé la présence de trois acides phénoliques (acide Gallique, acide Vanillique et l'acide Comarique) et cinq flavonoïdes (Apigénine, Naringinine, Rutine, Quercitrine et Kamférol), en quantités différentes selon le solvant utilisé. La plus grande quantité a été enregistrée dans les tourteaux lors de l'utilisation du solvant (méthanol / eau (7/3: volume / volume)).

L'évaluation du pouvoir antioxydant des extraits phénoliques et de l'huile fixe a été réalisée à l'aide de deux tests chimiques : le test DPPH et le test de blanchiment du β -carotène. L'huile fixe a montré une bonne tendance à piéger les radicaux libres et de diminuer la vitesse de la réaction de blanchiment du β -carotène. En outre, Les extraits montrent également une efficacité modérée contre les bactéries et les champignons.

Le deuxième objectif de ce travail est d'étudier l'effet de rôtissage sur la composition chimique des huiles et leur activité biologique. Les résultats obtenus ont révélé que la torréfaction augmente la quantité des composés phénoliques dans l'huile, tandis que la teneur en tocophérols diminue et la capacité antioxydante de l'huile de *Nigella sativa* L. augmente par la torréfaction.

Mots clés : *Nigella sativa* L., les huiles fixes, les polyphénols, tocophérol, rôtissage, activité biologique.

Title : Phytochemical study and biological activity of the fixed oils of the plant *Nigella sativa* L.

Abstract

Nigella sativa is a plant recommended in Arab-Muslim therapy especially during the time of the Prophet Mohammad "peace of God be upon him". "*habat El-baraka* is a medicine for all diseases except death", These words remained for a long time a mystery for science until the arrival of modern techniques that managed to prove the therapeutic virtues of the grains of this plant. This work is part of this framework. We have studied fixed oils and phenolic extracts of seeds by determining their chemical compositions, using colorimetric and chromatographic analysis methods and we have evaluated their antioxidant and antimicrobial activity.

The results of the analyses showed that *Nigella sativa* L. seeds are relatively high in fat (15%) and that the dominant fatty acids are: C16 palmitic acid: 0 (17.2%) and C18 linoleic acid: 2 (58.85%). With regard to tocopherols, HPLC analyses showed the presence of four compounds, including three tocopherols and one tocotrienol. We also recorded that γ -tocopherol was the predominant compound (98 1.9989 0.0316 g / kg of fixed oil). The quantitative and qualitative analysis by HPLC of phenolic compounds in the extracts studied revealed the presence of three phenolic acids (Galic acid, Vanilla acid and Comaric acid) and five flavonoids (Apigenin, Naringinin, Rutin, Quercitrine and Kamferol), in different quantities depending on the solvent used. The largest quantity was recorded in cakes when using the solvent (methanol / water (7/3: volume / volume)).

The antioxidant capacity of phenolic extracts and fixed oil was evaluated using two chemical tests : the DPPH test and the bleaching test of β -carotene. Fixed oil showed a good tendency to trap free radicals and slow the rate of bleaching reaction of β -carotene. In addition, the extracts also show moderate efficacy against bacteria and fungi.

The second objective of this work is to study the roasting effect on the chemical composition of oils and their biological activity. The results showed that roasting increased the amount of phenolic compounds in oil, while the tocopherol content decreased and the antioxidant capacity of *Nigella sativa* L. oil increased by roasting.

Key words: *Nigella sativa* L., fixed oil, polyphenol, tocopherol, roasting, biological activity.

Je dédié ce modeste travail.

A la mémoire de mon père, ma mère et ma grande sœur

A mon épouse qui m'a toujours encouragé.

A mes enfants Aiman, Saadedin, Khadidja et la petite Yasmine.

A mes frères et sœurs

A mes amis

REMERCIEMENT

Dans cet avant-propos, je souhaite en premier lieu exprimer ma reconnaissance envers les personnes et organismes qui ont participé au bon déroulement et à la valorisation de cette thèse de doctorat. Ces travaux ont été réalisés au laboratoire de génie des procédés de l'université Kasdi Merbah d'Ouargla, sous la direction du directeur de laboratoire le professeur Ladjel Segni. J'ai beaucoup appris, je le remercie du fond du cœur pour toute l'aide et le soutien qu'il m'a apportés du début jusqu'à la fin de ma thèse, pour la confiance et la liberté qu'il m'a accordés durant tout ce travail, pour ses conseils et pour toutes les heures qu'il a consacrées afin de diriger cette recherche de manière perfectionnée et minutieuse.

Je remercie Mr.Lakhdar Sekhri professeur à l'Université Kasdi Merbah d'Ouargla qui m'a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Mes remerciements vont également à Mme Ouanissa Smara Maître de conférences à l'Université Kasdi Merbah d'Ouargla pour l'effort consenti à juger mon travail. Je suis reconnaissant à Mr.Noureddine Gherraf professeur à l'Université Larbi ben M'hidi d'Oum El-Bouaghi, Mr.Abelkrim Rebiai Maître de conférences à l'Université Hamma Lakhdar d'el- Oued et Mme. Mouna Mehani Maître de conférences à l'Université de Ghardaïa d'avoir bien voulu se déplacer pour participer au jury de soutenance.

J'ai largement profité de mon séjour au laboratoire des substances naturelles à l'Université Gafsa (Tunisie) grâce au docteur Younse Moussaoui qui était mon superviseur. Je dois le remercier pour m'avoir facilité l'accès au matériel disponible et de m'avoir permis de profiter de sa riche expérience.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Mr Gokhan Durmaz, enseignant chercheurs à l'Université de Inonu Malatya (Turkie) pour l'aide qu'il m'a apporté pour faire des analyses sur CLHP.

J'adresse également mes sincères remerciements à mes amis intimes les enseignants Mohamed Lakhdar Belfar et Said Nedjimi pour leurs aides et leurs encouragements.

Mes remerciements tout particulièrement à Mr Taouti Mohamed chef de département et Mr Mahmoud Echaref adjoint du chef de département de génie des procédés Université de Laghouat, pour l'aide qu'ils m'ont apportée à chaque fois que j'en avais besoin.

Je clos enfin ces remerciements en témoignant ma gratitude toute particulière à l'égard de toute ma famille, qui m'a soutenu continuellement tout au long de ces années de travail.

Sommaire

Sommaire

Remercîment

Dédicace

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction générale 1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1	Présentation de la plante	5
I.1.1	<i>Nigella sativa</i> L. et l'histoire de son usage traditionnel	5
I.1.2.	Systematique	7
I.1.3.	Les différentes espèces	7
I.1.4.	Description botanique de <i>Nigella sativa</i> L.	9
I.1.5	.Composition chimique de la plante	10
I.1.5.1	.Composés aromatiques	11
I.1.5.2.	Saponosides	11
I.1.5.3.	Polyphénols et flavonoïdes	13
I.1.5.4.	Tanins	14
I.1.5.5.	Alcaloïdes	14
I.1.5.6.	Les Protéines	15
I.1.5.7.	Les Vitamines et Sels Minéraux	15
I.1.5.8.	Lipides et Stérols	15
I.1.5.9.	Huile essentielle	16
I.1.6.	Propriétés pharmacologiques des graines de <i>Nigella sativa</i> L.	16
I.1.7.	Activité antioxydante	16
I.1.8.	Activité antimicrobienne	17
I.1.9.	Effets anti-inflammatoire et analgésique	17
I.1.10.	Effets anticancéreux et antimutagène	18
I.1.11.	Effets sur le système immunitaire	18
I.2.	Les Lipides	19
I.2.1.	Introduction	19
I.2.2.	Classification des lipides	20

I.2.2.1.Lipides Saponifiables	20
I.2.2.1.1.Acides gras	20
I.2.2.2.Les lipides simples	21
I.2.2.3.Les lipides complexes	22
I.2.3.Lipides Insaponifiables (Polyisopréniques)	22
I.2.3.1.Tocophérols	22
I.2.3.2.Les stérols	24
I.3.Propriétés Physico-Chimique des Lipides	24
I.3.1.Propriétés Physiques	24
I.3.1.1.Point de Fusion	24
I.3.1.2.Solubilité	25
I.3.2.Propriétés chimiques	25
I.4.Les polyphénols	25
I.4.1.Généralités	25
I.4.2.Principales Classes des Composés Phénoliques	27
I.4.2.1.Les Acides Phénoliques Simples	27
I.4.2.1.1.Acides Hydroxybenzoïques	27
I.4.2.1.2.Acides Hydroxycinnamiques	27
I.4.2.1.3.Coumarines	28
I.4.3.Les Flavonoïdes	28
I.4.3.1.Généralités	28
I.4.3.2.Structure	29
I.4.3.3.Classification	29
I.5.Activité Antioxydante	31
I.5.1.Classification des Antioxydants	31
I.5.1.1.Antioxydants de Synthèse	31
I.5.1.2.Substances Synergiques	31
I.5.1.3.Antioxydants D'origine Végétale	32
I.6.Torréfaction des noix et graines	32

Chapitre II : Matériels et Méthodes

II. Matériels et Méthodes	35
II.1.Matériels	35
II.1.1.Produits chimiques	35
II.1.2.Microorganismes	35

II.1.3. Matériel végétal	35
II.2. Méthodes	36
II.2.1. Extraction et analyse des huiles fixes	36
II.2.1.1. Extraction des huiles fixes	36
II.2.1.2. Détermination des indices physicochimiques	36
II.2.1.3. Préparation et analyse des EMAGs dans l'huile fixe	39
II.2.1.4. Dosage des Stérols par UV-visible	39
II.2.1.5. Analyse des Tocophérols	40
II.2.1.5.1. Dosage spectrophotométrique des tocophérols	40
II.2.1.5.2. Dosage des tocophérols par CLHP	40
II.2.2. Extraction et dosage des polyphénols	41
II.2.2.1. Extraction des polyphénols de l'huile fixe	41
II.2.2.2. Extraction des composés phénoliques des tourteaux	42
II.2.2.3. Dosage spectrophotométrique des phénols totaux	43
II.2.2.4. Détermination de la teneur totale en flavonoïdes	44
II.2.2.5. Dosage des polyphénols par CLHP	44
II.2.3. Evaluation de l'activité antioxydante et l'activité antimicrobienne	45
II.2.3.1. Evaluation de l'activité antioxydante	45
II.2.3.1.1. Test de DPPH	45
II.2.3.1.2. Test de blanchiment du β -carotène	47
II.2.3.2. Activity antimicrobienne	48
II.2.4. Etude de l'effet de rôtissage sur la composition chimique et l'activité biologique des huiles fixes des graines de <i>Nigella sativa</i> L.	49
II.2.4.1. Introduction	49
II.2.4.2. Préparation des échantillons	49

Chapitre III : résultats et discussions

III.1. Extraction et analyse des huiles fixes	52
III.1.1. Teneur et caractéristiques physico-chimiques des huiles fixes	52
III.1.2. Analyse des acides gras dans l'huile	53
III.1.3. Analyse des Stérols	55
III.1.4. Analyse des Tocophérols	56
III.1.4.1. Dosage spectrophotométrique des tocophérols	56
III.1.4.2. Quantification de la fraction tocophérolique	57
III.1.5. Quantification des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans les huiles fixes et les tourteaux des graines de <i>Nigella sativa</i> L.	58
III.1.6. Quantification des polyphénols et des flavonoïdes par CLHP.	61

III.2.Evaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne des huiles fixes, les extraits Méthanolique et Acétonique des graines de <i>Nigella sativa</i> L.	66
III.2.1.Evaluation de l'activité antioxydante	66
III.2.1.1.Test de DPPH	66
I.2.1.1.1.Test de DPPH des huiles fixes	66
I.2.1.1.2.Test DPPH des extraits phénoliques des tourteaux des graines de <i>Nigella sativa</i> L.	68
III.2.1.2.Test de blanchiment du β -carotène	69
I.2.1.1.3. Test de blanchiment du β -carotène des huiles fixes, des extraits methanolique et acetonique des tourteaux des graines de <i>Nigella sativa</i> L.	69
III.2.2. Activity antimicrobienne	73
III.3.Etude de l'effet de rôtissage sur la composition chimique et l'activité biologique des huiles fixes des graines de <i>Nigella sativa</i> .L.	74
III.3.1. Teneur et caractéristiques physico-chimiques des huiles fixes	74
III.3.2.Analyse des EMAGs dans l'huile fixe	77
III.3.3.Dosage des Stérols par UV-visible	78
III.3.4.Dosage des tocophérols totaux	79
III.3.5.Analyse des Tocophérols par CLHP	81
III.3.6.Extraction et dosage des polyphénols	84
III.3.6.1.Dosage spectrophotométrique des phénols totaux	84
III.3.6.2.Dosage des polyphénols par CLHP	86
III.3.7.Evaluation de l'activité antioxydante des huiles fixes.	89
III.3.7.1.Teste DPPH	89
III.3.7.2.Teste de blanchiment de β -carotène	92
Conclusion	99
Bibliographie	103
Annexes	I

Liste des Tableaux

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Classification botanique de <i>Nigella sativa</i> L.....	7
Tableau I.2 : Différentes espèces et variétés de <i>Nigella</i> . et leur distribution géographique	8
Tableau I.3 : Composition des graines de <i>Nigella sativa</i> L.....	11
Tableau I.4 : Principaux acides hydroxybenzoïques.....	27
Tableau I.5 : Principaux acides hydroxycinnamiques.....	27
Tableau I.6 : Principaux types de coumarines.....	28
Tableau I.7 : Principales classes des flavonoïdes.....	30
Tableau III.1 : Propriétés physiques et chimiques de l'huile fixe des graines de <i>Nigella sativa</i> L...	51
Tableau III.2 : Composition en acides gras de l'huile des graines de <i>Nigella sativa</i> L.....	53
Tableau III.3 : Fractions des stérols dans l'huile fixe des graines de <i>Nigella sativa</i> L.....	54
Tableau III.4 : Teneur en tocophérols de l'huile fixe des graines de <i>Nigella sativa</i> L.....	55
Tableau III.5 : Composition en tocophérols individuels dans l'huile fixe des graines de <i>Nigella sativa</i> L.....	57
Tableau III.7 : Teneur en polyphénols de l'huile fixe et des extraits phénoliques des tourteaux des graines de <i>Nigella sativa</i> L.....	64
Tableau III.8 : Les valeurs de l'EC 50 de l'huile fixe dans le test du DPPH.....	66
Tableau III.9 : Les valeurs de l'EC50 des extraits Méthanolique et Acétonique des tourteaux dans le test du DPPH	68
Tableau III.10 : Les valeurs de l'EC 50 de l'huile fixe, des extraits Méthanolique et Acétonique dans le test de blanchiment du β -carotène.....	71
Tableau III.11 .La zone de sensibilité des bactéries aux extraits Methanolique , acetonique et de l'huile fixe des graines de <i>Nigella sativa</i> L. exprimée en mm.....	72
Tableau III.12 : Propriétés physiques et chimiques de l'huile fixe des graines de <i>Nigella sativa</i> L. torréfiées pendant plusieurs périodes	74
Tableau III.13 : Composition en acides gras dans l'huile fixe des graines de <i>Nigella sativa</i> L. torréfiées	77
Tableau III.14 : Le taux des stérols dans l'huile fixe des graines de <i>Nigella sativa</i> L. torréfiées	78

Tableau III.15 : Le taux des tocophérols totaux dans l'huile fixe des graines..... de <i>Nigella sativa</i> L. torréfiées.	79
Tableau III.16 : Teneur en tocophérols individuelles (mg/kg) dans l'huile fixe..... des graines de <i>Nigella sativa</i> L. torréfiées.	80
Tableau III.16 : Teneur en polyphénols totaux de l'huile fixe des graines..... de <i>Nigella sativa</i> L. torréfiées.	83
Tableau III.17 : Teneur (μg /mL d'huile) d'acides phénoliques et de flavonoïdes..... dans le'huile fixe des graines de <i>Nigella sativa</i> L. torréfiées.	86
Tableau III.18 : Les valeurs d'EC 50 des différents huiles des graines torréfiées..... pendant différents temps dans le test du DPPH.	89
Tableau III.19 : Les valeurs d'EC 50 des différents huiles des graines torréfiées..... pendant différents temps dans le test de blanchiment de β -carotène	93

Liste des Figures

List des figures

Figure I.1 : <i>Nigella sativa</i> L.....	10
Figure I.2 : Structure des saponosides à hédéragénine isolés à partir des graines de..... <i>Nigella sativa</i>	12
Figure I.3 : Structure chimique des trois flavonoïdes isolés de <i>Nigella sativa</i> L.....	13
Figure I.4 : Structure chimique des principaux alcaloïdes de <i>Nigella. sativa</i> L.....	14
Figure. I.5 : Principaux Constituants des Lipides.....	19
FigureI.6 : Structure des différents tocophérols et tocotriénols.....	23
Figure I.7 : Structure de Stérols.....	24
Figure II.1 : Montage d'extraction (Soxhlet) à chaud (solide –liquide) de l'huile fixe.....	35
Figure II.2 : schéma d'extraction des polyphénols de l'huile fixe de <i>Nigella sativa</i> L.....	40
Figure II.3 : schéma d'extraction des polyphénols des tourteaux de <i>Nigella sativa</i> L.....	41
Figure II.4 : Courbes cinétiques de la variation de l'absorbance en fonction du temps dans..... le test du DPPH	44
Figure II.5. Réduction du radical libre DPPH.....	44
Figure III.1 : Courbe d'étalonnage du cholestérol.....	54
Figure III.2 : Courbe d'étalonnage de la vitamine E.....	55
Figure III.3 : Chromatogramme CLHP des tocophérols des huiles fixes des graines de <i>Nigella</i> <i>sativa</i> L.	56
Figure III.4 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	58
Figure III.5 : Courbe d'étalonnage de la catéchine.....	59
Figure.III.6: Chromatogrammes de l'analyse des composés phénoliques de l'extrait..... Méthanolique (Méthanol: eau 70:30 (v: v)) à 280 nm (A) et 360 nm (B)	61
Figure.III.7: Chromatogrammes de l'analyse des composés phénoliques de l'extrait acétonique..... (acétone: eau 70:30 (v: v)) à 280 nm (C) et 360 nm (D)	62
Figure.III.8: Chromatogrammes de l'analyse des composés phénoliques des huiles fixes de..... <i>Nigelle sativa</i> L. à 280 nm (E) et 360 nm (F)	63

Figure III.9 : Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations en huile fixe dans le test du DPPH	66
Figure III.10 : Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits Méthanolique et Acétonique dans le test du DPPH	67
Figure III.11 : Cinétique de blanchiment du bêta-carotène à 470 nm en l'absence et la présence d'extraits méthanoliques et acétoniques du tourteau de graines de <i>Nigella sativa</i> L.	69
Figure III.12 : La variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'huile fixe dans le test de blanchiment du β -carotène	70
Figure III.13 : La variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'extraits phénolique system solvant méthanol/eau (70/30) dans le test de blanchiment du β -carotène	70
Figure III.14 : La variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'extraits phénolique system solvant acétone /eau (70/30) dans le test de blanchiment du β -carotène.	71
Figure III.15 : La variation de l'indice d'acidité des huiles fixes des graines de <i>Nigella sativa</i> L. en fonction de temps de rôtissage.	75
Figure III.16 : La variation de l'indice saponification de l'huile fixe des graines de <i>Nigella sativa</i> L. en fonction de temps de rôtissage.	76
Figure III.17 : La variation de la teneur en stérols totaux de l'huile fixe des graines de <i>Nigella sativa</i> L. en fonction du temps de rôtissage.	78
Figure III.18 : La variation de la teneur en tocophérols totaux de l'huile fixe des graines de <i>Nigella sativa</i> L. en fonction du temps de rôtissage.	80
Figure III.19 : La variation de la teneur en tocophérols et en tocotéinols de l'huile fixe des graines de <i>Nigella sativa</i> L. en fonction du temps de rôtissage.	82
Figure III.20 : La variation de la teneur en polyphénol totaux de l'huile fixe des graines de <i>Nigella sativa</i> L. en fonction du temps de rôtissage	84
Figure III.21 : La variation de la teneur en acide gallique, en acide coumarique et en acide vanillique dans l'huile fixe des graines de la <i>Nigelle sativa</i> L. en fonction du temps de rôtissage	87
Figure III.22 : La variation de la teneur en rutine dans l'huile fixe des graines de <i>Nigella sativa</i> L. en fonction du temps de rôtissage.	88
Figure III.23 : La variation des valeurs d'ARP du test du DPPH en fonction des concentrations en tocophérols des huiles fixes des graines traitées	90
Figure III.24 : La variation des valeurs d'ARP du test du DPPH en fonction des concentrations en tocophérols de l'huile fixe des graines traitées	91
Figure III.25 : La variation des valeurs d'ARP du Teste de blanchiment de β -carotène en fonction des concentrations en tocophérols totaux de l'huile fixe des graines traitées	94

Figure III.26 : La variation des valeurs d'ARP du Teste de blanchiment de β -carotène.....	94
en fonction des concentrations en polyphénols totaux de l'huile fixe des graines traitées	
Figure III.27 : La variation de la valeur de ARP dans le test de blanchiment du b-carotène.....	95
et le test DPPH en fonction du temps de rôtissage.	

List des abréviations

List des abréviations

GC-MS	: Gas Chromatography-Mass Spectroscopy
PL	: phospholipides
CLHP	: chromatographie liquide à haute performance
GPx	: glutathion peroxydase
SOD	: superoxyde dismutase
ADN	: acide désoxyribonucléique
DPPH	: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
CCM	: chromatographie sur couche mince
MCMV	: Virus cytomégalovirus murin
μ	: Mu récepteurs opiacés
κ	: Kappa récepteurs opiacés
INF-γ	: Interférons-gamma
NK	: Cellule lymphocytes (Natural Killer)
PAL	: phénylalanine ammonialiase
CHS	: clef la chalcone synthase
BHA	: butylhydroxyaisole
BHT	: butylhydroxytoluène
AFNOR	: Association Française de Normalisation
EMAGs	: esters méthyliques d'acide gras
AGI	: Acides gras insaturés
AGS	: Acides gras saturés
GAE	: Gallique acid Equivalent
CE	: Catéchine Equivalent
CFU	: Colonies Forming Units
DO	: densité optique
EC50	: Concentration efficace pour réduire 50% des radicaux libres (Efficiencie concentration).
IC50	: Concentration Inhibitrice pour réduire 50% des radicaux libres (Inhibitor concentration)
MS	: Matière sèche

TCP : Teneur en composés polyphénoliques
TCF : teneur en composés flavonoïdiques
Gram - : Gramme négatif
Gram + : Gramme positif
LPS : lipopolysaccharides
UV : Ultra-Violet
ARP : Puissance antiradicalaire
I% : pourcentage d'inhibition
RLs : Radicaux libres

INTRODUCTION

Introduction générale

De nombreuses recherches ont mis en évidence le rôle des phénomènes oxydatifs dans l'initiation de maladies aussi différentes que l'artériosclérose, les problèmes inflammatoires, cardiaques, pulmonaires, les cancers, le processus de vieillissement. De telles maladies apparaissent lorsque les mécanismes de défense contre les radicaux libres, dont dispose l'organisme, sont submergés. Il est donc nécessaire, à ce moment-là, d'aider le corps à lutter contre ces agressions [1].

L'usage des grains ou des plantes pour leurs vertus curatives s'est créé, répondu et transmis dans la plus ancienne civilisation connue. Il s'agit d'une des manifestations d'effort immémorial de l'homme pour comprendre et utiliser la nature, répondant ainsi à une de ses plus anciennes inquiétudes, celle qui naît de la maladie et la souffrance.[2]

Le consommateur cherche une alimentation saine et naturelle et préfère les aliments ne contenant pas d'additifs de synthèse. Les extraits végétaux qui présentent un pouvoir antioxydant intéressant sont pour la plupart riche en polyphénols [3], or ces substances ont une activité contre les radicaux libres, qui s'exprime aussi bien au niveau de la protection d'un aliment contre l'oxydation qu'au niveau de la protection des cellules animales contre le vieillissement et le cancer [4].

Nigella Sativa L. est une plante recommandé dans la thérapie arabo-musulmane est spécialement durant l'époque du prophète Mohamed «Sala Allah alliahi oua selem». « ***El habbah sauda est un médicament pour toutes les maladies sauf la mort*** », ces paroles sont restées pour longtemps un mystère pour la science jusqu'à l'arrivée des techniques modernes qui ont réussi à prouver les vertus thérapeutiques des grains de cette plante. Elle est l'une des plantes médicinales la plus utilisée à travers le monde. La graine de *N. Sativa* L. est aussi bien utilisée traditionnellement dans l'alimentation que comme « médicament ». Dans le thé, le café, les graines servent d'aromatisant ; elles entrent dans la composition du pain, et servent aussi d'agent de conservation. La graine broyée est mélangée au miel, ou bien on s'en sert pour saupoudrer les salades. En plus des utilisations comme épice ou aromate, des propriétés bénéfiques sur le système gastro-entéro-hépatique sont revendiquées. Les graines, mélangées à une préparation à base de yaourt, se sont avérées être efficaces dans les nausées, les pertes d'appétit, dans les œdèmes et maladies liées au post-partum. En combinaison avec d'autres produits, les graines sont utilisées pour traiter l'obésité, l'asthme et pour prévenir des calculs

Introduction générale

biliaires. La plante est considérée comme médicament des troubles digestifs et hépatiques, elle est également indiquée dans les céphalées chroniques et les migraines. En dermatologie, la graine traite l'alopecie, l'eczéma et l'acné ; par ailleurs on lui reconnaît des propriétés anthelminthiques et anti-infectieuses [5].

De nombreuses recherches sur la phytochimie et la bio-activité de *N. sativa* L. ont confirmé ces propriétés qui sont dues en majorité aux huiles fixes et aux polyphénols extraites. L'huile fixe des graines de *Nigelle sativa* L. a de nombreuses propriétés pharmacologiques et peut être considérée comme agent antioxydant, anti-inflammatoire, immunomodulateur, antitumoral, antidiabétique et elle joue un rôle non négligeable dans les systèmes cardio-vasculaire et gastro-intestinal [6].

Durant ces vingt dernières années, de nombreuses équipes de chercheurs se sont intéressées à *Nigella sativa* L. La plupart des indications revendiquées en médecine traditionnelle ont été confirmées et d'autres propriétés sont venues se greffer.

L'objectif principale de cette thèse est d'étudier les huiles fixes des graines de *Nigella sativa* L. à travers la détermination des compositions chimiques en acides gras, en Stérois, en tocophérols et polyphénols, en utilisant des techniques analytiques ,comme CLHP et la CPG .par la suite nous avons étudié l'influence de la température de rôtissage sur la composition des huiles de *Nigella sativa* L. et sur leurs propriétés antioxydante et antibactérienne. Cette étude a été entreprise pour les raisons suivantes.

- L'importance commerciale de ces graines (*Nigella sativa* L.) en Algérie en alimentation humaine.
- Disponibilité des huiles des graines de *Nigella sativa* L. et ils sont vendues au niveau des herboristes pour leur utilisation en médecine traditionnelle.
- Peu de travaux ont été consacrés à l'étude des constituants chimiques des graines des *Nigella sativa* L. Et à notre connaissance aucun travail n'a été publié sur l'effet du rôtissage sur la composition et l'activité antioxydante des huiles fixes des graines de *Nigella sativa* L.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à donner quelques connaissances bibliographiques concernant les graines de *Nigella sativa* L., des généralités (structures et propriétés) sur les composés lipidiques et phénoliques ainsi un aperçu

Introduction générale

sur l'activité antioxydante. Par la suite, notre étude a été consacrée à l'étude des huiles fixes des graines de *Nigella sativa* L. à travers la détermination des compositions chimiques en acides gras, en tocophérols et en polyphénols et nous avons évalué le pouvoir antioxydant et l'activité antimicrobienne. Ensuite, nous avons étudiée l'effet de rôtissage sur la composition chimique et l'activité antioxydante des huiles des graines de *Nigella sativa* L. en jouant sur le facteur du temps de séjour.

CHAPITRE I

Synthèse

bibliographique

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1 Présentation de la plante

I.1.1 *Nigella sativa* L. et l'histoire de son usage traditionnel

L'usage des plantes à des fins thérapeutiques remonte à des temps très anciens. Des fossiles du début du Crétacé (-250 millions d'années) prouvent l'existence des nigelles à la fin de l'Ère secondaire[7]. Tout d'abord la civilisation sumérienne, première civilisation véritablement « urbaine » ayant marqué la fin de la préhistoire au Moyen-Orient, serait à l'origine de l'utilisation des plantes comme sources de « médicaments ».

Les Sumériens étaient établis dans la région de la Mésopotamie de part et d'autre du Tigre et de l'Euphrate, lieux propices au développement agricole. Un recueil, sous forme de tablettes d'argile, contenant des formules végétales gravées en caractères cunéiformes et datant de 5000 ans, a été découvert à Nippur (ancienne ville mésopotamienne) en 1948. Près de 250 plantes y sont répertoriées, dont la *Nigelle*. Puis des milliers de tablettes, datant de 2000 ans avant J.-C. ont été découvertes en 1973 dans les ruines d'Elba en Syrie [8]. Par ailleurs, la civilisation égyptienne n'est pas en reste en terme de plantes médicinales.

En effet, le papyrus découvert par Edwin Smith en 1862 dans les ruines de Louksor, rédigé entre 1500 et 1600 avant J.-C. et déchiffré par l'égyptologue allemand Georg Ebers, constitue l'un des plus anciens traités médicaux qui nous soit parvenu. Il fait état de la pharmacopée égyptienne où plus de 700 substances, tirées pour la plupart du règne végétal, sont répertoriées. Il s'intitulait « Livre de préparation de médicaments pour toutes les parties du corps humain ». *Nigella* est citée comme médicament pour traiter la toux et les maladies pulmonaires. Et des archéologues ont trouvé une fiole d'huile de cumin noir dans le tombeau du Pharaon Toutânkhamon (v.-1353 à -1343). Selon certaines sources, cette huile était utilisée comme produit de beauté par Cléopâtre et Néfertiti. C'était aussi l'un des précieux remèdes prodigués par les médecins personnels des pharaons qu'ils exploitaient pour son action digestive après les repas copieux et aussi contre les maux de tête, de dents, les infections diverses, les inflammations et allergies en tous genres. La civilisation gréco-romaine a également excellé en terme de thérapie par les plantes, notamment grâce à Hippocrate (460-377 av. J.-C.), surnommé le père de la médecine. Son *Corpus Hippocratum*, un ensemble de textes, mentionne près de 400 remèdes à base de plantes dont la nigelle. Claude Galien (né vers 131 après J.-C.), médecin attitré de l'Empereur Marc Aurèle, à l'origine de la « pharmacie galénique », a

Chapitre I : Synthèse bibliographique

amélioré en termes de précision et de qualité les connaissances fournies par Hippocrate. conseille de brûler les graines de *Nigella sativa* L. pour tuer les moucheron et les moustiques ; et Tragus les employait comme antihelminthiques[9]. Pedanius Dioscoride né vers 40 après J.-C. en Cilicie (le sud de la Turquie actuelle) et mort vers 90 après J.-C., d'après la préface de son traité *De materia medica*, aurait été médecin militaire sous les règnes de Claude Ier et de Néron. Il préconisait l'usage des graines de *Nigella sativa* L. contre les maux de tête, les affections des yeux, les maux de dents et les morsures d'araignées.

Oribase, médecin grec du 4^e siècle de l'ère chrétienne, fut l'un des médecins de l'empereur Julien. A sa demande, il composa un corpus de médecine comprenant tout ce que les anciens médecins avaient écrit. Dans un synopsis, rédigé à l'intention de son fils Eustathios, dans le chapitre « Pâles couleurs, taches livides » tome V des O Euvres d'Oribase, il donne une recette (onction énergique) à base de *Nigella sativa* L., pour lutter contre les symptômes susmentionnés.

Au 8^e siècle, la médecine occidentale est surtout pratiquée par les moines. Dans le capitulaire de Villis, datant de l'an 795 environ, on note des recommandations sur *Nigella sativa* L.. On crédite à l'excellence des arabes en médecine l'élargissement du champ d'application de cette plante en thérapeutique. « Soignez-vous en utilisant la graine de *Nigella sativa* L., c'est un remède contre tous les maux à l'exception de la mort », telle est la recommandation faite par le prophète Mohammed au 7^e siècle.

L'un de ses disciples, Ibn Atîq, avait utilisé les graines de *Nigella sativa* L. macérées dans l'huile d'olive. On instillait trois gouttes de cette huile dans chaque orifice nasal pour traiter la grippe qui s'accompagnait d'éternuements en salves[10]. Né près de Boukhara en Perse (actuel Ouzbékistan), Abu Ali Al-Hussein Ibn Abdallah Ibn Sina, connu sous le nom d'Avicenne (980-1037), traite de *Nigella sativa* L. dans son ouvrage « le Livre de la guérison de l'âme » ou « *Kitab Al-Chifâ* ». Il conseillait de griller les graines et de les réduire en poudre, puis de placer cette préparation dans une bourse en tissu et d'inhaler quotidiennement pour désobstruer les voies nasales, selon le même principe qu'un vaporisateur [11].

Avicenne préconisait aussi la *Nigella sativa* L. dans la dyspnée et dans le traitement de l'asthme et des bronchites. Cette même préparation, prise avec de l'eau bouillie, possède des actions diurétiques et dissolvantes des calculs rénaux [12]. D'autre part, la prise de l'huile de *Nigella*

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Tableau I.2 : Différentes espèces et variétés de *Nigella*. et leur distribution géographique [15, 16]

Nom de l'espèce	Synonyme courant	Distribution
Subsect. <i>Erobathos</i> (DC.) Zoh		
<i>N. damascena</i> L.	<i>Erobathos coarctatus</i> (Gmel.) Spach	Medit.; cultivated
<i>N. elata</i> Boiss	<i>N. bithynica</i> Azn	N.E. Medit
Subsect. <i>Nigellaria</i> (DC.) Terracc		
<i>N. arvensis</i> L.	<i>N. arvensis</i> subsp. <i>arvensis</i> sensu Fl. Europ	W. Irano-Turanian N. Medit. - Pontic – central European
var. <i>anatolica</i> Zoh		
var. <i>arvensis</i>		
var. <i>assyriaca</i> (Boiss.) Zoh	<i>N. deserti</i> Boiss	
var. <i>beershevensis</i> Zoh var.		W. Irano-Turanian
<i>glauca</i> (Schkuhr) Boiss	<i>N. carpatha</i> Strid, <i>N. degenii</i> Vierh., <i>N. doerfleri</i> Vierh.	Saharo-Arabian E. Medit., W. Irano-Turanian
var. <i>glaucescens</i> Guss	<i>N. divaricata</i> Moris	
var. <i>involutata</i> Boiss	<i>N. arvensis</i> subsp. <i>aristata</i> (Sm.) Nyman	W. Medit
var. <i>iranica</i> (Zoh.)		E. Medit
var. <i>longicornis</i>	<i>N. assyriaca</i> var. <i>longicornis</i> Zoh.	W. Irano-Turanian
(Zoh.) Townsend		W. Irano-Turanian
var. <i>microcarpa</i> Boiss	<i>N. taubertii</i> Brand	E. Medit
var. <i>multicaulis</i> Zoh	<i>N. deserti</i> var. <i>latilabris</i> Zoh	Medit. - Saharo-Arabian
var. <i>negevensis</i> Zoh	<i>N. arvensis</i> subsp. <i>negevensis</i> (Zoh.) W.Greuter & Burdet	Saharo-Arabian
var. <i>palaestina</i> (Zoh.) Zoh. & Feinbr	<i>N. divaricata</i> var. <i>palaestina</i> Zoh	E. Medit
var. <i>simplicifolia</i> Zoh		W. Irano-Turanian
var. <i>mutica</i> Bornm	<i>N. arvensis</i> var. <i>submutica</i> Bornm	E. Medit
<i>N. fumariifolia</i> Kotschy <i>N. hispanica</i> L.		N.E. Medit
var. <i>hispanica</i>	<i>N. amoena</i> Salisb.	N.W. Medit
var. <i>intermedia</i> Coss	<i>N. papillosa</i> subsp. <i>atlantica</i> (Murb.) Amich ex G. Lopez	S.W. Medit
var. <i>parviflora</i>	<i>N. gallica</i> Jord	N.W. Medit
Coss <i>N. sativa</i> L.		
var. <i>hispidula</i> Boiss	<i>N. truncata</i> Viv	N.E. Medit.; cultivated
var. <i>sativa</i>	<i>N. indica</i> Roxb	widely cultivated
<i>N. segetalis</i> Marsch. Bieb		
var. <i>armena</i> (Stev.) Boiss	<i>N. verrucosa</i> C. Koch	W. Irano-Turanian
var. <i>segetalis</i>	<i>N. bicolor</i> Boiss	W. Irano-Turanian
<i>N. stellaris</i> Boiss	<i>N. cilicica</i> Boiss. et Bal. in Boiss	N.E. Medit
Subsect. <i>Nigellastrum</i> (DC.) Zoh		
<i>N. ciliaris</i> DC.	<i>N. oxypetala</i> subsp. <i>ciliaris</i> Terracc	S.E. Medit
<i>N. orientalis</i> L.	<i>Nigellastrum flavum</i> Moench	N.E. Medit., W. Irano-Turanian
<i>N. oxypetala</i> Boiss	<i>N. lancifolia</i> Hub.-Mor., <i>N. latisecta</i> P.H.Davis	N.E. Medit., W. Irano-Turanian

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1.4 Description botanique de *Nigella sativa* L.

Nigella sativa L. est une plante herbacée, annuelle, à tige dressée, côtelée, anguleuse et rameuse d'une soixantaine de centimètres de hauteur, portant des feuilles bi- ou tripennatiséquées, oblongues ovales, composées de segments lancéolés oblongs, au pétiole pubescent. Il n'y a pas de feuilles réunies en involucre immédiatement autour de la fleur, contrairement à *Nigella damascena* L. :

- Les fleurs sont solitaires, axillaires et terminales, bisexuées, radiales, très riches en nectar.
- Le calice comporte cinq sépales pétaloïdes, de couleur blanchâtre à bleu pâle, assez brusquement rétrécis à leur base
- La corolle est composée de cinq pétales plus petits que les sépales et ayant chacun la forme d'un cornet bilabié, dont la lèvre supérieure est divisée en deux. Les pétales portent à leur sommet deux petits renflements arrondis jaune verdâtre.
- Chaque fleur possède huit cornets nectarifères, une lèvre inférieure bilobée dont les lobes se terminent en une protubérance émoussée, et une lèvre supérieure poinçonnée.
- L'androcée est formé de nombreuses étamines fixées sur le réceptacle par de longs filets.
- Le gynécée consiste en cinq follicules soudés, chacun avec un style long indéhiscent et composé de cinq carpelles soudés entre eux jusqu'à la base des styles persistants.

La plante est hermaphrodite à reproduction autonome.

Le fruit correspondant à l'ensemble des follicules soudés forme la capsule contenant plusieurs graines triangulaires blanchâtres qui, lorsque la capsule s'ouvre à maturité, exposées à l'air deviennent noires (figure I.1)

Les graines sont ovoïdes et mesurent 2 à 3,5 mm ; elles présentent 3 ou 4 angles avec une face supérieure finement granuleuse et réticulée [15, 16]

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Tableau I.3: Composition des graines de *Nigella sativa* L.[21].

Constituant	Quantité (%)
Lipides	30-35
Protéines	16 -21
Glucides	33-34
Fibres alimentaires	4,5 – 6,5
Sels minéraux	3,7 – 7
Saponines	0,013

I.1.5.1 Composés aromatiques

Il a été considéré que la plupart des activités pharmacologiques attribuées à *Nigella sativa* provenaient de son huile essentielle. C'est pourquoi dès 1960 des études ont été entreprises sur les constituants de cette huile volatile.

C'est en 1963 que la thymoquinone, monoterpène oxygéné, a été isolée dans l'huile de *Nigella*, par El-Dakhakhny, et d'autres études ont mis en évidence les principaux constituants[22]. Burits et Bucar en 2000, ont identifié par GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectroscopy), 32 constituants dont la majorité sont des monoterpènes : *p*-cymène (38%), thymoquinone (30%), carvacrol (5-11%), α -pinène (5-14%), β -pinène (5%), limonène (4%), longifolène (1,2-8%), 4-terpinéol (1,98-6,59%) et *t*-anéthol (0,25-4,28%)[22].

La présence de thymohydroquinone, de thymol, de produits d'oxydation de la thymoquinone, comme la dithymoquinone sont également signalés.

I.1.5.2 Saponosides

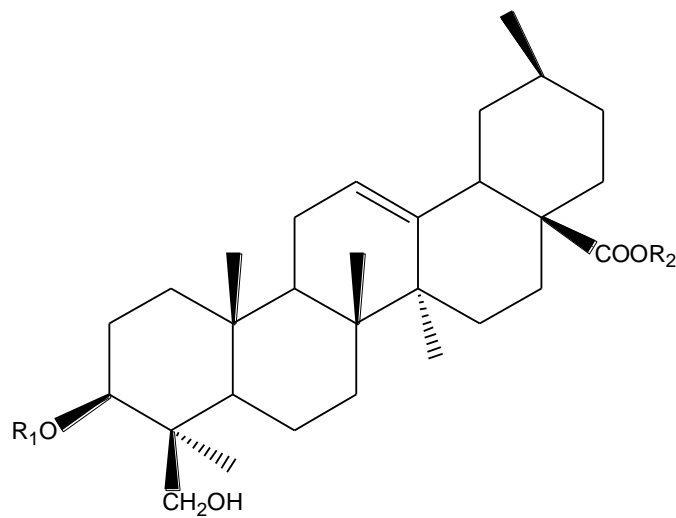
Les saponosides sont des hétérosides de stérols ou de triterpènes. Ce sont des composés très répandus dans le règne végétal. Solubles dans l'eau, ils libèrent par hydrolyse un ou plusieurs oses et une génine (sapogénine). La première saponine isolée par Greenisch en 1882 à partir des graines de *N. sativa* est la mélianthine, dont l'aglycone est l'hédéragénine [23] Récemment, d'autres saponosides ont pu être isolés à partir d'un extrait éthanolique des graines de *N. sativa* dont le 3-O-[beta-D-xylopyranosyl-(1-3)-alpha-L-rhamnopyranosyl-(1-2)-alpha-L-

Chapitre I : Synthèse bibliographique

arabinopyranosyl]-2[24], alors que de nombreux autres saponosides ont pu être déterminés à partir des huiles de *N. Sativa* [25].

Une étude a permis d'isoler à partir de l'extrait méthanolique trois autres saponosides apparentés à l' α -hédérine, avec l'élucidation de leurs structures par des méthodes chimiques et spectrales (figure I.2) [26]

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



R1

R2

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

Figure I.2: Structure des saponosides à hédéragénine isolés à partir des graines de *Nigella sativa* L.[26]

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1.5.3 Polyphénols et 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. En 1997, trois nouveaux flavonoïdes triglycosylés ont été isolés à partir des graines de *Nigella sativa* L. et leurs structures ont été déterminées[27]:

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.

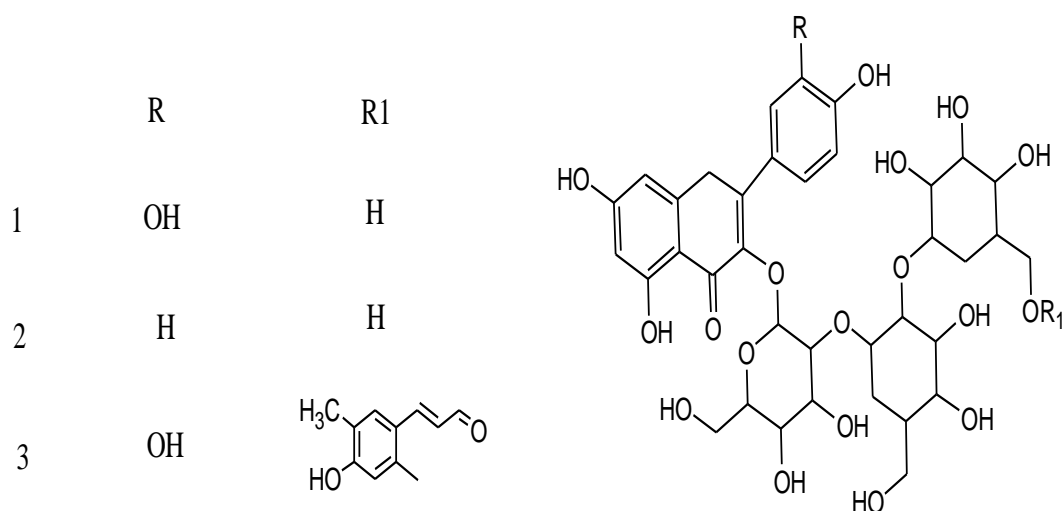


Figure I.3: Structure chimique des trois flavonoïdes isolés de *Nigella sativa* L.[27]

En 2008, quatorze composés phénoliques ont été isolés à partir d'un extrait méthanolique de pousses et de racines de *Nigella sativa* L. . Ceux-ci 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 [28]

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1.5.4 Tanins

Les tanins ont des propriétés pharmacologiques – astringents qui provoquent la contraction des tissus et des vaisseaux sanguins et qui stimulent la coagulation du sang, anti-diarrhéiques (ralentit le péristaltisme intestinal), antiseptique, vasoconstricteur de petits vaisseaux (hémorroïdes, blessures superficielles), anti-inflammatoire dans les cas de brûlures

I.1.5.5 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. Les plus importants alcaloïdes de *Nigella sativa* L. (figure I.4).

- Nigellicine, à noyau indazole[29].
- Nigellimine, une isoquinoléine[28].
- Nigellimine N-oxyde, dérivé N-oxyde de la nigellimine[30].
- Nigellidine, également un indazole[31].

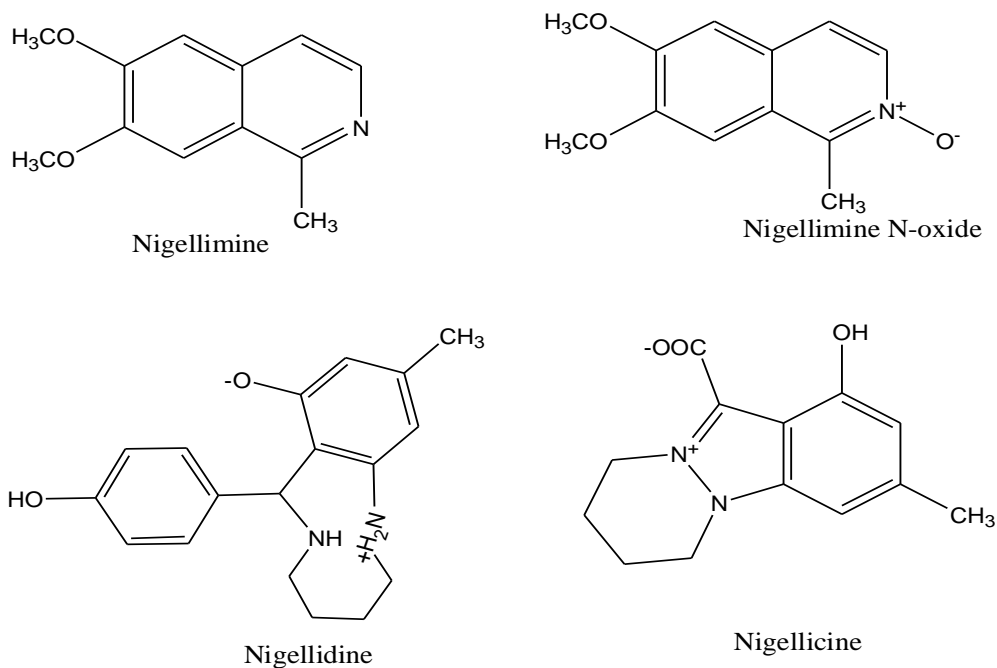


Figure I.4: Structure chimique des principaux alcaloïdes de *Nigella sativa* L.[32]

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1.5.6 Les Protéines

Les graines de *Nigella sativa* L. sont très riches en protéines (environ 20 %), avec dominance d'acide glutamique (22,4%), d'acide aspartique (10,05%) et d'arginine (9,18%) [33]. La protéine la plus étudiée jusqu'à maintenant est la lipase qui catalyse des réactions de transestérification [34]. L'analyse des acides aminés de l'hydrolysate de ces protéines révèle la présence de 17 acides aminés y compris les 8 acides aminés [35].

I.1.5.7 Les Vitamines et Sels Minéraux

La composition en vitamines a été déterminée et révèle la présence des vitamines A, B1, B2, B6, PP et de l'acide folique [36]. Les tocophérols totaux constituent 0,05% de l'huile, et sont constitués majoritairement de l' α -tocophérol (48%) et du γ -tocophérol (28%). D'autres vitamines liposolubles comme le β -carotène (0,05%) et la vitamine K1 (0,1%).

Des travaux sur la composition minérale de la graine de *Nigella sativa* ont rapporté que sa teneur en potassium est importante (1,18 % de poids total de la graine) et que le calcium, le fer, le sodium représentent 0,188 ; 0,0575 et 0,0853 % respectivement [36]. La teneur des graines en sélénium a été également déterminée, elle représente 0,27 à 0,54 mg/kg de graine [20, 37, 38].

I.1.5.8 Lipides et Stérols

L'huile fixe représente 37,9-39,2% du poids de la graine de *Nigella sativa* L. Elle est constituée principalement de lipides neutres 96,1%-97,2%, de lipides polaires 3% et de phospholipides 0,32-1,05%. L'analyse des phospholipides (PL) par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) a permis d'identifier principalement sept constituants; phosphatidyl choline (46% des PL), phosphatidyl éthanolamine (25%), phosphatidyl sérine (12%), phosphatidyl inositol (9,56%), lysophosphatidyl choline (4,23%), phosphatidylglycérol (1,51%) et lysophosphatidyl éthanolamine (1,2%) . Une étude complémentaire sur les glycolipides de *Nigella sativa* a permis de séparer et d'identifier six composés dont le plus abondant est le digalactosyl diacyl glycérol qui forme 55,6% des glycolipides totaux.

L'analyse phytochimiques de deux variétés des graines *Nigella sativa* L. (provenant d'Iran et de Tunisie) montre que le principal acide gras insaturé est l'acide linoléique suivi par l'acide oléique [39], alors que l'acide gras saturé majoritaire est l'acide palmitique. La présence d'autres acides gras ; myristoleique, palmitoleique, margarique, arachidique, eicosenoique, behénique,

Chapitre I : Synthèse bibliographique

lignocérique a été également détectée [40]. Ultérieurement Cheikh-Rouhou et collaborateurs, (2008) ont mis en évidence la richesse de l'huile de *Nigella* 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 [41].

I.1.5.9 Huile essentielle

L'huile essentielle représente entre 1,4–1,9% du poids de l'huile fixe et 0,18 à 0,50% du poids des graines. L'analyse de cette huile par GC-MS réalisée par Burits et Bucar(2000) a permis d'identifier 32 composants, dont la majorité 27 d'entre eux sont des monoterpènes lathymoquinone (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%)[42]. Contrairement à l'étude précédente, Moretti et ses collaborateurs (2004) ont trouvé que le composant majeur est le p-cymène suivi du thymol alors que la thymoquinone présente un taux faible [43]. Récemment, L'huile essentielle de *Nigella sativa* cultivée au Sahara algérien (Timimoune et Adrar), extraite par deux méthodes différentes l'hydrodistillation et distillation par micro-onde a été analysée par CPG et GC-MS, 112 composés ont été identifiés et caractérisés, le p-cymène représente toujours le composé le plus abondant suivi de la thymoquinone [44, 45].

I.1.6 Propriétés pharmacologiques des graines de *Nigella sativa* L.

Durant les vingt dernières années, plusieurs travaux ont porté sur l'étude de *Nigella sativa* L., notamment sur les effets pharmacologiques dus aux extraits de ses graines ainsi qu'à ses principaux constituants sur divers systèmes *in vivo* et *in vitro*.

I.1.7 Activité antioxydante

In vivo, L'administration de l'huile de *Nigella sativa* L. et de la thymoquinone chez des rats protège contre l'hyperhomocystéinémie induite par la méthionine en bloquant l'accumulation de l'homocystéine, l'une des causes de l'état du stress oxydant, conduisant à la protection contre la peroxydation lipidique et les changements du statut oxydatif [46]. Par ailleurs, le traitement de rats soumis à un régime alimentaire contaminé par l'aflatoxine, avec l'huile de *Nigella sativa*, entraîne une protection importante contre l'hépatonephrotoxicité et les altérations oxydatives (réduction des taux de la GPx, de la SOD, augmentation de la peroxydation lipidique

Chapitre I : Synthèse bibliographique

et des altérations de l'ADN) induites durant l'aflatoxicose. Cet effet protecteur de l'huile de *Nigella sativa* L. est probablement attribué à leur effet piègeur de radicaux libres [47]. *In vitro*, Mariode *et al* (2009) ont établi une activité antioxydante des différents extraits polyphénoliques des graines de *Nigella sativa* via différents tests tels que le test DPPH, de blanchissement de bêta-carotène et de la peroxydation lipidique non enzymatique. Ils ont pu identifier grâce à la technique d'CLHP trois composés polyphénoliques qui semblent être responsables de ce potentiel antioxydant.

L'huile essentielle de *Nigella sativa* L., ainsi que ses fractions, ont été testées pour leur activité antioxydante par une évaluation rapide des antioxydants en utilisant deux méthodes de CCM de criblage. La thymoquinone, le carvacrol, le t-anéthol et le 4-terpinéol ont montré une propriété scavenger des radicaux libres remarquable. Cette propriété antioxydante a été confirmée par d'autres tests (DPPH, peroxydation lipidique non enzymatique et l'essai du désoxyribose) [17].

I.1.8 Activité antimicrobienne

L'extrait méthanolique possède un effet inhibiteur très considérable sur *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* et *Candida albicans* [48]. L'huile fixe présente un large spectre vis-à-vis de nombreuses souches bactériennes, ainsi l'huile de la nigelle possède un pouvoir inhibiteur supérieur à celui de la gentamicine sur une vingtaine de souches de *Listeria monocytogenes* [49].

L'huile de *Nigella sativa* possède également un effet antiviral vis-à-vis du virus de l'herpès : cytomégalovirus murin (MCMV) [50]. L'huile fixe présente aussi une excellente activité antifongique, notamment à l'égard d'*Aspergillus flavus*. Par ailleurs, la thymoquinone exerce une activité inhibitrice vis-à-vis de huit espèces de dermatophytes [51]. Des propriétés anti-cestodales et anti-nématiques (*Entameba histolytica*) de différents extraits de la graine ont été rapportées par Raza *et al* (1999).

I.1.9 Effets anti-inflammatoire et analgésique

Plusieurs auteurs ont étudié l'éventuelle activité analgésique et anti-inflammatoire des extraits de *Nigella sativa* L. ou de certains de ses composés purs. En effet, il a été démontré que les polyphénols et les extraits aqueux et méthanolique des graines de *Nigella sativa* L. possèdent des propriétés analgésique et anti-inflammatoire [52, 53]. Ces propriétés ont été

Chapitre I : Synthèse bibliographique

établies chez le rat et la souris dans le test de l'oedème de la pâte induit par le carragénane et dans le test de la formaline et de l'acide acétique [52]. Les graines de *Nigella sativa* et ses composés actifs particulièrement la thymoquinone inhibent d'une manière dose dépendante la cyclooxygénase et la lipoxygénase, enzymes impliquées dans la synthèse des prostaglandines et des leucotriènes respectivement (principaux médiateurs de l'inflammation) et par conséquence possède un effet anti-inflammatoire notamment vis-à-vis de la colite inflammatoire, l'arthrite inflammatoire, et l'encéphalomyélite allergique.

Ghedira et Le Jeune (2010) ont rapporté que l'huile fixe issue des graines est responsable d'une importante activité analgésique due à la présence d'un principe opioïde présent dans l'huile fixe, cette action ayant été antagonisée par la naxolone. Des études plus approfondies ont démontré que l'action antinociceptive peut être également engendrée par la thymoquinone aussi bien que l'huile fixe par activation indirecte des récepteurs super spinaux μ et κ [47].

1.1.10 Effets anticancéreux et antimutagène

Des effets, *in vivo*, anti-tumoraux ont été montrés en exposant les cellules MCF-7 de cancer de sein à l'extrait aqueux et alcoolique des graines de *Nigella sativa* [54]. Salim et Fukushima (2003) ont suggéré que les polyphénols des extraits huileux des graines de *Nigella sativa* inhibent la prolifération des cellules de la muqueuse colique sans effets secondaires [54]. Des études, *in vitro*, ont révélé que les extraits d'acétate d'éthyl et de butanol exercent un effet cytotoxique vis-à-vis de plusieurs cellules cancéreuses.

De même que les extraits : chloroformique, méthanolique et hexanique provoquent l'apoptose des cellules cancéreuses de l'utérus avec des CI_{50} très faibles de 0,41-2,28 et 2,2 mg/ml respectivement. ont rapporté aussi que l'extrait méthanolique brut préparé à partir des graines de *Nigella sativa* présente une importante action cytotoxique sur le carcinome ascitique d'Ehrlich et sur le lymphome ascitique de Dalton.

1.1.11 Effets sur le système immunitaire

L'effet de la plante sur le système immunitaire a été étudié. Ainsi, *in vitro*, les extraits solubles des graines de *Nigella sativa* augmentent la production de l'interleukine-1 β par la stimulation directe des macrophages ou via l'interleukine-3 [55]. L'administration intrapéritonéale de la thymoquinone stimule la production de l'INF- γ et la prolifération des macrophages et des

Chapitre I : Synthèse bibliographique

lymphocytes T₄ et entraîne une diminution du nombre et de la fonction des cellules NK (naturel killer) [56]. D'autre part, la plupart des sujets qui ont été traités par l'huile de *Nigella sativa* pendant quatre semaines ont montré une augmentation de 55% des lymphocytes T₄ et T₈ et 30% des cellules NK[57]. A côté de ces propriétés pharmacologiques, d'autres effets ont été aussi rapporté, notamment des effets hypocholestérolémiantes et antiathérogènes, antidiabétiques [58] anti-hypertensifs et antitussifs[59, 60] .

I.2 Les Lipides

I.2.1 Introduction

Les lipides sont des biomolécules organiques insolubles dans l'eau, on va les extraire des cellules ou tissus par des solvants organique tels que le chloroforme, l'hexane, l'éther, le benzène. Il existe différentes classes de lipides, mais leurs propriétés communes résultent des chaînes hydrocarbonées (carbone + hydrogène) qui constituent la majeure partie de leur structure[61].

Ces lipides présentent plusieurs fonctions biologiques importantes, ils remplissent des fonctions structurales essentielles en tant que composant majeur des biomolécules membranaires. Ils servent de combustibles pour la cellule et pour cela ils interviennent dans des réactions d'oxydation dans la cellule, un rôle de protection à la surface d'un grand nombre d'organismes, ils peuvent être aussi des constituants de la surface cellulaire et participer à la reconnaissance des cellules et joue un rôle d'immunité cellulaire; enfin certaines substances telles vitamines et hormones, sont classés parmi les lipides et ces substances sont douées d'une intense activité biologique [61].

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.2.2 Classification des lipides

On classe les lipides en deux grandes catégories : les lipides à base d'acides gras (lipides saponifiables) et les lipides à base d'isoprène (lipides insaponifiables)[62]. Leur répartition est montrée par la figure I.5.

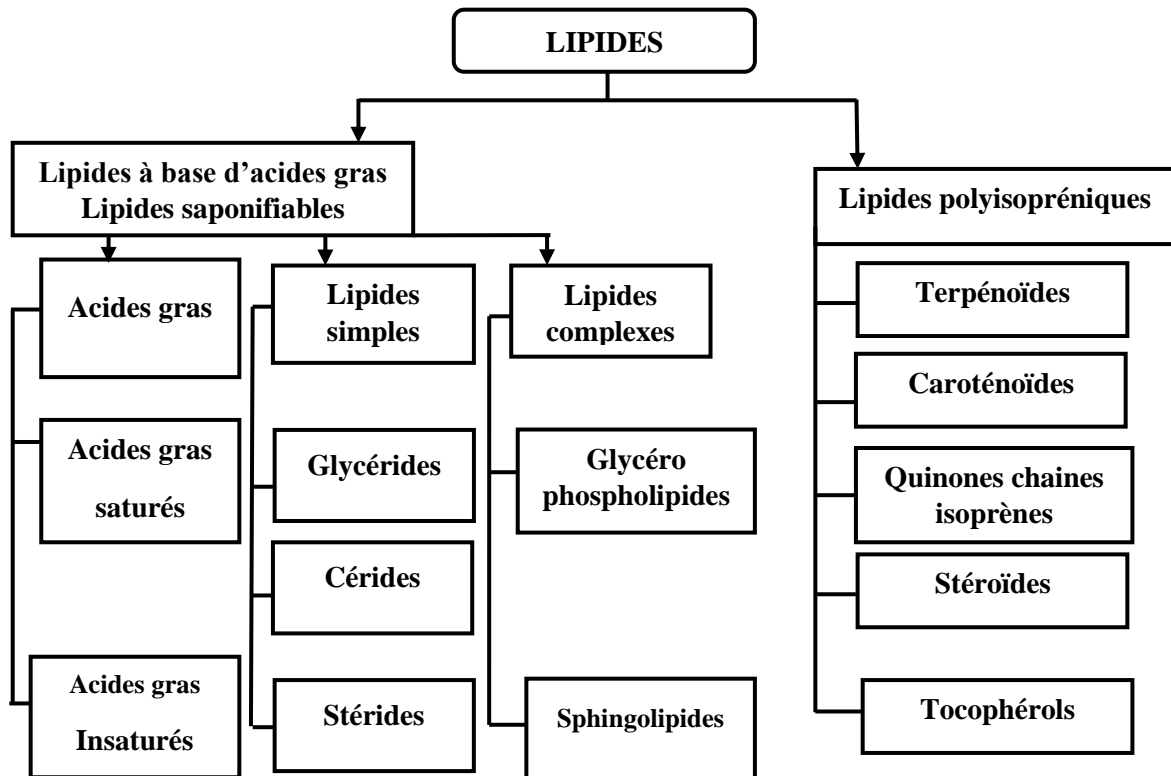


Figure. I.5 : Principaux Constituants des Lipides.

I.2.2.1 Lipides Saponifiables

Les lipides saponifiables sont des lipides qui sont traités par des bases minérales (NaOH, KOH) et qui donnent du savon[63].

I.2.2.1.1 Acides gras

Les acides gras peuvent exister à l'état libre de nature. Ce sont des composés organiques à base de carbone, d'hydrogène et d'oxygène. Ils sont formés d'une chaîne hydrocarbonée plus ou moins longue et d'un groupe carboxyle. La chaîne aliphatique hydrocarbonée peut être saturée ou peut présenter une ou plusieurs doubles liaisons. Les acides gras diffèrent donc entre eux par

Chapitre I : Synthèse bibliographique

la longueur de la chaîne aliphatique selon le nombre et la localisation des doubles liaisons éventuelles[64].

a) Les acides gras saturés

Une série continue d'acides gras de nombre de carbone pair (4 à plus de 30) a été isolée des lipides source animale, végétale et microbienne [65]. Les acides gras saturés les plus courants sont :

Acide palmitique : C16:0, C16H32O2

Acide stéarique : C18:0, C18H36O2

Acide arachidique : C20:0, C20H40O2

b) Les acides gras insaturés

Ils présentent plus de la moitié des acides gras des plantes et des animaux, ceux qui possèdent une double liaison tels que les acides monoéniques ou monoinsaturés [65], par exemple :

Acide palmitoléique C16:1, C16H30O2

Acide oléique C18:1, C18H34O2

Et ceux qui possèdent plusieurs doubles liaisons, ils sont polyéniques ou polyinsaturés [65], par exemple :

Acide linoléique C18:2, C18H32O2

Acide linoléique C18:3, C18H30O2

c) Les acides gras cycliques :

Les acides gras cycliques sont rarement rencontrés, à savoir les acides sterculiques « (Octyle-2-cyclopropényl) 8 octanoïque » et les acides chaulmogriques « (Cyclopentényl) 13 tridécanoïque »[66].

I.2.2.2 Les lipides simples

Les lipides simples encore appelés homolipides sont des corps ternaires (C, H, O). Ils sont des esters d'acides gras que l'on classe en fonction de l'alcool [67].

-Acyglycérols (ou glycérols) sont des esters du glycérol.

-Cérides sont des esters d'alcool à longue chaîne (alcool gras).

Chapitre I : Synthèse bibliographique

-Stérides sont des esters de stérols (alcool polycyclique).

I.2.2.3 Les lipides complexes

Ces hétérolipides contiennent des phosphates, sulfates ou glucides. Ils sont classés par rapport à la molécule qui fixe les acides gras[68] :

- Soit le glycérol qui se distingue des acyglycerols par l'hétérogroupe et qui sont subdiviser en:

- glycérophospholipides

- glyceroglycolipides.

- Soit une base sphingoides (dialcool aminé) qui définit les sphingolipides.

I.2.3 Lipides Insaponifiables (Polyisopréniques)

Les lipides polyisopréniques sont des lipides à base d'isoprène[69]. Ce groupe des lipides est aussi appelé lipides insaponifiables et joue un rôle biologique fondamental (hormones et vitamines)[70]. Ils sont divisés en quatre catégories : les terpénoïdes, les caroténoïdes, les quinones à chaîne isoprénique et les tocophérols. Les carotènes (pigment rouge-orangé)[71], les xanthophylles (pigment jaune) et la vitamine A font partie des caroténoïdes. La vitamine K, les ubiquinones et les plastoquinones font partie des quinones à chaîne isoprénique. Les stéroïdes regroupent les stérols, les acides biliaires, les hormones stéroïdes et la vitamine D[72].

I.2.3.1 Tocophérols

Les tocophérols constituent une fraction mineure de l'insaponifiable des corps gras. Ce sont des composés phénoliques possédant un noyau chromane portant en carbone 2 une chaîne latérale tri-isoprénique saturée dans le cas des tocophérols et tri-insaturée dans le cas des tocotriénols (Figure I.6). Les tocophérols et tocotriénols représentent une famille très homogène de produits, constitués d'un reste hydroquinone substitué par un ou plusieurs groupes méthyles, et d'une chaîne polyisoprénique plus ou moins saturée, les huit tocophérols et tocotriénols naturels isolés diffèrent entre eux par le nombre et la position relative des méthyles sur le cycle aromatique, mais la chaîne isoprénoïde est identique dans chacune des sous-familles. On les appelle « α , β , γ , δ -tocophérols et tocotriénols» [73].

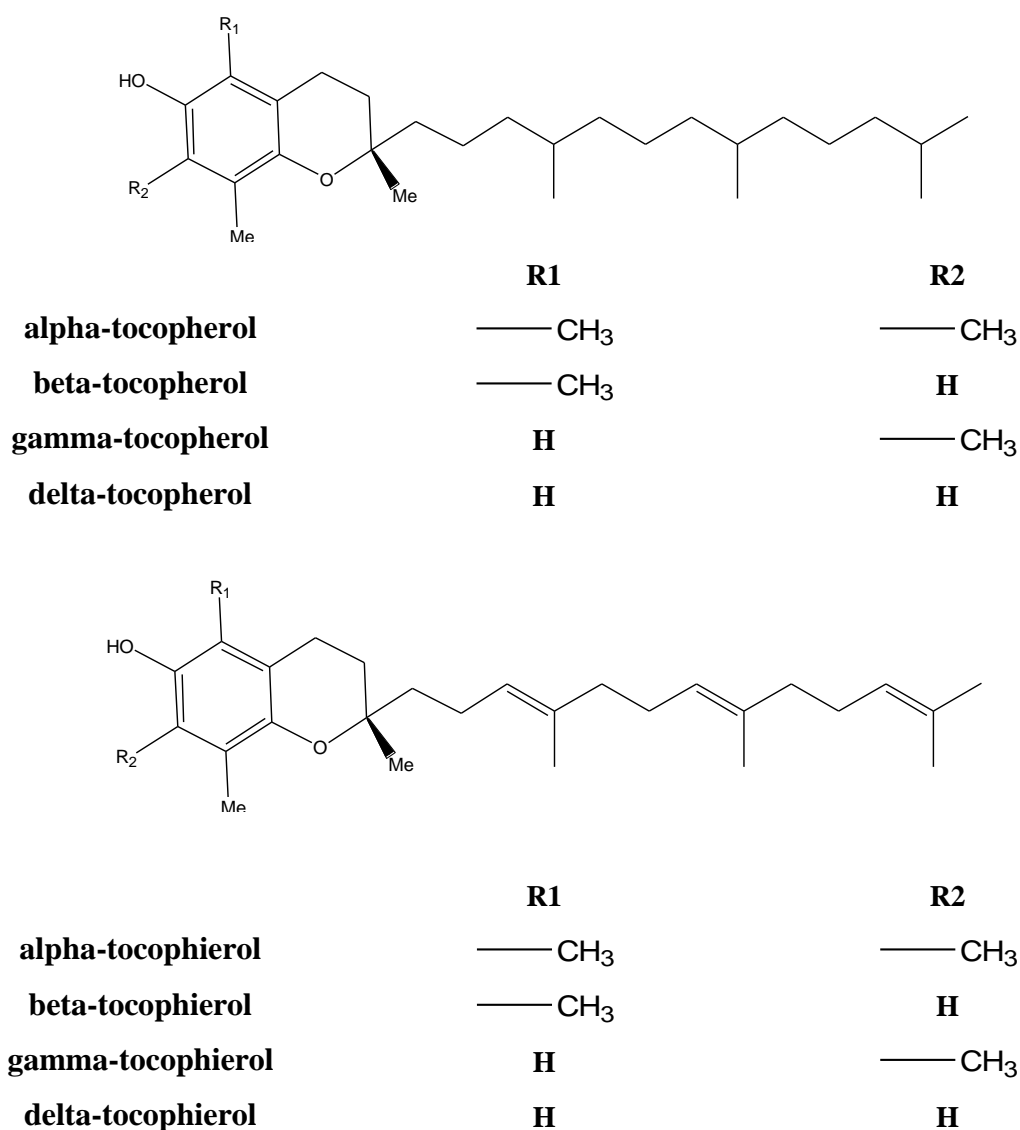


Figure I.6. Structure des différents tocophérols et tocotriénols[74].

L'activité en vitamine E est la résultante naturelle de 8 molécules dont les structures dérivent de celles des tocophérols et les tocotriénols. Chaque vitamère a une activité vitaminique différente, comparée à celle de l' α -tocophérol qui est considérée comme la forme primaire la plus active que l'on rencontre le plus fréquemment dans la nature [75]. Les β et γ -tocophérols ont une activité vitaminique réduite, alors que la forme δ est pratiquement inactive. Les tocotriénols se distinguent des tocophérols par la présence de trois doubles liaisons sur la chaîne latérale [76]

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.2.3.2 Les stérols

Ce sont des composés tétra cycliques comportant le plus souvent 27 ou 28 et même parfois 29 atomes de carbone, ils diffèrent de leurs précurseurs biosynthétiques. Le noyau tétra cyclique possède le plus souvent une double liaison localisée fréquemment en position 5, mais que l'on peut rencontrer en position 7 (Figure I.7).

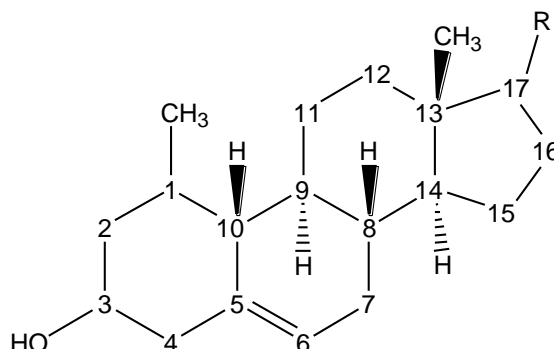


Figure I.7. Structure de Stérols

La chaîne latérale possède huit à neuf ou dix atomes de carbone ; elle peut être saturée ou comporter en 22,24(25), 24(28) ou 25(27) une ou deux doubles liaisons qui ne sont jamais conjuguées. Les stérols constituent une fraction importante de l'insaponifiable [77]. Le stérol le plus abondant dans le règne végétal et sans conteste le sitostérol, suivi du campestérol, du stigmastérol, de l'isofucostérol et dans le règne animal, on trouve le cholestérol.

I.3 Propriétés Physico-Chimique des Lipides

I.3.1 Propriétés Physiques

I.3.1.1 Point de Fusion

Le point de fusion des lipides dépend de deux critères qui sont la longueur de la chaîne et le taux d'insaturation. Une augmentation du nombre d'atomes de carbone entraîne une augmentation du point de fusion (passage à l'état liquide). A température ordinaire, les acides gras à nombre d'atomes de carbone inférieur à 10 sont liquides et ceux à nombre d'atomes de carbone supérieur à 10 sont solides.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Une augmentation du nombre de double liaison entraîne une diminution de la température de fusion [77]. Nous citons quatre exemples:

- Acide stéarique (0): $T_f = + 69 \text{ }^\circ\text{C}$
- Acide oléique (1): $T_f = + 16 \text{ }^\circ\text{C}$
- Acide linoléique (2): $T_f = - 5 \text{ }^\circ\text{C}$
- Acide linoléique (3): $T_f = - 11 \text{ }^\circ\text{C}$.

I.3.1.2 Solubilité

La solubilité des lipides est liée à leur structure où la fonction carboxylique est polaire dans l'eau (hydrophile) et la chaîne carbonée est apolaire (hydrophobe) dont leurs homologues supérieurs étant insolubles[77].

I.3.2 Propriétés chimiques

Ce sont des savons à propriétés moussantes, mouillantes et émulsionnantes. Dans l'eau, les savons se dissocient en Na^+ et R-COO^- dont l'anion qui a 2 pôles où R est hydrophobe et COO^- est hydrophile. Ces molécules appelées amphiphiles ou amphipathiques qui sont tensioactives, car elles abaissent la tension superficielle de l'eau d'où leurs propriétés. La chaîne latérale possède huit à neuf ou dix atomes de carbone; elle peut être saturée ou comporter en 22,24(25), 24(28) ou 25(27) une ou deux doubles liaisons qui ne sont jamais conjuguées. Les stérols constituent une fraction importante de l'insaponifiable [77]. Le stérol le plus abondant dans le règne végétal et sans conteste le sitostérol, suivi du campestérol, du stigmastérol, de l'isofucostérol et dans le règne animal, on trouve le cholestérol.

I.4 Les polyphénols

I.4.1 Généralités

L'appellation polyphénols ou composés phénoliques regroupe un vaste ensemble de plus de 8000 molécules, divisées en une dizaine de classes, qui présentent dans leur structure commune au moins un cycle aromatique à 6 carbones porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) [78]. Ils peuvent être regroupés en de nombreuses classes suivant la complexité du squelette de base (noyau C6), le degré de modification de ce squelette (oxydation, hydroxylation...etc.) et enfin suivant les molécules auxquelles ils sont associés (glucides, lipides, protéines, autres métabolites). Les formes les plus simples sont représentées

Chapitre I : Synthèse bibliographique

par deux principaux groupes dont dérivent de nombreux composés: les acides hydroxycinnamiques et les flavonoïdes. Les formes complexes quant à elles, sont pour la plupart issues de la condensation de certaines formes simples et renferment, entre autre, les tannins et les lignines [79].

Les acides hydroxycinnamiques ou phénylpropanoïdes sont des composés dont le noyau de base est en C6-C3. L'action de la phénylalanine ammonialase (PAL) sur la phénylalanine libère un ion ammonium et forme de l'acide cinnamique qui est à son tour hydroxylé par la cinnamate 4 hydroxylase (C4H) pour former l'acide p-coumarique qui sera à l'origine de nombreuses molécules notamment l'acide caféique, l'acide férulique et l'acide sinapique. Ces acides sont rarement présents sous formes libres, ils sont en général combinés à d'autres molécules organiques. Les liaisons se font souvent au niveau des fonctions carboxyliques, ce qui conduit à la formation d'ester. L'acide chlorogénique est l'ester de l'acide caféique le plus fréquemment rencontré (liaison avec un acide quinique en C5) [80].

les flavonoïdes sont des composés qui ont en commun la structure du diphenylpropane (C6-C3-C6); les trois carbones servant de jonction entre les deux noyaux benzéniques notés A et B forment généralement un hétérocycle oxygéné C [81, 82]. Ils constituent la classe la plus importante des polyphénols avec plus de 5000 composés [83, 84] qui peuvent être regroupés en quinze familles, dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les flavanonols, les isoflavones, les isoflavanones et les anthocyanes [82, 85]. Ils sont issus du p-coumaroyl CoA et de 3 molécules de malonyl-CoA qui forment l'hydroxychalcone comprenant 2 noyaux benzéniques. Cette transformation s'effectue avec une autre enzyme clef la chalcone synthase (CHS). La fermeture de l'hétérocycle central flavonoïdes sont d'abord définies par la structure de l'hétérocycle central et son degré d'oxydation.

Chaque classe de flavonoïdes est caractérisée par son degré de substitution par des groupements hydroxyles ou méthoxyles. De plus ces composés sont la plupart du temps liés à des sucres, généralement par une liaison glycosidique, qui est dégradable par une hydrolyse acide à chaud. Les conséquences de la glycosylation sont multiples telles que la modification de la couleur des pigments et la modification de la solubilité ou des propriétés biologiques[79].

Chapitre I : Synthèse bibliographique

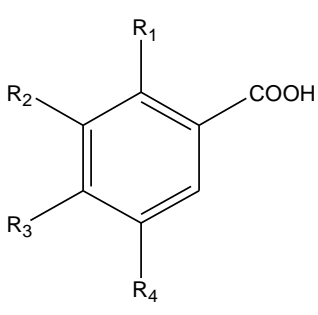
I.4.2 Principales Classes des Composés Phénoliques

I.4.2.1 Les Acides Phénoliques Simples

I.4.2.1.1 Acides Hydroxybenzoïques

Sont des dérivés de l'acide benzoïque ont une structure générale de base de type (C6-C1) Existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides Les acides hydroxybenzoïques les plus abondants sont répertoriés dans le tableau I.4 :

Tableau I.4 : Principaux acides hydroxybenzoïques [86].

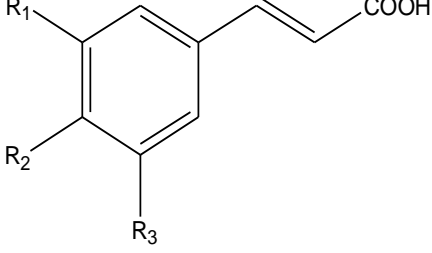
structure	R1	R2	R3	R4	Acide phénolique
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p hydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH3	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH3	OH	OCH3	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

I.4.2.1.2 Acides Hydroxycinnamiques

Dérivent de l'acide cinnamique Ont une structure générale de base de type (C6-C3) Existent souvent sous forme combinée avec des molécules organiques. Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, conduisent à une réactivité chimique importante de ces molécules, le tableau I.5 représente les principaux acides hydroxycinnamiques.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

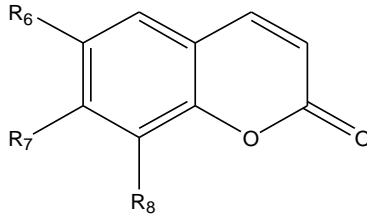
Tableau I.5 : Principaux acides hydroxycinnamiques [86]

Structure	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p-coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH3	OH	H	Acide férulique
	OCH3	OH	OCH3	Acide sinapique

I.4.2.1.3 Coumarines

Les coumarines dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale. Les coumarines ont fréquemment un rôle écologique ou biologique, le tableau I.6 représente les principaux coumarines.

Tableau I.6 : Principaux types de coumarines [79].

Structure	R6	R7	R8	Acide phénolique
	H	OH	H	Umbelliférol
	OH	OH	H	Aescultol
	OCH3	OH	H	Scopolétole
	OCH3	OH	OH	Fraxétole
	H	OH	OH	Daphnétole

I.4.3 Les Flavonoïdes

I.4.3.1 Généralités

Le nom flavonoïde proviendrait du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange [87], cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du flavus ; (flavus=jaune) [88].

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Les flavonoïdes ont été isolés par le scientifique E.Chervreul en 1814, mais ont été réellement découverts qu'en 1930 par Albert Szent-Györgyui, désignés sous le nom de vitamine P, en raison de leur efficacité à normaliser la perméabilité des vaisseaux sanguins, cette dénomination fut abandonnée lorsqu'on se rendit compte que ces substances ne correspondaient pas à la définition officielle des vitamines, il devient clair que ces substances appartiennent aux flavonoïdes [89].

Les travaux relatifs aux flavonoïdes sont multiples depuis la découverte du célèbre "french paradox" correspondant à un bas taux de mortalité cardiovasculaire observé chez les habitants des régions méditerranéennes, associant eu consommation de vin rouge à une prise importante de graisses saturées [88, 90]. Près de 4000 flavonoïdes ont été décrits [91].

I.4.3.2 Structure

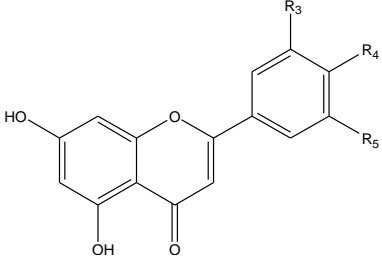
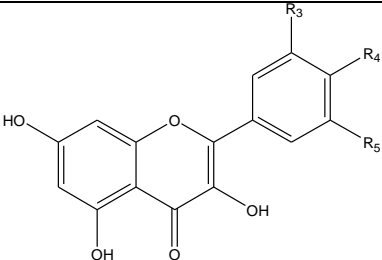
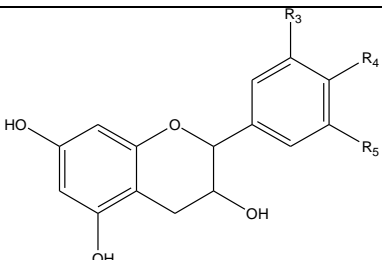
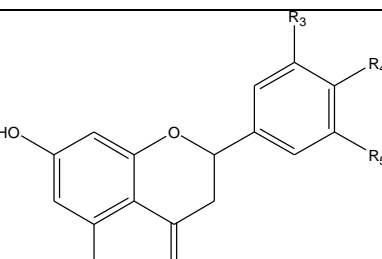
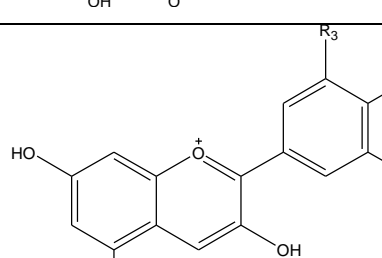
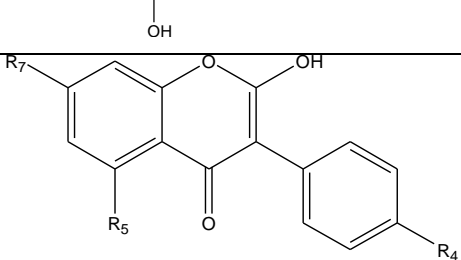
Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C3 en formant ainsi l'hétérocycle (C) [92]. Généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C6-C3-C6 [93] en formant une structure de type diphenylepropane dont des groupements hydroxyles, oxygènes, méthyles, ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule.

I.4.3.3 Classification

Les flavonoïdes sont impliqués dans de nombreuses interactions des plantes avec les conditions biotiques et abiotiques de leur environnement, ces substances sont accumulées dans différentes parties cellulaires et tissulaires de la plante durant l'organogénèse et sous l'influence de plusieurs facteurs stimulants [94] Sur le plan cellulaire. Les flavonoïdes sont synthétisés dans les chloroplastes puis migrent et se dissolvent dans les vacuoles [95], la répartition de ces composés montre des accumulations très localisées, généralement en relation avec une fonction physiologique ou avec l'interaction de la plante avec son environnement. Ainsi, les flavonoïdes qui ont une localisation épidermique ont un rôle d'écran vis-à-vis des rayonnements solaires, tandis que ceux qui sont impliqués dans les mécanismes de défense ont plutôt une localisation sous épidermique. Le tableau I.6 représente les Principales classes des flavonoïdes.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Tableau I.6 : Principales classes des flavonoïdes[95].

classe	structure	R3	R4	R5	exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	lutéoline
		OH	OCH3	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine Nargénine
Flavanones		H	OH	H	Nargénine
		OH	OH	H	Emodictyol
anthocyanidine		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	daidezine

I.5 Activité Antioxydante

L'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydo-réduction qui transfère des électrons d'une substance vers un agent oxydant. Cette réaction peut produire des radicaux libres qui entraînent des réactions en chaîne destructrices. Les antioxydants sont capables de stopper ou de retarder ces réactions en chaîne en se réduisant avec les radicaux libres et annihilant ainsi leur action. Ces propriétés sont beaucoup rencontrées dans les familles des thiols et des phénols. La protection contre les effets délétères induits par les radicaux oxygénés s'effectue à l'aide de trois types d'agents différents : les protéines non enzymatiques, les enzymes tels que le superoxyde-dismutases et les glutathion-peroxydases et enfin les antioxydants d'origine nutritionnelle tels que les caroténoïdes, les tocophérols (vitamine E), l'acide ascorbique[96].

I.5.1 Classification des Antioxydants

I.5.1.1 Antioxydants de Synthèse

Les antioxydants de synthèse englobent toutes les formulations contenant des corps gras insaturés et parfois aussi dans des phases aqueuses où se trouvent des extraits végétaux riches en oxydases[97]. Leur concentration d'utilisation est généralement dix fois plus faible que celle des conservateurs et se situe entre 0,02 et 0,05 %. Ce sont :

- Le butylhydroxytoluène (BHT)
- Le butylhydroxyisole (BHA)
- Les gallates de propyle, octyle et de dodécyle

I.5.1.2 Substances Synergiques

Ce sont des molécules qui améliorent l'action de certains antioxydants, ce qui se traduit souvent par un accroissement de la période de protection ; parmi eux on distingue l'acide lactique, tartrique et orthophosphorique et leurs sels de sodium, potassium ou calcium. Leurs propriétés peuvent s'expliquer par effet chélatant de métaux comme le fer ou cuivre dont on connaît bien l'effet pro-oxydant à faible dose. Cependant, ce n'est peut-être pas la seule explication car plusieurs de ces produits sont d'assez mauvais chélatants [97].

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.5.1.3 Antioxydants D'origine Végétale

Les plantes constituent des sources très importantes d'antioxydants. Les antioxydants naturels dont l'efficacité est la plus reconnue aussi bien dans l'industrie agroalimentaire que pour la santé humaine sont : les tocophérols, les caroténoïdes et les polyphénols. (vitamine C) et les polyphénols qui sont des antioxydants essentiels pour l'homme[97].

I.6 Torrification des noix et graines

La torrification est une opération essentielle et l'un des procédés de transformation les plus fréquents pour les noix et graines [98-100] . La torrification vise à augmenter la palatabilité du produit. Elle favorise significativement le développement de la couleur, flaveur, texture et apparence des noix et graines. Le produit résultant est raffiné et très apprécié du consommateur par comparaison au noix et graines crues [101, 102]. La torrification détruit également les microorganismes indésirables et inactive les enzymes qui favorisent la détérioration du produit au cours du stockage . De plus, la torrification peut donner naissance à des composés antioxydants, de type mélanoidines formées au cours de la réaction de Maillard. Mais les propriétés antioxydantes de ces produits peuvent être dues à la formation de structures de type phénols [103]. Ces dernières peuvent avoir des propriétés anticancérigènes associées à leurs propriétés antioxydantes (Ames, 1988). Ledl et Schleicher (1990) supposent que les réactions impliquant des radicaux oxygène contribuent à piéger ces radicaux et les transforment en composés moins agressifs.

Dans ce mode de cuisson, les températures utilisées sont en général élevées (entre 140 et 180 °C) et les produits traités sont peu hydratés, ou se dessèchent rapidement en surface [104], si bien que les réactions de Maillard sont favorisées. Cependant, l'eau en s'évaporant entraîne avec elle les molécules volatiles. La quantité d'arômes restant dans le produit dépend fortement de la capacité de rétention des constituants macromoléculaires de l'aliment. Le temps et la température sont les principaux facteurs contrôlés lors de la torrification industrielle. Ce couple temps/température joue un rôle important dans le développement de la qualité sensorielle de l'aliment, notamment dans les noix et graines, où la qualité organoleptique est le facteur clé du choix des consommateurs. Mais la teneur initiale en eau et la vélocité de l'air du chauffage affectent aussi le taux de transfert de chaleur, et par conséquence conditionnent la déshydratation et les changements physico-chimiques, en particulier des protéines [105]. Ces

Chapitre I : Synthèse bibliographique

changements rhéologiques et physico-chimiques sont à l'origine du développement des saveurs, arômes, couleur, texture, mais aussi de l'oxydation des lipides. Ils mettent en jeu glucides, lipides, protéines et micronutriments tels que les vitamines.

Les protéines peuvent se décomposer ou entrer en réactions croisées au niveau d'acides aminés souvent essentiels (lysine, cystéine, arginine), ce qui entraîne une baisse de la qualité nutritionnelle de celles-ci. Les lipides s'oxydent ou s'isomérisent, alors que les vitamines subissent des dégradations oxydatives, formant des composés réactifs qui réagissent à nouveau avec les protéines dans la réaction de Maillard. Les oligosaccharides peuvent s'hydrolyser et évoluer selon la réaction de caramélisation ou la réaction de Maillard. Par exemple, le saccharose peut s'hydrolyser en fructose et glucose [106]. Toutes ces réactions influencent les qualités nutritionnelle et organoleptique du produit fini.

CHAPITRE II

Matériels et Méthodes

Chapitre II : Matériels et Méthodes

L'objectif de notre travail vise à déterminer la composition chimique de l'huile fixe et des extraits phénoliques des graines de *Nigella sativa* L. Pour cela notre étude englobe deux aspects, dont le premier est d'ordre phytochimique basé principalement sur l'extraction et l'analyse de l'huile fixe et des polyphénols par l'utilisation des différentes techniques chromatographiques et colorimétriques. Il porte également sur l'évaluation de leurs activités antioxydantes et antimicrobiennes. Le second aspect est consacré à l'étude de l'effet de rôtissage sur la composition chimique et le pouvoir antioxydant de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L.

II. Matériels et Méthodes

II.1. Matériels

II.1.1. Produits chimiques

Tous les solvants et les réactifs étaient de la plus grande pureté requise pour chaque application. Hexane, acétone, méthanol, acétate d'éthyle, acide orthophosphorique, chlorure d'aluminium, sulfate d'ammonium, sulfate de sodium, vitamine E, acide linoléique, radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH, 98%), hydroxytoluènebutylé (BHT), l'hydroxyanisolebutylé (BHA) et les étalons (acide gallique, catéchine, acide vanillique, épicatechine, acide coumarique, apigénine, rutine, quercétine, kaempférol) ont été achetés chez Sigma-Aldrich (SARL Prochima-Sigma, Tlemcen, Algérie). Le β -carotène et le Tween 20 ont été achetés chez Flucka (Buchs, Allemagne).

II.1.2. Microorganismes

Les souches microbiennes utilisées sont *Escherichia coli* ATCC 10536, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, levure *Candida albicans* ATCC 10231.

II.1.3. Matériel végétal

Les graines de *Nigella sativa* L., obtenues sur les marchés d'Arabie Saoudite, constituent la partie de la plante utilisée dans cette étude. Les graines ont été broyées dans un broyeur afin d'obtenir une poudre.

Chapitre II : Matériels et Méthodes

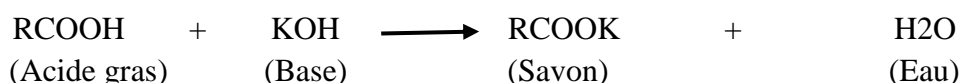
acides gras et des triglycérides déterminés par l'indice de saponification (I.S) et sur la teneur en acides gras libres par la détermination de l'indice d'acide (I.A). Nous avons également déterminé la teneur en l'huile en matières insaponifiables et quelques caractéristiques physiques telles que l'indice de réfraction et la densité[107].

a) Indice d'acide

L'acidité est le pourcentage d'acides gras libres contenus dans un corps. L'indice d'acide représente le nombre de milligramme d'hydroxyde de potassium nécessaire pour neutraliser les acides gras libres dans 1g de corps gras[107]. Il est exprimé en mg/g.

➤ Principe

Le principe de la détermination de l'acidité d'une huile consiste en un dosage acido-basique correspondant à la neutralisation dont le schéma réactionnel est le suivant :



➤ Mode opératoire

Dissoudre la prise d'essai 0.5 g d'huile dans 5 ml du solvant organique hexane. Titrer, en agitant avec la solution éthanoïque d'hydroxyde de potassium à 0,1 mol/l jusqu'au virage de l'indicateur (coloration rose de la phénolphthaléine persistant durant au moins 10 secondes) le calcul de l'indice d'acide

$$x = \frac{N \times V \times 56.1}{m}$$

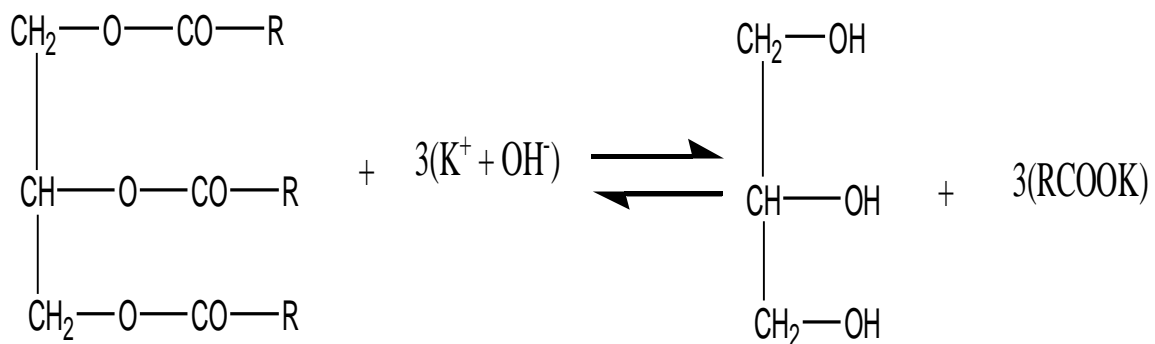
V : le volume en ml de soude utilisé pour le titrage ; N : normalité de la solution de hydroxyde de potassium ; m : la masse en gramme de la prise d'essai ; 56,1 : masse molaire de KOH.

Chapitre II : Matériels et Méthodes

b) Indice de saponification

➤ Principe

L'indice de saponification est le nombre en milligrammes de potasse caustique (KOH), nécessaire pour transformer en savon les acides gras et les triglycérides d'un gramme de corps gras[107].



La détermination de l'indice de saponification est réalisée par la norme (AFNOR. NF T60-206). Une quantité d'un gramme d'huile est saponifiée à reflux par 25 ml de KOH éthanolique (0,5N) pendant une heure. L'excès du KOH est neutralisé par de l'acide hydrochlorique (0,5N) en présence de phénophtaléine comme indicateur coloré. Un essai à blanc est réalisé dans les mêmes conditions sans l'huile[107]. L'indice de saponification est calculé par la relation suivante :

$$I.S = \frac{(V_0 - V_1) \times N \times 56.1}{m}$$

V_0 : volume de HCl en ml dans le test à blanc en ml ; V_1 : volume de HCl en ml nécessaire pour neutraliser l'excès de la potasse ; m : masse d'huile prise en gramme ; N : la normalité de la solution potassique ; 56,1 : masse molaire de KOH.

c) Indice de réfraction η^{27}

L'indice de réfraction est le rapport de la vitesse de la lumière dans l'air à sa vitesse dans la substance examinée. Il est défini comme le sinus de l'angle d'incident divisé par le sinus de

Chapitre II : Matériels et Méthodes

l'angle de réfraction lorsque le rayon lumineux passe de l'air dans la substance. La détermination de cet indice est donnée par lecture directe sur le réfractomètre à température ambiante (27°C).

d) La densité d^{27}

La densité ou densité relative d'un corps est le rapport de sa masse volumique à la masse volumique d'un corps pris comme référence. Le corps de référence est l'eau pure à 27°C. Ce paramètre est calculé à l'aide d'un densimètre électronique portable (le DMA 35 N).

II.2.1.3. Préparation et analyse des EMAGs dans l'huile fixe

Quarante milligrammes d'huile fixe ont été méthylés avec 3 mL de HCl 60 g.L⁻¹ dans le méthanol à 75-80 °C pendant 2 h. Les EMAGs ont été extraits avec 2 ml d'hexane et séchés par du sulfate de sodium [108]. Un microlitre de EMAG a été analysé avec un chromatographe en phase gazeuse Agilent série 7890 (Agilent Société) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et Injecteur automatique 7683B. Une colonne capillaire en silice fondue DB23 (60 m 9 0,25 mm de diamètre, épaisseur de film de 0,25 μ m; J& W Scientific, Folsom, CA) a été utilisée. La température du four a été programmée comme suit : 140 ° C pendant 5 min, augmenté à 240 ° C à 3 ° C min⁻¹, et maintenu à 240 ° C pour 10 minutes. Les températures de l'injecteur et du détecteur étaient chacune maintenues à 250 ° C, le gaz porteur était de l'hélium, le débit était 30 ml min⁻¹ et le rapport de division était de 1/30. L'identification des EMAGs était basée sur les temps de rétentions par rapport à ceux du mélange EMAGS standard [109]. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de la surface du pic sans aucune correction. L'analyse des acides gras a été effectuée en triple pour chaque échantillon.

II.2.1.4. Dosage des Stéroïdes par UV-visible

Ils s'agit d'une absorption spectrophotométrique suivant le test de Liebermann-Burchard [110] basé sur une réaction colorée spécifique des 3 β -hydroxystéroïdes possédant une double liaison en position 5-6. Les stéroïdes forment un complexe stable avec l'anhydride acétique en milieu acide qui absorbe dans le visible à une longueur d'onde de 550 nm. Le réactif spectral de Liebermann est constitué par 60 ml d'anhydride acétique et 10 ml d'acide sulfurique concentré et 30 ml d'acide acétique.

A partir d'une solution chloroformique du cholestérol, de concentration 1g/L, nous avons préparé une série de gamme de solutions afin de tracer une courbe d'étalonnage liant la densité optique en fonction de concentration. On prend 1ml de chaque solution et on ajoute 2ml du réactif de Liebermann puis on laisse la coloration se développer et se stabiliser pendant 25 min.

Chapitre II : Matériels et Méthodes

On mesurant l'absorbance à 550 nm de chaque solution, nous obtenons la courbe d'étalonnage. L'échantillon est traité de la même manière et la teneur en stérol sera déterminée à partir de la courbe d'étalonnage.

II.2.1.5. Analyse des Tocophérols

II.2.1.5.1. Dosage spectrophotométrique des tocophérols

Nous avons adopté la méthode de dosage colorimétrique d'Emmerie-Engel [111] Cette méthode colorimétrique est basée sur la réaction d'oxydoréduction entre les tocophérols et le fer ferrique (Fe^{3+}) qui est réduit en fer ferreux (Fe^{2+}). Ce dernier, en présence de réactifs spécifiques comme l'orthophénantroline, forme un complexe rouge-orangé stable dont le coefficient d'extinction molaire à 510 nm et est très élevé. Ce dosage peut être réalisé soit à partir de l'insaponifiable [112], soit à partir de l'huile [113].

Chacun de ces dosages a ses avantages et inconvénients. Lorsque l'on effectue l'analyse à partir de l'huile brute, on ne tient pas compte des composés tocophéroliques engagés dans des combinaisons de type esters. En effet, la réaction d'oxydo-réduction, conduisant à des composés de type quinonique, ne peut avoir lieu. L'analyse effectuée ne tient compte que des tocophérols libres. Dans le cas du dosage à partir de l'insaponifiable, on dose les tocophérols totaux, initialement libres et estérifiés.

Lors des différentes manipulations nécessaires, une dégradation partielle de ces composés peu avoir lieu, sauf cas particulier des huiles végétales pauvres en esters tocophéroliques. En fin de compte, les deux méthodes de dosage donnent des résultats assez proches.

Une droite d'étalonnage tracée à partir d' α -tocophérol commercial, permet de relier la densité optique et la concentration de tocophérol exprimée en $g.L^{-1}$. A partir d'une solution commerciale de la vitamine E, nous avons préparé dans l'hexane des solutions ayant des concentrations bien déterminées, 1ml de chaque solution fille plus 1ml de réactif (Ortho-phénantroline) et 0.5ml $FeCl_3$ (solutions éthaloniques). Après 3min on mesure l'absorbance à 510 nm. Nous avons effectué le dosage des tocophérols totaux à partir des extraits sur l'huile extraite de la même manière et la teneur en tocophérols totaux sera déterminée à partir de la courbe d'étalonnage.

II.2.1.5.2. Dosage des tocophérols par CLHP

La composition en tocophérol des échantillons a été déterminée comme suit: décrit par Karabulut et al [114]. CLHP en phase normale a été utilisé pour analyser les tocophérols en utilisant un ThermoFinnigan Système CLHP intégré avec un échantillonneur automatique

Chapitre II : Matériels et Méthodes

incluant régulateur de température pour la colonne (Spectra System AS3000), un système de dégazage (Spectra System SCM1000), et une pompe à gradient quaternaire (Spectra System P4000) (ThermoFinnigan, San Jose, CA). La séparation chromatographique a été réalisée avec une colonne Luna Silica (250 mm \times 4,6 mm, 5 μ m ; Phenomenex, Torrance, CA), et la température de la colonne est maintenue à 30 ° C. La séparation des tocophérols était basé sur une élution isocratique avec n-hexane: isopropanol (99: 1) à 1 ml min⁻¹. L'injection le volume des échantillons était de 20 μ L. L'éluant a été surveillé à 292 nm en utilisant un Spectra System UV6000LP détecteur à photodiodes (ThermoFinnigan, San Jose, CALIFORNIE). Les composés ont été identifiés en comparant leurs temps de rétention et spectre UV avec des normes authentiques. Les tocophérols ont été quantifiés sur la base des aires de pics comparées avec des normes externes. L'analyse au tocophérol a été effectuée en trois points pour chaque échantillon[109].

II.2.2. Extraction et dosage des polyphénols

II.2.2.1. Extraction des polyphénols de l'huile fixe

Pour extraire les composés phénoliques (figure II.2), 0,5 g d'huile a été pesé dans un tube à essai en verre et 4 ml de méthanol : eau (80:20, v / v) mélange a été ajouté. Le tube a été vortexé pendant 1 min et la couche aqueuse a été recueillie après centrifugation à vitesse de 3000 rpm. Cette procédure a été répétée trois fois et les extraits aqueux ont été combinés. Pour Enlever l'huile résidu, les extraits ont été lavés deux fois avec 2 ml d'hexane. On obtient donc l'extrait hydro-methanolique brut. Après élimination du méthanol de l'extrait précédant, la phase aqueuse restée est ensuite lavée plusieurs fois avec un même volume d'acétate d'éthyle en présence d'un mélange de deux solutions aqueuses de 2% de sulfate d'ammonium et de 2% d'acide orthophosphorique.

L'extrait organique ainsi obtenu est évaporé à sec après séchage par le sulfate de sodium anhydride[109]. Les extraits phénoliques ainsi obtenus présentent généralement un aspect visqueux de couleur marron jaunâtre. Le résidu est repris dans 10 ml de méthanol pur et conservé à 5°C donnant l'extrait phénolique purifié.

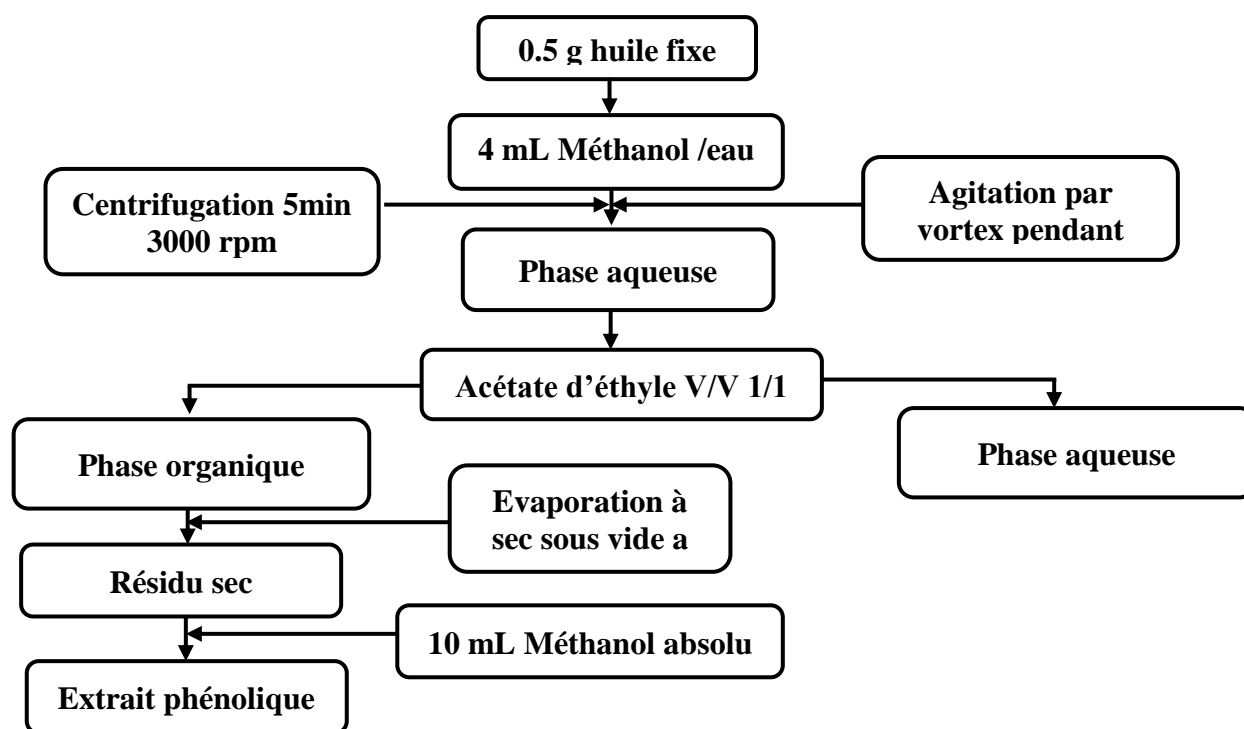


Figure II.2 : schéma d'extraction des polyphénols de l'huile fixe de *Nigella sativa* L.

II.2.2.2. Extraction des composés phénoliques des tourteaux.

Après délipidation des graines séchées, un broyage fin en a été effectué. 5g de la poudre ainsi obtenue est macérée dans 100 ml de chaque mélange : hydro-alcoolique (méthanol/eau) (7/3 : V/V) et hydro-cétonique (acétone/eau) (7/3 : V/V) pendant 72 heures à température ambiante. L'extrait est filtré. On obtient donc l'extrait hydro-cétonique et l'extrait hydro-méthanolique brut. Après élimination de l'acétone et du méthanol des extraits précédant, la phase aqueuse restée est ensuite lavée plusieurs fois avec un même volume d'acétate d'éthyle en présence d'un mélange de deux solutions aqueuses de 2% de sulfate d'ammonium et de 2% d'acide orthophosphorique. L'extrait organique ainsi obtenu est évaporé à sec après séchage par le sulfate de sodium anhydride. Les extraits phénoliques ainsi obtenus présentent généralement un aspect visqueux de couleur marron jaunâtre. Le résidu est repris dans 10 ml de méthanol pur et conservé à 5°C donnant l'extrait phénolique purifié.

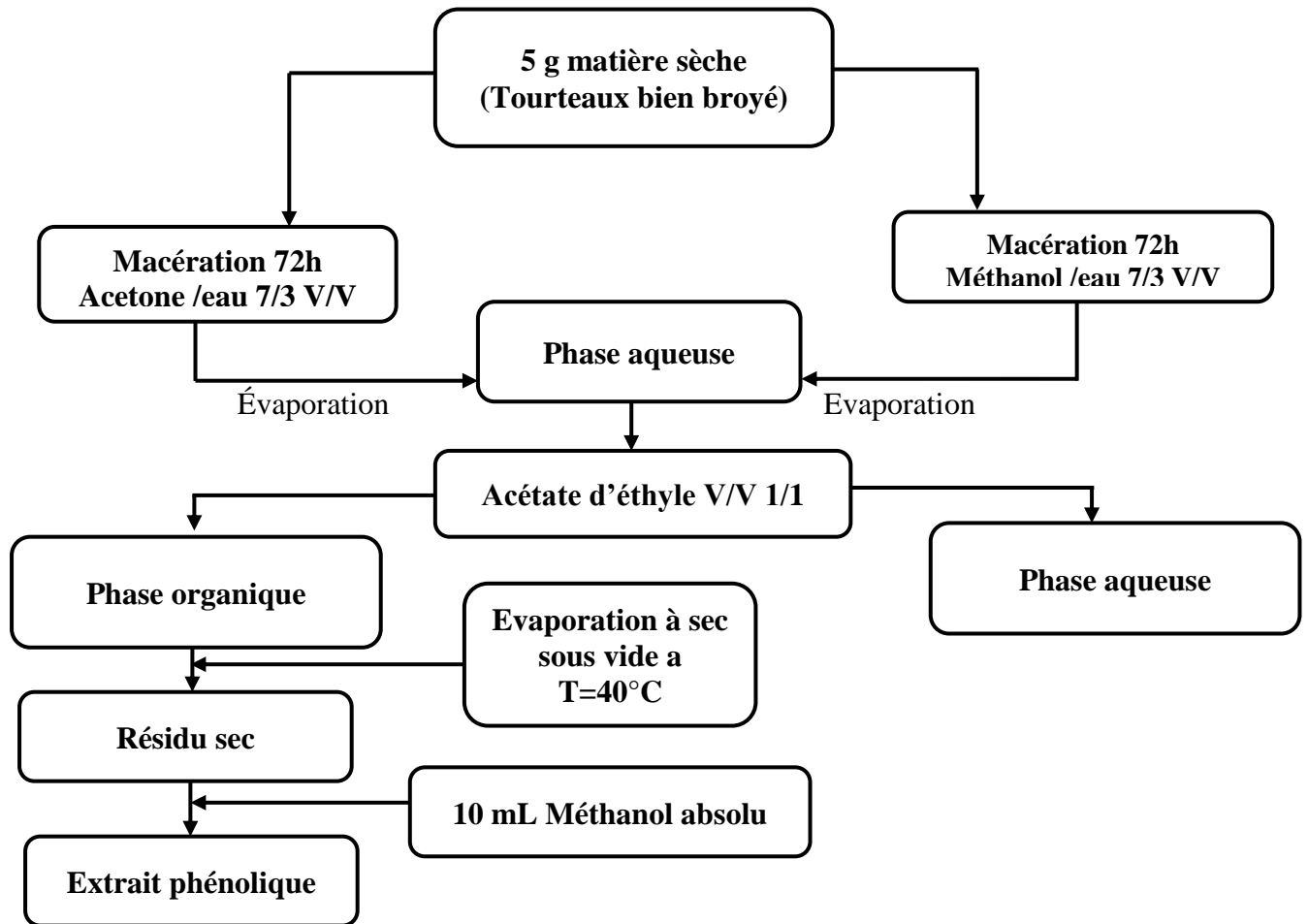


Figure II.3 : schéma d'extraction des polyphénols des tourteaux de *Nigella sativa* L.

II.2.2.3. Dosage spectrophotométrique des phénols totaux

Le dosage des phénols totaux a été effectué par une méthode adaptée de Singleton et Ross. En [115] milieu basique, le réactif de Folin-Ciocalteu oxyde les groupements oxydables des composés polyphénoliques présents dans l'échantillon. Les produits de réduction de couleur bleue, présentent un maximum d'absorption dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon. La concentration massique des constituants utilisés dans la préparation des réactifs, a été optimisée pour obtenir la réponse analytique la plus linéaire possible en respectant le rapport réactifs/polyphenols totaux. Pour réaliser ce dosage, en bref, 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué à dix et 1 mL de Na_2CO_3 à 2% a été ajouté à 1 mL d'extrait polaire de l'huile diluée de manière appropriée dans l'eau. L'absorbance à 760 nm a été mesurée après 1 heure d'incubation à température ambiante et les résultats exprimés en équivalent d'acide gallique (GAE).

Chapitre II : Matériels et Méthodes

II.2.2.4. Détermination de la teneur totale en flavonoïde

La teneur totale en flavonoïdes des extraits a été déterminée spectrophotométriquement en utilisant le colorimètre trichlorure d'aluminium méthode légèrement modifiée[116]. En bref, une solution méthanolique de l'extrait (1 mg / ml) a été mélangée avec 0,3 ml d'une solution à 5% (p / v) de nitrite de sodium (NaNO₂). Après 5 minutes, 0,3 ml d'une solution de trichlorure d'aluminium à 10% (AlCl₃) a été ajouté au mélange. Puis, après 6 min, On a ajouté 2 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) de 1M, puis le volume du mélange réactionnel a été complété à 10 ml avec de l'eau distillée et vortexée pendant 10 s. L'absorbance a été mesurée à 510 nm après que la couleur rose a été développée en utilisant Spectrophotomètre UV – vis. Une courbe d'étalonnage a été établie avec la catéchine en standard à différentes concentrations. Les résultats ont été exprimés en mg d'équivalents de catéchine (CE) / g d'extrait sur poids sec (poids sec). Toutes les mesures étaient prises en triple et les valeurs moyennes ont été enregistrées[116].

II.2.2.5. Dosage des polyphénols par CLHP

L'analyse qualitative et quantitative du composé phénolique de l'extrait acétonique et méthanoliques de graines de *Nigella sativa* L. ont été effectuées sur un système de CLHP analytique Varian modèle Pro Star 230 (Varian Associates, Walnut Creek, Californie, USA) équipé d'une pompe ternaire (modèle Q2 Pro Star 230) et d'un détecteur à réseau de photodiodes (modèle Prostar 335) . La séparation par CLHP des composés actifs a été effectuée sur une colonne HPLC en phase inverse C-18 (Zorbax, 30 cm x 4,6 mm, taille de particule de 5 µm). L'élution a été effectuée en utilisant un système binaire constitué du solvant A (acétonitrile) et du solvant B (solution d'acide acétique glacial à 2% (pH = 2,6)) fournie par Sigma-Aldrich (Allemagne). Le programme de gradient a été utilisé comme suit : 0-5 min: 5% A et 95% B, 25-30 min: 35% A et 65% B, 35-45 min: 70% A et 30% B avec un débit de 0,9 ml / min.

Le volume d'injection était de 20 µL et la détection a été réalisée à 280 et 360 nm. L'identification des pics a été confirmée en comparant leurs temps de rétention avec des standards purs et quantifiés en comparant les aires des pics dans les chromatogrammes des échantillons avec ceux normes (acide gallique, catéchine, acide vanillique, épicatechine, acide coumarique, apigénine, rutine, quercétine, kaempférol) dans les même conditions [117].

Toutes les mesures ont été effectuées en triple, exprimant le résultat sous forme de valeurs moyennes ± écart type de microgrammes de composé phénolique / g de poudre de graines de *Nigella sativa* L. des conditions.[118]

Chapitre II : Matériels et Méthodes

Dans le test du DPPH, le mécanisme principal d'action des composés phénoliques est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH• qui se transforme en une molécule stable DPPH. La capacité à fixer des radicaux libres, donc à arrêter la propagation de la réaction en chaîne ne peut être mesurée directement, mais par contrôle de l'effet de la réactivité. Plusieurs facteurs influent sur le potentiel antioxydant et la cinétique de réduction, notamment les conditions de la réaction (temps, rapport Antioxydant / DPPH•, type de solvants, pH). Le DPPH est initialement violet, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie (Figure.III.2). Cette décoloration est représentative de la capacité des extraits à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques. Ce test permet alors, d'obtenir des informations sur le pouvoir antiradicalaire direct de différentes substances de nos extraits.

La capacité piégeage du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) par les extraits étudiés a été déterminée en fonction de la méthode d'Espin et al.[120]. 100 µL de l'échantillon à différentes concentrations est ajoutée à 2,9 mL de la solution de DPPH (0,033 g · L⁻¹). Un contrôle négatif a été préparé en mélangeant 100 µL de méthanol avec 2,9 mL de la solution de DPPH. L'absorbance résultante était mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VIS (OPTIZEN 2120UV, Korea) à 520 nm ,après 30 min d'incubation dans l'obscurité et à température ambiante. Nous avons utilisé le BHA et le BHT comme référence ; le test est répété 3 fois.

Les mesures de la diminution de l'absorbance du radical DPPH provoquée par la présence des extraits après 30 minutes ont permis de déterminer le pouvoir antioxydant des différents extraits. Le pouvoir d'inhibition (I) a été exprimé en présence de différentes dilutions (I% en fonction de la concentration après 30 min d'incubation à température ambiante. Le pouvoir d'inhibition est calculé à partir de la relation suivante.

$$I \% = \frac{(A_0 - A_i)}{A_0} \times 100$$

I% : pourcentage d'inhibition

A₀ : absorbance de la solution de DPPH en absence de l'extrait réducteur

A_i : absorbance de la solution de DPPH en présence de l'extrait réducteur après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité

Chapitre II : Matériels et Méthodes

II.2.3.1.2. Test de blanchiment du β -carotène

Cette méthode consiste à mesurer à 470 nm la décoloration du β -carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique. La dispersion d'acide linoléique et de β -carotène dans la phase aqueuse a été préparée avec Tween 20. L'oxydation de l'acide linoléique est catalysée par la chaleur (50 ° C). L'ajout d'antioxydants purs ou d'extraits de plantes induit un retard dans la cinétique de décoloration du β -carotène [121]. L'étude de l'activité antioxydante par la méthode de décoloration du β -carotène a été réalisée par le protocole expérimental décrit par Ozsoy et al [109].

Pour préparer l'émulsion de β -carotène, 2 mg de ce dernier sont dissous dans 10 ml de chloroforme, puis 1 ml de cette solution est mélangé à 40 mg d'acide linoléique purifié et 400 mg de Tween 20. Ensuite, le chloroforme est évaporé sous pression réduite par un évaporateur rotatif et le résidu obtenu est repris dans 50 mL d'eau distillée. Des tubes contenant 3 mL de cette émulsion sont préparés, pour lesquels 50 μ L d'extraits préparés ou d'antioxydants de référence (BHA) à différentes concentrations sont ajoutés. Le mélange est bien agité, et la lecture de l'absorbance à 470 nm est immédiatement effectuée à t_0 contre un blanc qui contient l'émulsion sans β -carotène. Les tubes couverts sont placés dans un bain d'eau réglé à 50 ° C et la lecture de l'absorbance est effectuée toutes les 15 minutes pendant 120 minutes. Un contrôle négatif est réalisé en parallèle, comprenant 3 mL de l'émulsion de β -carotène et 50 μ L de méthanol. Les résultats obtenus sont exprimés en termes de pourcentage d'inhibition de la décoloration du β -carotène en employant la formule suivante :

$$\% I = \left(1 - \frac{A_0 - A_{120}}{A_{c0} - A_{c120}} \right) \times 100$$

A_0 : absorbance de l'échantillon à t_0 .

A_{120} : absorbance de l'échantillon après incubation de 120 minutes.

A_{c0} : absorbance du contrôle négatif à t_0 .

A_{c120} : absorbance du contrôle négatif après incubation de 120 minutes.

Chapitre II : Matériels et Méthodes

II.2.3.2. Activity antimicrobienne

➤ Microorganismes

Les souches microbiennes utilisées sont Escherichia coli ATCC 10536, Bacillus subtilis ATCC 6633, Staphylococcus aureus ATCC 6538, levure Candida albicans ATCC 10231.

➤ Préparation des suspensions bactériennes

Les suspensions bactériennes sont préparées 24 h avant l'ensemencement afin d'atteindre une concentration moyenne de $1 \text{ à } 2 \times 10^6$ CFU/ml (Colonies Forming Units par ml) ou bactéries/ ml de sorte à obtenir des colonies juste confluentes. Il est obtenu à partir d'une culture d'environ 24 heures (en phase stationnaire) sur gélose non inhibitrice. L'ajustement de la concentration de l'inoculum de $1 \text{ à } 2 \times 10^6$ CFU/ ml (bactéries/ ml) est essentiel pour la qualité de l'analyse. Pour cela, nous avons prélevé sur une gélose nutritive quelques colonies de la bactérie à étudier et émulsionner dans un tube en verre contenant 5 ml du milieu de suspension (milieu de gélose nutritif liquide). Puis nous avons ajusté la concentration à la valeur requise par dilution en utilisant de l'eau physiologique[122].

➤ Ajustement de la concentration de l'inoculum

Nous avons placé environ 2 ml de la suspension bactérienne dans la cuve du photomètre réglé à 550 nm. Selon les espèces bactériennes, une DO (densité optique) de 0.10-0.12 correspond à $1-3 \times 10^8$ bactéries/ ml. La suspension est ajustée à une DO de 0.12 comme précédemment indiqué jusqu'à avoir la concentration requise (10^8 CFU/ ml) pour les bactéries et (10^5 CFU/ ml) pour les champignons [123].

➤ Préparation du milieu gélose nutritif

Environ 26 g gélose nutritif sont pesés puis dissous dans 1 l d'eau distillée, la solution obtenue est ensuite stérilisée à l'autoclave. Le milieu est refroidi, ensuite coulé (environ 20 ml du milieu préparé dans chaque boîte de Pétri jusqu'à la solidification), les boîtes sont séchées sous laminoir (flux à air stérile). Environ 10 billes de verres stériles sont ajoutées dans chaque boîte de Pétri[123].

Chapitre II : Matériels et Méthodes

➤ Conditions d'incubation

Le gélose nutritive est utilisé comme un milieu de culture pour les bactéries, incubé pendant 24 heures à 37 ° C et les levures ont été cultivées dans de la gélose de dextrose Sabouraud (SDA ; 4 % de dextrose , 2% neopeptone et 1.7 % d'agar) pendant 24-48 h à 30 [124].

➤ Mode opératoire

L'aromatogramme est basé sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme. Il présente l'avantage d'être très flexible dans le choix des produits à tester et à appliquer à un grand nombre d'espèces bactériennes [125]. Nous utilisons des disques de papier filtre de 9 mm de diamètre imprégnés d'extraits méthanoliques et acétoniques. Nous déposons ces disques à la surface d'un milieu d'agarensemencé à la surface avec une suspension bactérienne. L'incubation est effectuée dans un four (Mettler, Allemagne) à 37 ° C pendant 24 heures pour les bactéries et à 25 ° C pendant 48 heures pour les levures [126]. L'absence de croissance microbienne entraîne un halo translucide autour du disque dont le diamètre est mesuré et exprimé en millimètres. La boîte de contrôle présente un disque non trempé par l'extrait. Une autre boîte d'échantillons, sans disque, estensemencée dans les conditions de l'expérience. Il nous parle de l'homogénéité du tapis bactérien.

II.2.4. Etude de l'effet de rôtissage sur la composition chimique et l'activité biologique de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L.

II.2.4.1. Introduction

Le processus de torréfaction est l'étape clé pour faire de l'huile végétale, depuis la couleur, la saveur, La composition et la qualité de l'huile sont toutes influencées par les conditions du processus. Certains chercheurs [127] signalés que la composition chimique d'une huile est indépendante de la température de torréfaction utilisée. Cependant, peu une enquête a été menée sur les effets de torréfaction sur la composition chimique ou la stabilité à l'oxydation d'huile de *Nigella sativa* L. Les graines de *Nigella sativa* L. grillées ont été étudiées comme aliment médicamenteux par le fameux médecin ibn sina. L'objectif de cette étude était d'enquêter sur les changements induits par la torréfaction dans la composition en acides gras, tocophérols, stérols, polyphénol et l'activité biologique de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L.

Chapitre II : Matériels et Méthodes

II.2.4.2. Préparation des échantillons

Dans ce travail nous avons voulu étudié un facteur important celui de torréfaction (rôtissage) et leur influence sur la composition chimique, les propriétés physico-chimique et l'activité biologique de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. Le temps et la température sont les principaux facteurs contrôlés lors de la torréfaction dans ce contexte on a fixé comme but l'étude cinétique du rôtiage des graines de *Nigella sativa* L. Pour ce faire Un échantillon de 100 g a été étalé sur un plateau en aluminium pour assurer une épaisseur de 1 cm et placé dans un four réglé à 180 C. Les échantillons rôtis pendant 5, 10, 15, 20 et 30 min ont été immédiatement refroidi à la température ambiante et stocké à 4 °C dans des sacs en plastique. Les échantillons non grillés ont également été stockés dans les mêmes conditions. Les huiles ont été extraites des graines par solvant (hexane) à chaud à l'aide de dispositif de soxhlet et conservés dans des récipients en verre à 4 °C jusqu'à utilisation pour déterminer leurs composition chimique (par des méthodes chromatographiques et colorimétriques) et leurs activité antioxydante.

Chapitre III

Résultats et

Discussions

Chapitre III : Résultats et Discussions

III.1.Extraction et analyse de l'huile fixe

III.1.1.Teneur et caractéristiques physico-chimiques de l'huile fixe

Les huiles des graines de *Nigella sativa* L. ont une couleur jaune brunâtre. Cela peut être lié à la capacité de solvant organique pour extraire la plupart des pigments liposolubles et des oléorésines présentes dans les graines de *Nigella sativa* L. Ces huiles sont liquides à température ambiante avec une odeur agréable. Le pourcentage des huiles dans les graines est de 15,2% (m/m)(tableau III.1). Cette valeur est faible par rapport aux valeurs rapportées par d'autres chercheurs 22.0% [128], 34.8% [36] et 34.9% [129]. Ces variations pourraient être expliquées par la diversité de maturité et phénotype du sujet étudié ou par les différentes méthodes d'extraction et aux différents modes de traitement de la matière végétales.

Tableau III.1 : Propriétés physiques et chimiques de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L.

Propriétés	Valeurs déterminées	Valeurs rapportées dans la littérature		
		1	2	3
Teneur en huile (%)	15.2	22.0	34.9	34.8
d (g/cm ³) à 27°C	0.8890 ± 0.0005	nd	nd	0.8 ± 0.0001
η^{27}	1.4568 ± 0.0003	(1.4714–1.4724)	(1.4723–1.4735)	1.4732 ± 0.0001
I.A (mgKOH/g)	10.5518 ± 0.2450	11.0 ± 0.0	(6.3–8.1)	(7.2–11.6)
I.S (mg (KOH)/g)	143.3330 ± 2.7044	(195–210)	nd	203 ± 3.0

d : densité ; η^{27} : indice de réfraction ; I.A : indice d'acide ; I.S : indice de saponification ;
qnd : non déterminé ;1 :[128] ;2 :[129] ;3 :[36]

Les constantes physiques de l'huile fixe nous donnent des informations préliminaires sur les structures chimiques ainsi les fonctions chimiques qui peuvent être renfermées dans la structure des lipides. L'indice de réfraction est utilisé pour mesurer la variation de l'insaturation dans les huiles après l'hydrogénation.

L'indice de réfraction des huiles dépend de leurs masses moléculaires, la longueur de la chaîne des acides gras, le degré d'insaturation et le degré de la conjugaison [130]. La valeur de l'indice de réfraction de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. est estimée à 1.4568 elle est inférieure à celle rapportée par d'autres chercheurs 1.4714 [128], 1.4723 [129] et 1.4732 [36].

Chapitre III : Résultats et Discussions

Cette différence elle peut être expliquée par la diversité de maturité, phénotype du sujet étudié et le solvant utilisé dans l'extraction.

La valeur de la densité apparente de huile fixe 0.887 g/cm^3 était plus élevée que celui mentionné dans la littérature (0.80 g/cm^3) [36]. Il est évident que cette différence est imposée par les conditions et la nature des graines utilisées dans l'étude. Cette valeur elle inférieure à celle des huiles d'olive ($0,910 \text{ g/cm}^3$).

L'indice d'acidité est une mesure précieuse de la qualité de l'huile. L'huile de faible acidité est la plus souhaitable à recommander pour la consommation. Dans notre cas l'indice d'acidité est de 10.5518% cette valeur elle est similaire à celle rapportée par la littérature [128] et [36] par contre elles sont inférieures à ceux déterminés par [131] et [132]. L'acidité élevée de l'huile peut être liée à la graine de nigelle, alors que de nombreuses graines oléagineuses, comme l'olive, la palme et le son de riz, contiennent une acidité élevée.

L'indice de saponification est un indicateur de la masse moléculaire des acides gras et des triglycérides ainsi la longueur de chaîne de carbone qui contient l'huile. Il est inversement proportionnel à la masse moléculaire de l'huile. La valeur obtenue de l'indice de saponification de l'huile étudiée est de $(143.3330 \pm 2.7044 \text{ mg KOH/g})$. Cette valeur elle est inférieure que celle rapportée par Abdel-Aal et Attia, elle n'appartient pas à la fourchette (195-200) ou la plus part des huiles des graines ont un indice de saponification qui appartient à cet intervalle [133]. Cet résultat indique que l'huile des graines de *Nigella sativa* L. étudiées contiennent des acides gras avec des courtes chaînes de carbone comparativement aux graines des huiles de Noix de coco (248-265) et de Palme (230-254) [134].

III.1.2. Analyse des acides gras dans l'huile

L'analyse des acides gras nous permet de évaluer la stabilité et la qualité nutritionnelle des huiles étudiées. Un degré d'insaturation d'huile plus élevé le rend plus sensible à la dégradation par oxydation [135]. La composition d'acide gras varie en fonction de plusieurs facteurs, notamment la variété, zone de culture, le climat et la maturité des graines [136].

L'analyse par chromatographie phase gazeuse (annexe figure : 1) a révélé l'existence de onze acides gras. Les proportions individuelles de chaque acide gras dans les huiles sont mentionnées dans le tableau III.2. Les principaux acides gras saturés de l'huile de graines de nigelle étaient l'acide palmitique (C16: 0) et stéarique (C18: 0) qui représentent une proportion totale $21,536\%$, toutefois l'acide oléique (C18: 1), linoléique (C18: 2) et linoléique (C18: 3) étaient

Chapitre III : Résultats et Discussions

les principaux acides gras insaturés ils représentent une proportion totale 74.939% . De même, des quantités mesurables de myristique(C14 :0), arachidiques (C20: 0) et béhénique (C22: 0), comme acides gras saturés ainsi que les acides palmitoléiques (C16: 1) et erucique (C22: 1) sous forme d'acides gras mono-insaturés ont été détectée. Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment données publiées par Attia et al [137].

Tableau III.2 : Composition en acides gras de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L.

Acide gras	Valeurs déterminées
C14:0	0.211
C16:0	17.207
C16:1	0.262
C18:0	4.329
C18:1	10.619
C18:2	58.854
C18:3	5.466
C20:0	0.893
C20:1	0.378
C22:0	1.064
C22:1	0.716
Total AGS	23.704
Total AGI	76.295
AGI/AGS	3.219

Pour les teneurs des acides gras de l'huile fixe étudiés les valeurs trouvés sont différent aux celles trouvés par d'autres chercheurs .le pourcentage de l'acide linoléique (58.854%) il est plus élevé par rapport à la valeur trouvée par B. Atta (47.5%) [36] et elle en accord avec celle trouvée par (Ramadan et al,2006)(57.3%). Comparativement à d'autres graines, les proportions en acides oléique et linoléique de nos graines de *Nigella sativa* sont comparables à celles des huiles de graines de Maïs (76,2%), les huiles d'Olive (76 %) et les huiles de l'Arganier (76,1%) [138]. En conséquence, le quotient AGI / AGS était 3.219 cette valeur elle est en accord avec la littérature [36] .elle plus élevée que ceux trouvées dans les graines de l'huile de l'Arganier [138] .

Chapitre III : Résultats et Discussions

III.1.3. Analyse des Stérols

A partir d'une solution chloroformique de cholestérol de concentration 1mg/ml, nous avons préparé une série de gamme de solutions afin de tracer une courbe d'étalonnage du cholestérol liant la densité optique en fonction de la concentration (Figure III.1) :

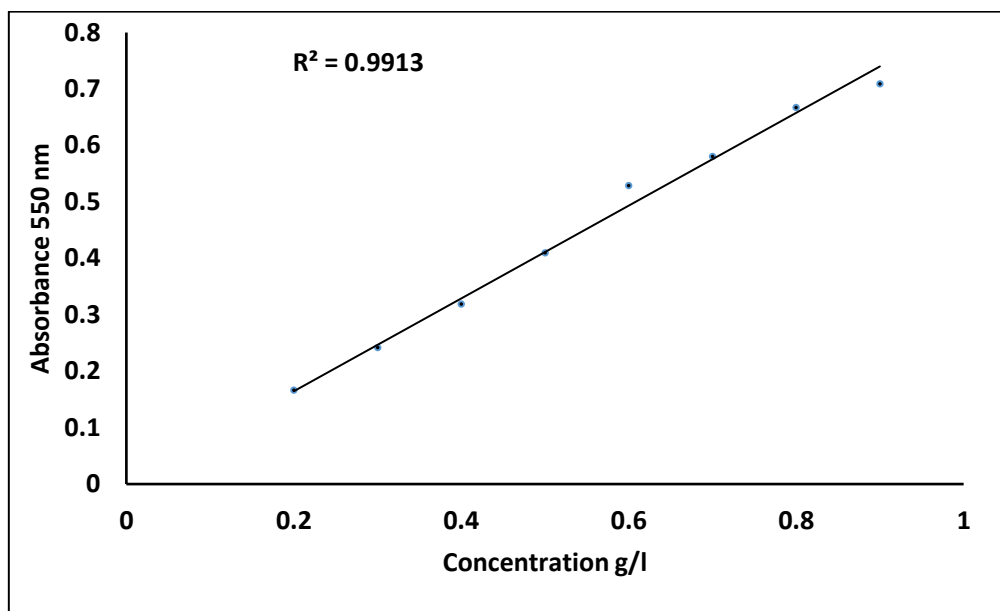


Figure III.1 : Courbe d'étalonnage du cholestérol

Tableau III.3 : Fractions des stérols dans l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L.

	Valeurs déterminées (M ± SD)	Valeurs rapportées dans la
		littérature
Teneur (mg/g)	2.8815 ± 0.2423	1.304

1 : [36]

Les résultats de ce dosage sont illustrées dans le tableau III.3 la valeur des stérols totaux elle est de 2.88159 mg/g cette valeur elle est similaire a la valeur rapporté par [139]. par contre cette valeur elle est superieur elle celle trouvée par B. Atta elle est de 13.04 mg/g [36] . Cette grande différence entre les deux résultats, elle peut-être expliquer aux interférences avec d'autres composés qui possèdent des structures chimiques semblables à la structure stérolique comme les méthyls stérols et les alcools tritérpéniques, la vitamine D, le β -carotène et d'autres composés qui absorbent longueur d'onde de dosage.

Chapitre III : Résultats et Discussions

III.1.4. Analyse des Tocophérols

III.1.4.1. Dosage spectrophotométrique des tocophérols

Une droite d'étalonnage est tracée à partir d' α -tocophérol commercial, permet de relier la densité optique et la concentration de tocophérol exprimée en g/l (Figure III.2). A partir d'une solution commerciale de la vitamine E, nous avons préparé dans l'hexane des solutions ayant des concentrations bien déterminées, 1ml de chaque solution fille plus 1ml de réactif (Ortho-phenantroline) et 0.5ml FeCl_3 (solutions étaloniques). Après 3min on mesure l'absorbance à 510 nm.

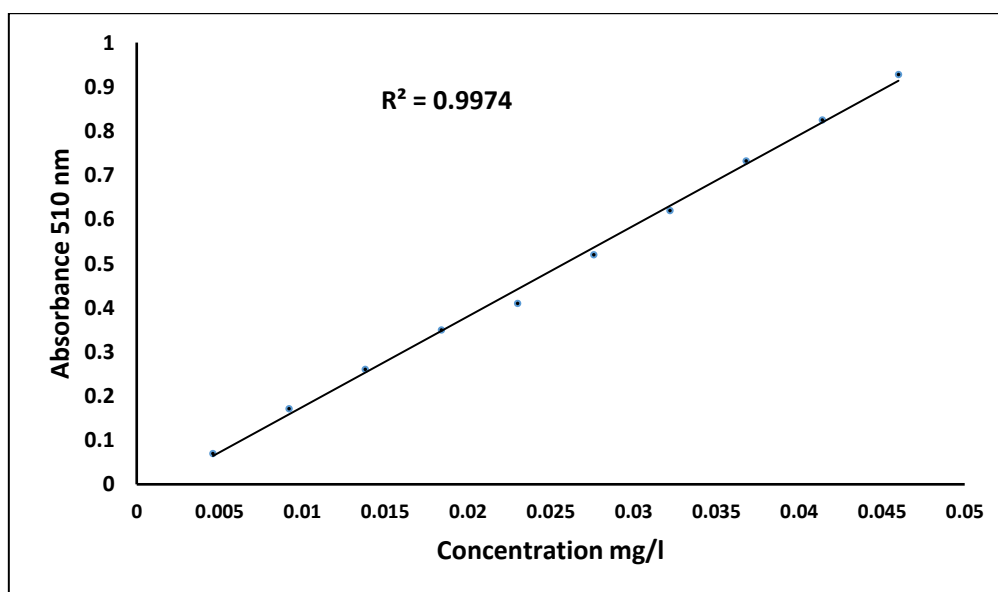


Figure III.2 : Courbe d'étalonnage de la vitamine E

Nous avons effectué le dosage des tocophérols totaux à partir de l'huile brute. Les taux des tocophérols totaux dans les échantillons d'huiles ont été déterminés à partir de la courbe d'étalonnage de la vitamine E (Figure III.2). Les résultats de ce dosage sont représentés dans le tableau III.4.

Tableau III.4 : Teneur en tocophérols de l'huile des graines de *Nigella sativa* L.

Valeurs déterminées	
Teneur (g/kg)	2.2337 ± 0.0779

La teneur en tocophérols totaux de l'huile fixe est de 2.337 g/kg cette teneur elle est importante par rapport à la teneur d'autres huiles végétales telle que l'huile d'olive (350 mg/kg) et l'huile de pépins de raisin (700 mg/kg) [140], ce résultat nous amène à conclure que l'huile fixe des

Chapitre III : Résultats et Discussions

Tableau III.5 : Composition en tocophérols individuels dans l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L.

	Valeurs déterminées (g/kg)	Valeurs rapportées dans la littérature (g/kg)[128]
α -tocopherol	0.0641 ± 0.0004	0.284 ± 0.01
α -tocotrienol	0.1276 ± 0.0007	nd
γ -Tocopherol	1.989 ± 0.0316	0.225 ± 0.02
δ -Tocopherol	0.0233 ± 0.0008	0.048 ± 0.01

La teneur totale en tocophérols dans l'huile des graines de *Nigella sativa* L. étudiée était relativement plus élevée que celui rapporté dans la littérature [141]. En outre, l'huile de graines étudiées avait une teneur en tocophérols totaux inférieure à d'autres graines oléagineuses telles que, le Maïs (3,720 g / kg d'huile). Il y avait une différence dans les quantités des tocophérols individuels séparés.

L'analyse des tocophérols en huile dans les échantillons étudiés de *Nigella sativa* L. par CLHP fait apparaître une forte prédominance des isomère γ -tocophérol (1.989 g/kg d'huile). L'isomère α -tocotrienol est le deuxième composant majeur (0.1276 g/kg d'huile). On peut dire que l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. étudiée est une source riche en δ -tocophérol et en α -tocotrienol, il représente la valeur de teneur la plus élevée comparant aux autres huiles de graines d'Olive (0 g/kg d'huile) et Maïs (0.023 g/kg d'huile) [140].

III.1.5. Quantification des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans l'huile fixe et les tourteaux des graines de *Nigella sativa* L.

Il y a plusieurs milliers de polyphénols qui ont été identifiés chez les plantes supérieures parmi lesquelles plusieurs centaines sont présent dans les plantes comestibles [143]. Il se compose d'une grande variété de composés et peuvent être classés en différents groupes sur la base du nombre de cycles phénol et de la éléments structurels qui lient ces anneaux les uns aux autres ; tel acides phénoliques, flavonoïdes, stilbènes et lignanes [143].

Les composés phénoliques donnent un goût unique, une saveur, la couleur et les propriétés favorables à la santé des légumes et fruits qui auraient été liés à leur capacité antioxydante [144]. Il existe aujourd'hui plusieurs rapports qui ont démontré que les polyphénols pourraient être administrés comme suppléments avec de la nourriture, pour améliorer la santé d'un individu

Chapitre III : Résultats et Discussions

[145]. La quantification des polyphénols et des flavonoïdes dans les divers extraits de graines de *Nigella sativa* L. a été réalisée à l'aide des méthodes colorimétriques (réactif de Folin-Ciocalte et trichlorure d'alumine). Une courbe d'étalonnage a été établie avec l'acide gallique comme standard à différentes concentrations pour les polyphénols (figure III.4) et la catéchine pour les flavonoïdes. Les résultats ont été exprimés en mg d'équivalent acide gallique (mg GAE / g MS) pour les polyphénols totaux et d'équivalent catéchine (mg EC / g MS) pour la teneur en flavonoïdes (figure III.5).

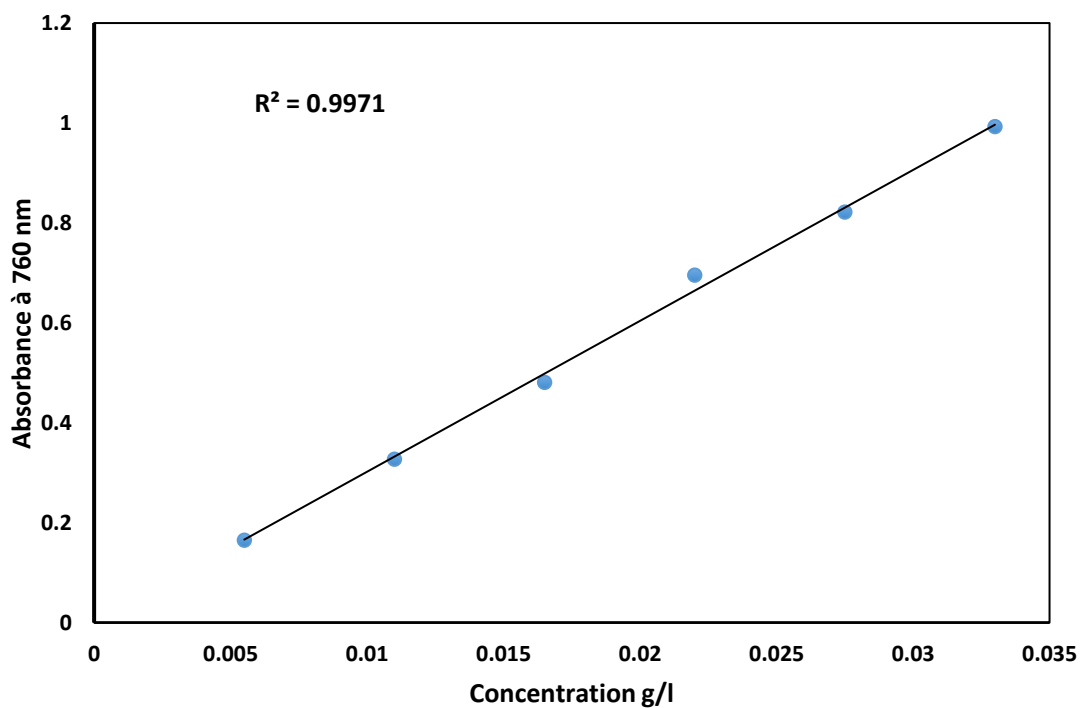


Figure III.4 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Chapitre III : Résultats et Discussions

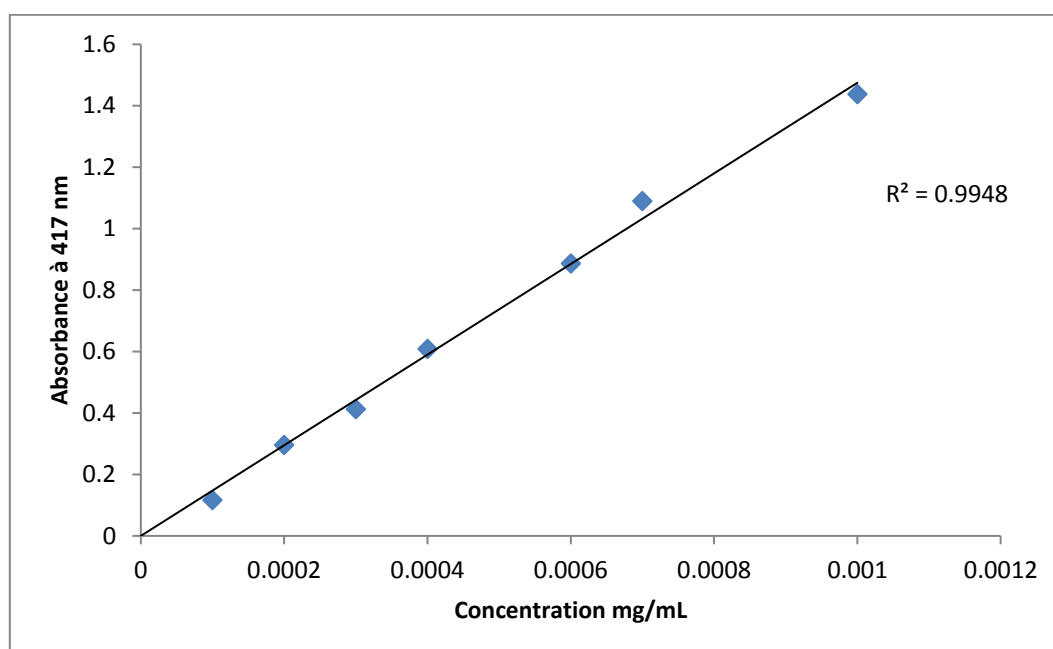


Figure III.5 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Toutes les mesures ont été effectuées en triple et les valeurs moyennes ont été calculées. Les résultats de la détermination des polyphénols et des flavonoïdes de l'huile fixe et des tourteaux de graines de *Nigella sativa* L. sont résumés dans le tableau III.6.

Tableau III.6 : Teneur en phénols totaux et en flavonoïdes de différents extraits Méthanolique, Acétonique et l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L.

	Tourteaux		Huiles fixes
	Solvant	Solvant	Solvant
	méthanol/eau 70/30	acétone/eau 70/30	Methanol/eau 70/30
Teneur en polyphénols totaux (mg/g) équivalent en acide gallique (TCP)	1,3714 ± 0,0315	0,5962 ± 0,0046	0.008 ± 0.0001
Teneur en flavonoïdes (mg/g) équivalent en catéchine (TCF)	0,4418 ± 0,0157	0,2746 ± 0,0053	0.0007 ± 0.00004

La TCP dans l'extraits Méthanolique des tourteaux elle est de 1,3714 mg GAE / g par contre dans le cas de l'extrait Acétonique des tourteaux elle est de 0,5962 mg GAE / g(MS), cette différence elle est due à la polarité du solvant utilisé pour l'extraction car les polyphénols se sont des composés polaires donc il est évidant d'avoir cette différence.

Pour la TCP dans l'huile fixe elle est de 0.008 mg GAE/g d'huile c'est une faible valeur comparativement à celle trouvée dans les tourteaux. la TCP dans l'huile fixe elle est inferieur a

Chapitre III : Résultats et Discussions

la valeur trouvée par F. Ramadan (0.0024 mg/g d'huile) [141] cette différence elle due à plusieurs paramètres qui entrent en jeu comme par exemple la méthode d'extraction. Les flavonoïdes sont un métabolite secondaire omniprésent dans les fruits et les légumes, qui protègent la cellule de la dégradation, du stress, agissent comme molécules de signalisation, des agents détoxifiants, réduisent les effets toxiques et les stimulants [146].

Des recherches récentes ont montré que les flavonoïdes peuvent être utiles sur le plan nutritionnel en déclenchant la production d'enzymes qui combattent les maladies, réduisent donc le risque de certains cancers, maladie cardiaque et maladies dégénératives liées à l'âge. Il a un rôle chimio préventif dans le cancer par leur effet sur la signalisation et la prolifération cellulaire et l'angiogenèse [147].

La teneur totale en flavonoïdes (TCF) des extraits des fruits de la *Nigella sativa* L. ont été déterminés en utilisant du chlorure d'aluminium méthode colorimétrique, basée sur la réaction de l'ion aluminium avec des flavonoïdes au milieu alcalin formant des chélates rouges [148].

Les résultats obtenus ne dévoilent pas les quantités des flavonoïdes totales exactes dans les graines investiguées. Le TCF variait de 0,4418 à 0,2746 mg CE / g matière sèche des tourteaux dans des extraits méthanolique et acetonique respectivement (Tableau III.6). Par conséquent le TCF moyen dans l'huile fixe est avéré être 0.0007 mg CE / g d'huiles. Ces valeurs sont relativement intéressantes vu la partie de la plante étudiée.

III.1.6. Quantification des polyphénols et des flavonoïdes par CLHP.

Nous avons réalisé l'analyse qualitative et quantitative des polyphénols des extraits méthanoliques, acétoniques des tourteaux et de l'extrait phénolique de l'huile fixe de *Nigella sativa* L. par CLHP.

Les chromatogrammes des deux extraits méthanolique et acetonique ont le même profil (figure III.6 et figure III.7), avec une différence de concentration des constituants. Par contre le profil chromatographique (figure III.8) de l'extrait phénolique de l'huile fixe est différent par rapport aux autres extraits. La comparaison des temps de rétention standard (annexe figure 2 et 3) avec ceux enregistrés dans les chromatogrammes nous a permis d'identifier différents composés acides phénoliques et flavonoïdes tels l'acide gallique, le kaempférol, la rutine, l'apigénine, la naringine et la quercétine, avec l'absence de catéchine, acide vanillique, épicatechine et l'acide coumarique dans les deux extraits des tourteaux. Pour l'huile fixe nous avons enregistré la

Chapitre III : Résultats et Discussions

presence de l'acide Gallique ,acide Vanillique ,acide Coumarique, Apigenin ,Rutin ,Kaempferol et l'absence de Naringenin ,Catéchine ,Epicatchine et Quercetin.

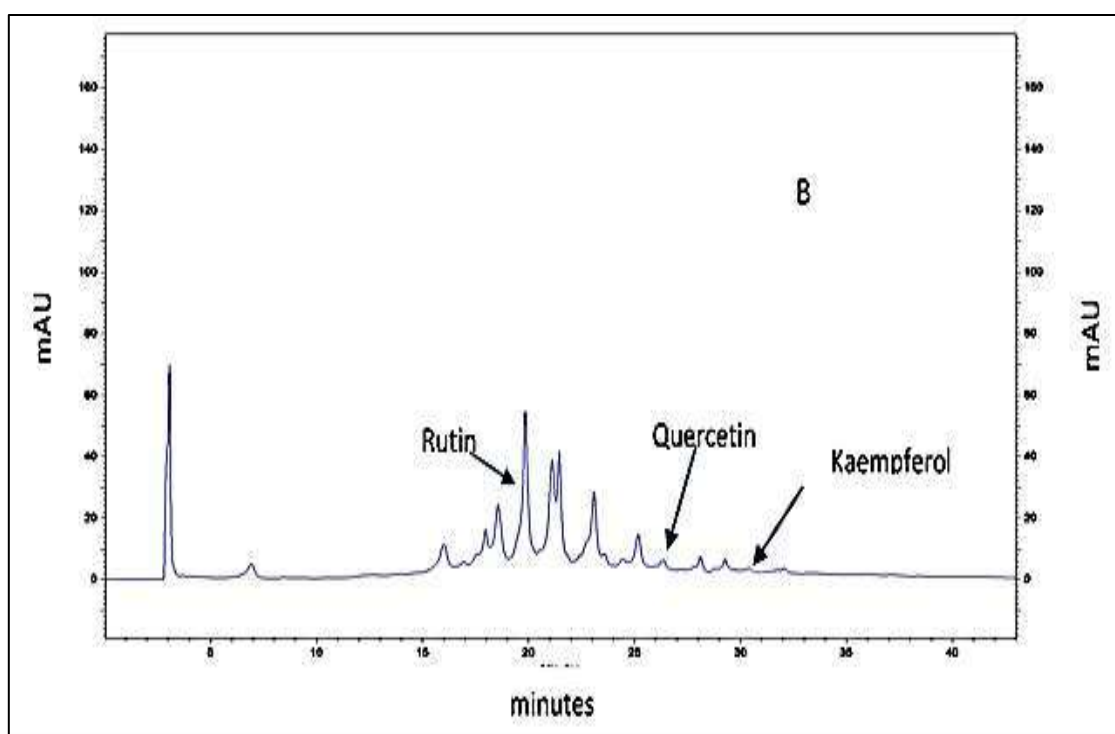
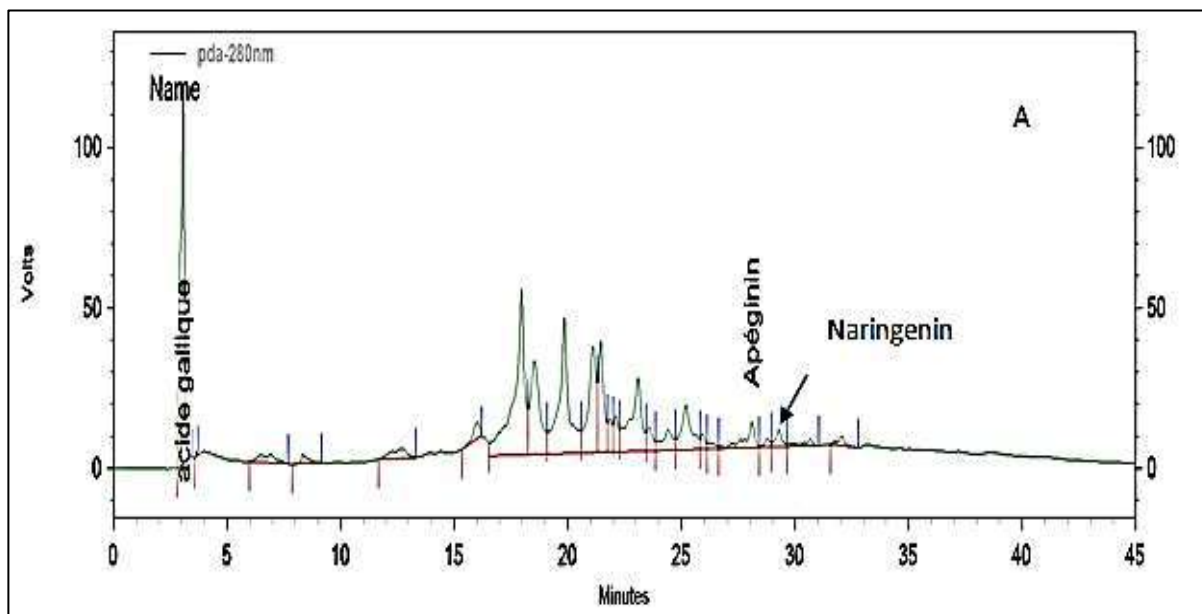


Figure.III.6: Chromatogrammes de l'analyse des composés phénoliques de l'extrait Méthanolique (Méthanol: eau 70:30 (v: v)) à 280 nm (A) et 360 nm (B)

Chapitre III : Résultats et Discussions

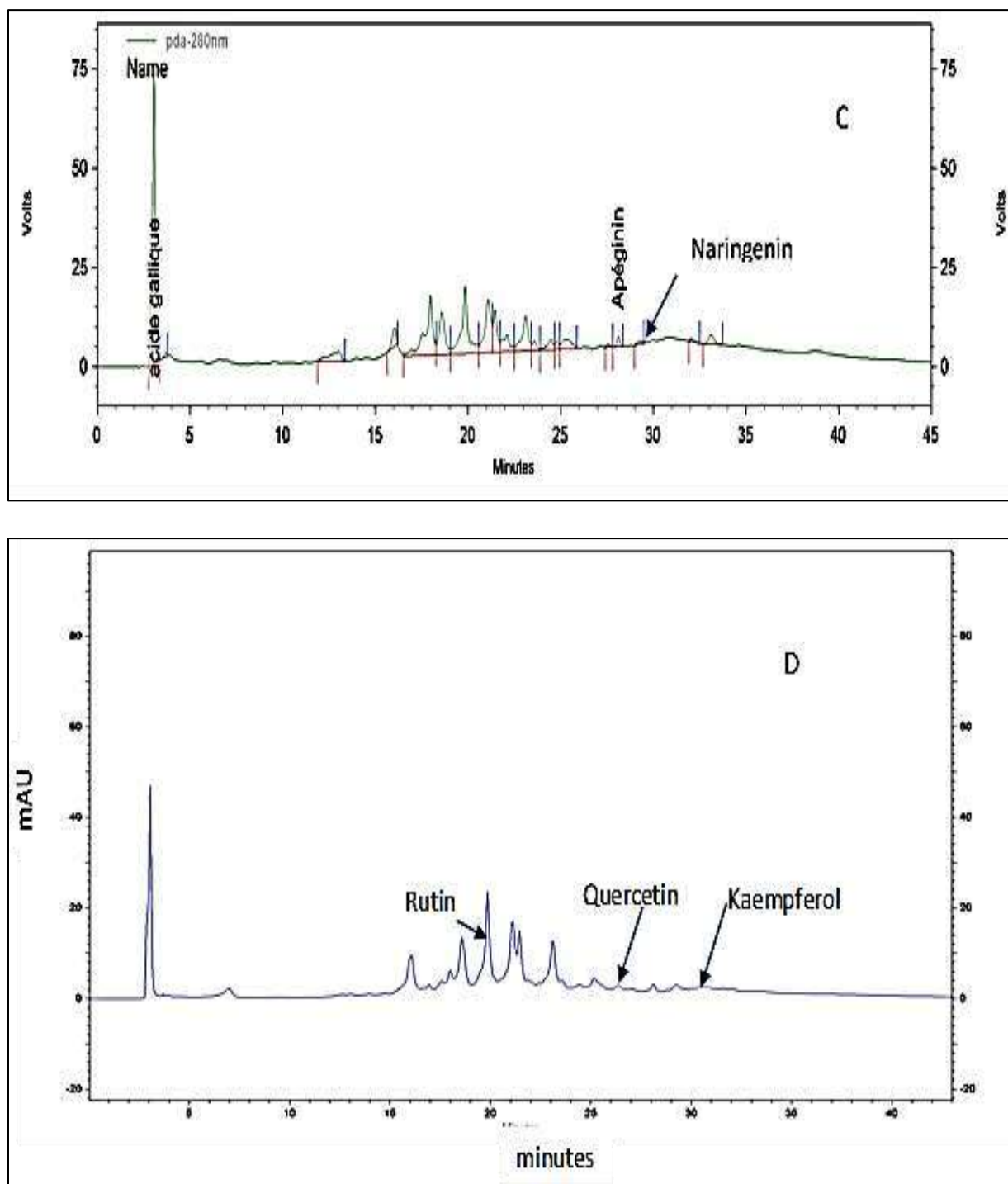


Figure.III.7:Chromatogrammes de l'analyse des composés phénoliques de l'extrait acétonique (acétone: eau 70:30 (v: v)) à 280 nm (C) et 360 nm (D)

Chapitre III : Résultats et Discussions

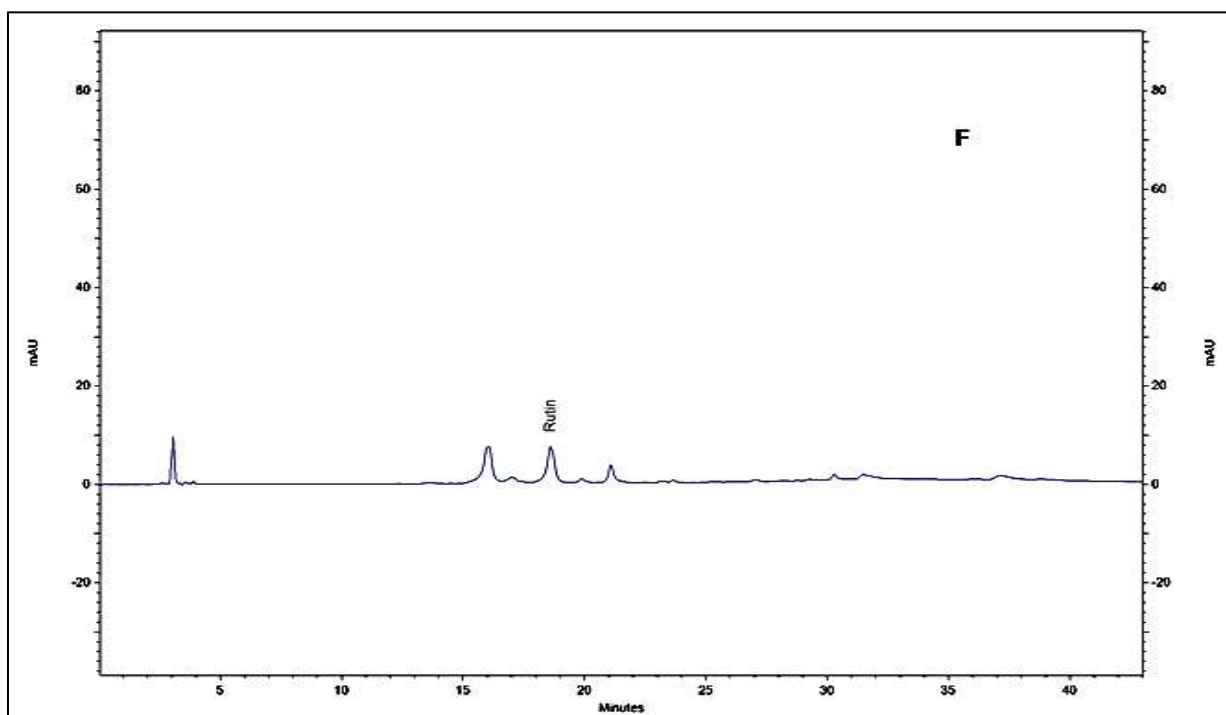
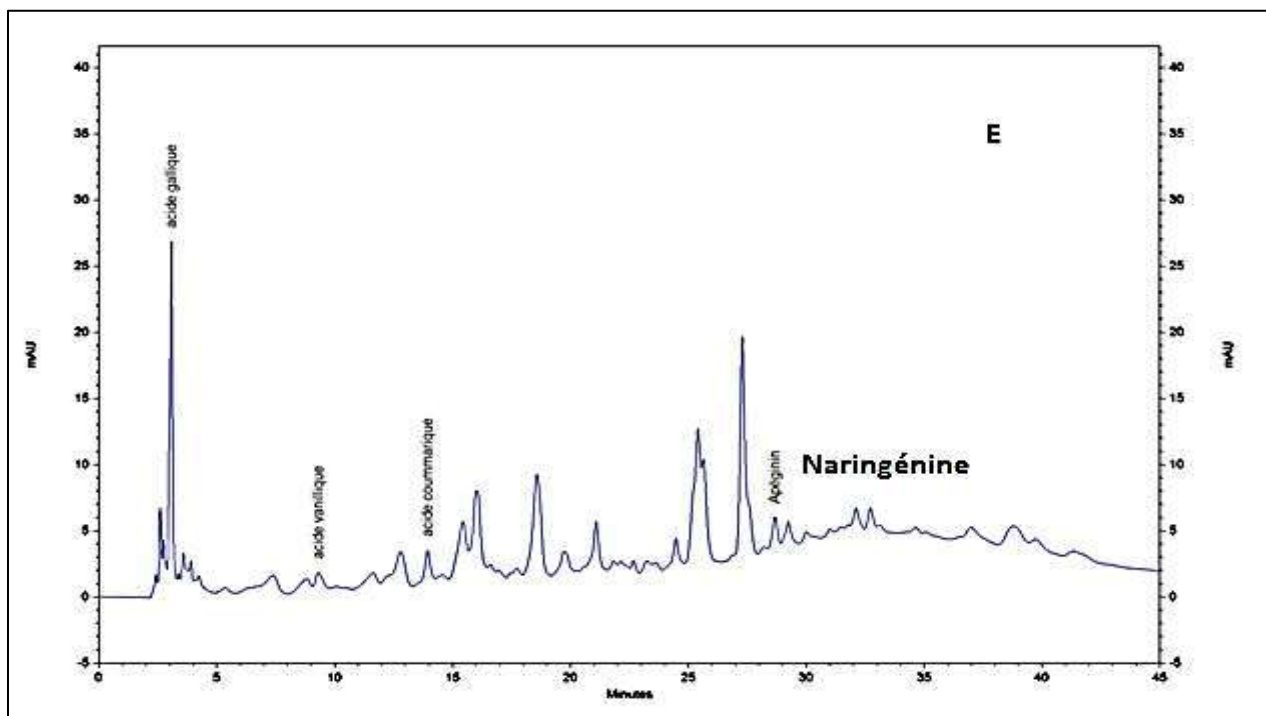


Figure.III.8: Chromatogrammes de l'analyse des composés phénoliques de l'huile fixe de *Nigella sativa* L. à 280 nm (E) et 360 nm (F)

Seules quelques études publiées ont étudié les composés phénoliques de *Nigella sativa* L. Par exemple, [149] ont identifié les composés suivants dans la graine de *Nigella sativa* L.: la

Chapitre III : Résultats et Discussions

quercitrine, la quercétine et le kaempférol en tant que composés phénoliques principaux et deux acides phénoliques, l'acide p-coumarique et l'acide férulique. Divers composés, tels que l'acide gallique, p-dihydroxybenzoïque, chlorogénique, vanillique, p-coumarique, trans-cinnamique et trans-2-hydroxycinnamique, ont été détectés dans des pousses et des racines de cumin noir. Fait intéressant, de l'acide vanillique a été détecté dans les deux parties de la plante, représentant environ 66% de la masse totale isolée [28], tandis que le méthanol ou la fraction aqueuse du tourteau de cumin noir contenait des acides hydroxybenzoïque, syringique et p-coumarique, avec une concentration élevée d'acide p-coumarique dans ces deux fractions [150].

En tant que polyphénols, les acides phénoliques sont également des antioxydants puissants et ont démontré divers des bienfaits pour la santé en présentant des propriétés antibactériennes, antivirales, anticarcinogènes, actions anti-inflammatoires et vasodilatatrices [151]. Les Flavones sont moins communs dans les fruits et les légumes par rapport flavonols et pour dater les sources comestibles de flavone, à savoir la lutéoline et l'apigénine sont identifiés dans le persil et le céleri [143, 152]. Les analyses des extraits des tourteaux et de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L a montré la présence de ces flavones et pourrait être utilisé comme source alimentaire de rutine et d'apigénine.

Tableau III .7 : Teneur en polyphénols de l'huile fixe et des extraits phénoliques des tourteaux des graines de *Nigella sativa* L.

Compound	tourteaux				Huiles fixes	
	Extrait Methanolique (methanol : eau 70:30 (v/v))		Extrait Acetonique (acetone :eau 70:30 (v/v))		Extrait Methanolique (methanol : eau 70:30 (v/v))	
	content [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]	content [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dw]	content [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]	content [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dw]	content [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]	content [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ huile]
Acide gallique	69.64 ± 2.94	139.28 ± 5.88	11.94 ± 1.45	23.88 ± 1.90	1.76 ± 0.01	37.12 ± 0.13
Catéchine	-	-	-	-	-	-
Acide vanillique	-	-	-	-	0.41 ± 0.03	8.61 ± 0.63
Epicatchine	-	-	-	-	-	-
Acide coumarique	-	-	-	-	0.36 ± 0.01	7.58 ± 0.21
Apigenine	15.06 ± 1.98	30.12 ± 3.96	10.27 ± 1.35	20.45 ± 2.70	2.15 ± 0.12	45.38 ± 2.53
Naringenine	0.84 ± 0.08	1.68 ± 0.16	0.40 ± 0.06	0.80 ± 0.12	-	-
Rutine	120.21 ± 4.52	240.42 ± 9.04	22.38 ± 3.23	44.76 ± 6.46	5.62 ± 0.02	118.34 ± 0.42
Quercetine	3.30 ± 0.89	6.60 ± 1.74	0.30 ± 0.02	0.60 ± 0.04	-	-
Kaempferol	2.82 ± 0.53	5.64 ± 1.06	0.36 ± 0.03	0.76 ± 0.06	0.26 ± 0.01	5.42 ± 0.21

Chapitre III : Résultats et Discussions

Pour les extraits méthanolique et acetonique des tourteaux le flavonoïde dominant était la rutine ($240.42 \pm 9.04 \mu\text{g/g}$) et ($44.76 \pm 6.46 \mu\text{g/g}$) suivi de l'Apigénine ($30.12 \pm 3.96 \mu\text{g/g}$) et ($20.45 \pm 2.70 \mu\text{g/g}$), nous avons enregistré la présence d'autres flavonoïdes avec des concentrations faibles tels que Naringénine ($1.68 \pm 0.16 \mu\text{g/g}$), Quercétine ($6.60 \pm 1.74 \mu\text{g/g}$) et Kaempférol ($5.64 \pm 1.06 \mu\text{g/g}$) ces valeurs sont en accord avec les valeurs trouvées par [149]. En revanche le seul acide phénolique détecté dans les deux extraits méthanoliques et acetoniques des tourteaux est l'acide gallique ($139.28 \pm 5.88 \mu\text{g/g}$ et $23.88 \pm 1.90 \mu\text{g/g}$).

D'après ces résultats il est clair que le système solvant méthanol/eau représente les quantités les plus élevées. En cas d'extrait phénolique de l'huile fixe des grains de *Nigella sativa* L. le flavonoïde majoritaire était la rutine ($118.34 \pm 0.42 \mu\text{g/g}$), suivi de l'Apigénine ($45.38 \pm 2.53 \mu\text{g/g}$) et de Kaempférol ($5.42 \pm 0.21 \mu\text{g/g}$), la Catéchine, Epicatechine, Naringénine et la Quercétine ils étaient absents dans l'huile fixe. Contrairement aux extraits phénoliques des tourteaux l'analyse chromatographique a révélée la présence de trois acides phénoliques dont l'acide gallique est le composé dominant ($37.12 \pm 0.13 \mu\text{g/g}$), l'acide vanillique ($8.61 \pm 0.63 \mu\text{g/g}$) et l'acide coumarique ($7.58 \pm 0.21 \mu\text{g/g}$). Ces deux composés n'ont été trouvés que dans l'extrait phénolique de l'huile fixe des fruits.

III.2. Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne de l'huile fixe, les extraits Méthanolique et Acétonique des graines de *Nigella sativa* L.

I.2.1. Evaluation de l'activité antioxydante

I.2.1.1. Test de DPPH

I.2.1.1.1. Test de DPPH de l'huile fixe

L'activité antioxydante des extraits lipidiques a été évaluée par leur activité inhibitrice sur une solution d'acétate d'éthyle de DPPH, mesurée à 520 nm. Les standards utilisés étaient le BHA et BHT (annexe figure 4 et 5). Cette méthode est fondée sur la réduction d'une solution d'acétate d'éthyle de DPPH en présence de molécules donatrices d'hydrogène. La capacité de réduction du radical DPPH est mesurée par la diminution de l'absorbance à 520 nm par un changement de coloration de jaune au bleu [153]. L'activité antioxydante de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. exprimée par le EC₅₀ (la concentration en extrait qui inhibe 50 % du radical DPPH) est calculée à partir du graphe du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration d'extrait en utilisant l'équation exponentielle (Figure III.9).

Chapitre III : Résultats et Discussions

L'inconvénient du paramètre EC50 est que plus l'activité antioxydante n'est élevée, plus la valeur d'EC50 est inférieure. De ce fait, et pour des raisons de simplicité nous avons introduit le paramètre APR qui représente le pouvoir antiradicalaire de l'extrait calculé à partir des valeurs d'EC50. C'est-à-dire, plus les valeurs du APR est grandes plus le pouvoir antiradicalaire des extraits est important.

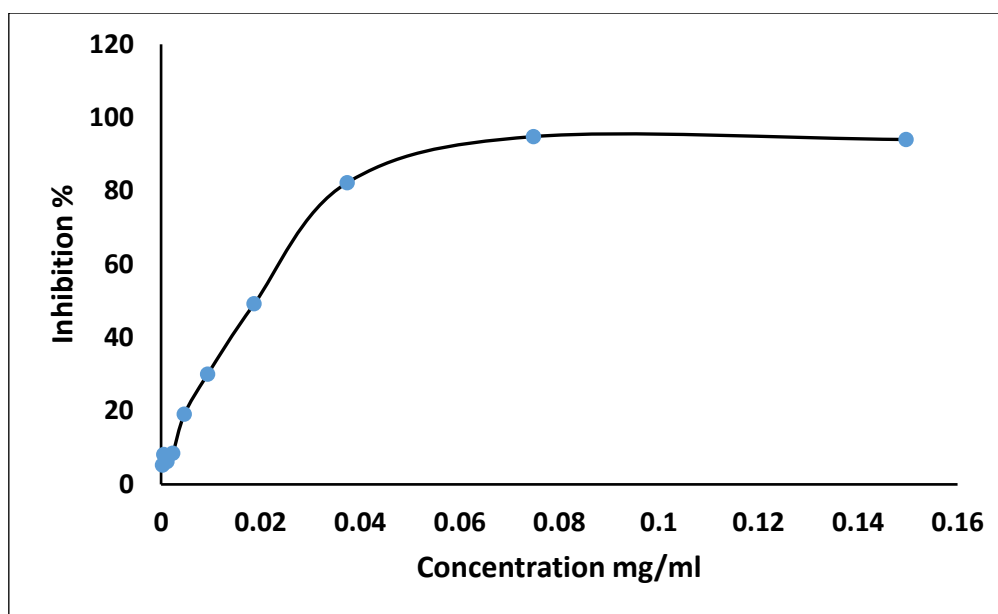


Figure III.9 : La variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations en huile fixe dans le test du DPPH

Dans le test de DPPH (Figure III.9) de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. ont montré un effet de balayage du radical DPPH.. L'huile étudiée est caractérisée par des différences significatives statistiquement dans leur activité antioxydante mesurée par la méthode du DPPH. Par conséquent, l'huile extraite à montrer une activité de piégeage des radicaux DPPH importante ($EC_{50} = 0.0197 \pm 0.0034$) par rapport aux huiles des graines de citrouille ($EC_{50} = 23,8 \pm 0,08$) [154].

Tableau III.8 : Les valeurs de l'EC 50 de l'huile fixe dans le test du DPPH

Extraits	EC50 (mg/ml)	APR (ml/mg)
Huile fixe	0.0197 ± 0.0003	50.76
BHA	0.0011 ± 0.0001	922.0391
BHT	0.0013 ± 0.0003	787.6289

Chapitre III : Résultats et Discussions

D'après les résultats obtenues (Tableau III.8) Nous pouvons déduire que l'huile fixe de la plante présente une très forte capacité à piéger le radical libre soit une $EC_{50} = 0.0197 \pm 0.0034$ mg/mL) cette valeur reste supérieure à celle obtenue avec le BHA ($EC_{50} = 0.0011 \pm 0.0001$ mg/mL) et BHT ($EC_{50} = 0.0013 \pm 0.0003$ mg/mL). Ces résultats confirment que l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. présentent une grande aptitude à piéger le DPPH

I.2.1.1.2. Test DPPH des extraits phénoliques des tourteaux des graines de

Nigella sativa L.

Le principe de la détermination de l'activité antioxydante des extraits phénoliques des tourteaux des graines de *Nigella sativa* L. (Figure III.10) est le même utilisé pour les huiles fixes, avec une légère modification.

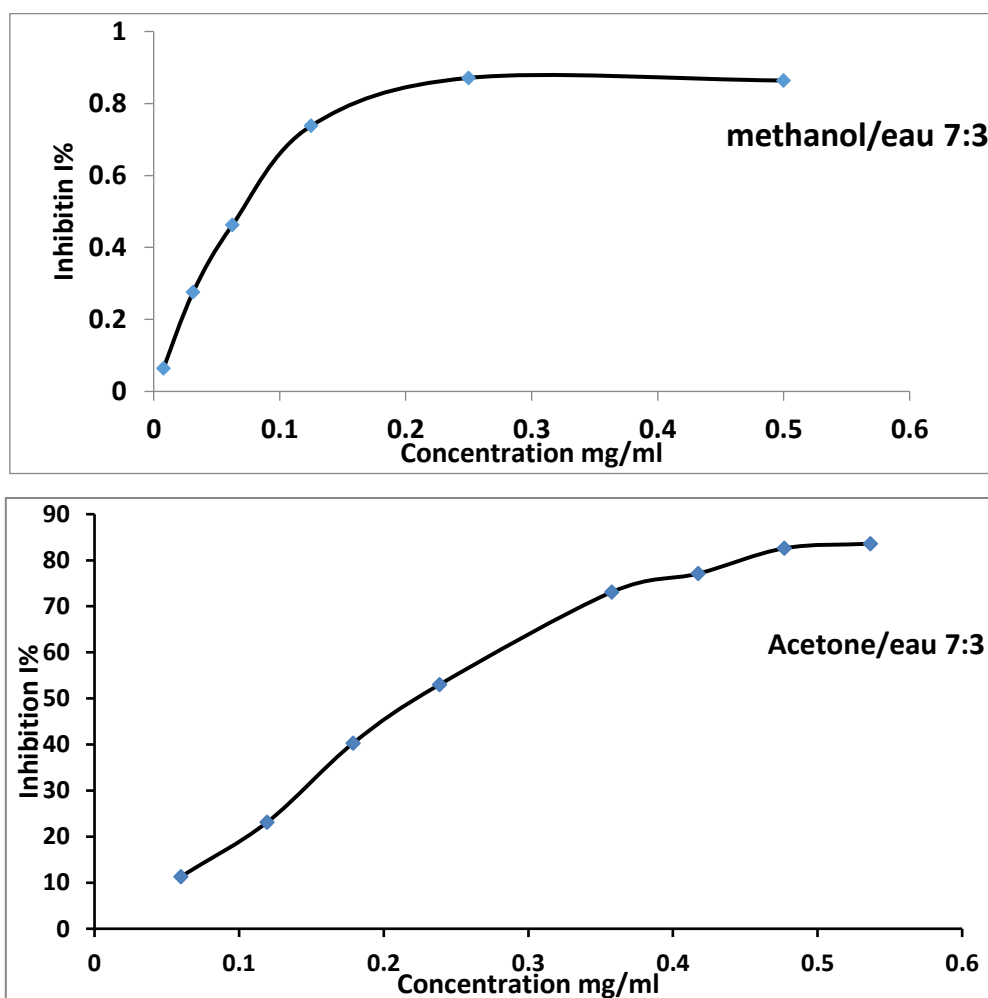


Figure III.10 : La variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits Méthanolique et Acétonique dans le test du DPPH

Chapitre III : Résultats et Discussions

Dans l'analyse DPPH, l'activité antioxydante des extraits a été comparée à un contrôle positif de Solution de BHT et BHA. La plus forte activité de balayage radicalaire (tableau III.9) a été démontrée par l'extrait phénolique du système solvant Méthanol/eau (v/v ;7/3) ($EC_{50} = 0.0734 \pm 0.0001$ mg/mL) suivies de l'extrait phénolique du système solvant acetone/eau(v/v ;7/3) des tourteaux des graines de cumin noir qui ont présenté une teneur en antioxydants 3,5 fois moins élevée ($EC_{50} = 0.2448 \pm 0.0063$ mg/mL). Des résultats similaires concernant les graines de *Nigella sativa* L. ont également été trouvés par Khattak et al. en testant des extraits méthanoliques [155].

Ratz-Lyko et al. a rapporté une EC_{50} de (0.500 mg / mL) et (0.350 mg/mL) pour les graines de *N. sativa*, avant et après hydrolyse dans un extrait éthanolique à 50% [156] .Comme déjà prouvé par Mousa et al ,des concentrations élevées de flavonoïdes et de flavonols se reflètent dans la propriétés de balayage [157]. Des résultats plus élevés ont également été rapportés par Thippeswamy et al., ($EC_{50} = 1,24$ mg /mL).dans un extrait méthanolique à 80% [149].

Tableau III.9 : Les valeurs de l' EC_{50} des extraits Méthanolique et Acétonique des tourteaux dans le test du DPPH

Extraits	EC_{50} (mg/ml)	APR (ml/mg)
Methanol : eau 7:3 (v/v)	0.0734 ± 0.0001	13.6240
Acetone : eau 7:3 (v/v)	0.2448 ± 0.0063	4.0850
BHA	0.0011 ± 0.0001	922.0391
BHT	0.0013 ± 0.0003	787.6289

D'après les résultats obtenus on remarque que le pouvoir de piégeage du radicale DPPH à une corrélation avec la concentration en polyphénols de nos extraits

III.2.1.2. Test de blanchiment du β -carotène

I.2.1.1.3. Test de blanchiment du β -carotène des huiles fixes, des extraits methanolique et acetonique des tourteaux des graines de *Nigella sativa* L.

La méthode d'évaluation de l'activité antioxydante par la décoloration du β -carotène est une méthode spectrophoto-métrique qui permet de suivre, à 470 nm, la décoloration du β -carotène au cours du temps de la réaction. D'après les résultats obtenus, nous avons remarqué clairement l'effet de l'antioxydant de référence (BHA) et (BHT) (annexe figure 6 et 7) exercé en inhibant la décoloration du β -carotène observé par la faible décroissance de l'absorbance à 470 nm au cours des 120 minutes de la cinétique.

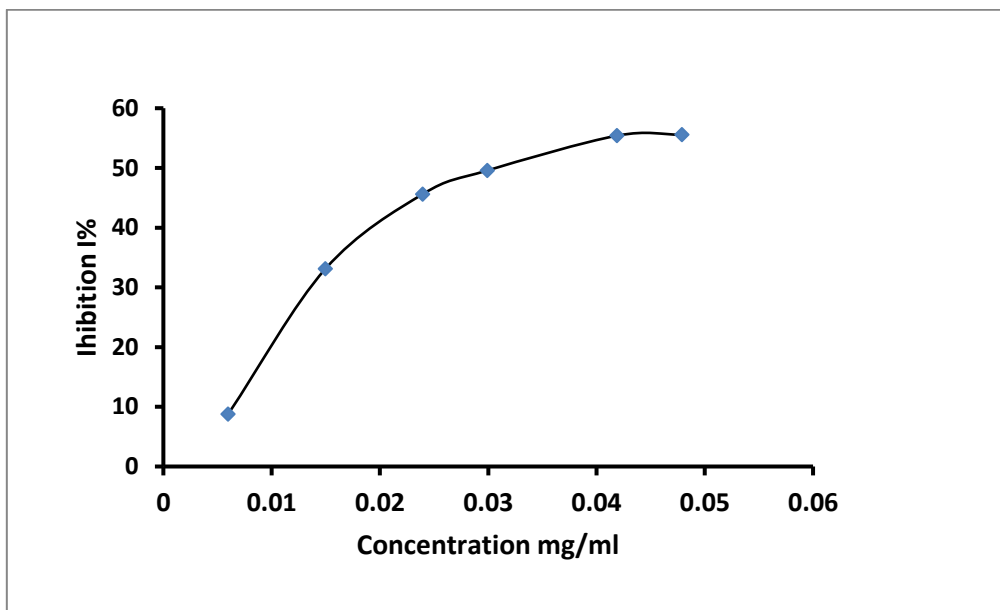


Figure III.12 : La variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'huile fixe dans le test de blanchiment du β -carotène

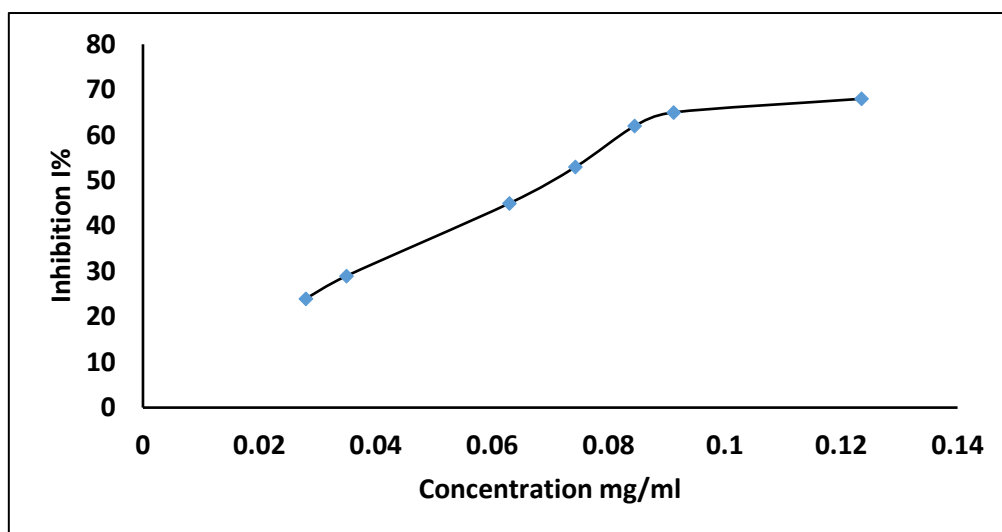


Figure III.13 : La variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'extraits phénolique system solvant méthanol/eau (70/30) dans le test de blanchiment du β -carotène

Chapitre III : Résultats et Discussions

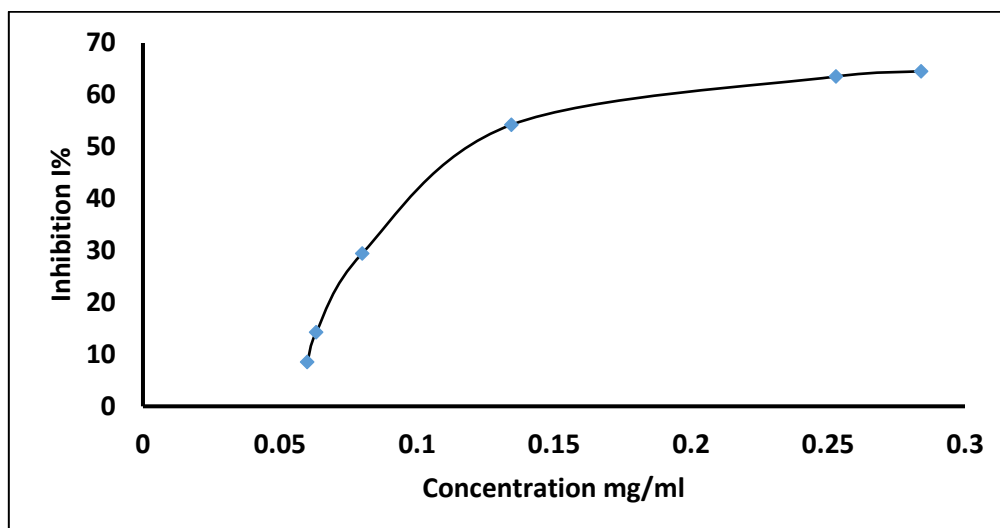


Figure III.14 : La variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'extrait phénolique système solvant acétone /eau (70/30) dans le test de blanchiment du β -carotène.

En comparant les résultats obtenus (Tableau III.10), nous avons constaté que l'huile fixe présente un effet protecteur non négligeable de l'ordre de 33.4448 mL/mg comparé à celui du BHT (1369.86 mL/mg) et il est incomparable avec celui de BHA (2000 mL/mg). En revanche le pouvoir protecteur des extraits méthanolique (14.0647 mL/mg) et acétonique (8.3194 mL/mg) est très faible par rapport à l'effet des antioxydants des références et au l'huile fixe des graines.

Tableau III.10 : Les valeurs de l'IC 50 de l'huile fixe, des extraits Méthanolique et Acétonique dans le test de blanchiment du β -carotène.

Extraits	IC50 (mg/ml)	APR (ml/mg)
Huile fixe	0.0299 \pm 0.0002	33.4448
Méthanol : eau 7:3 (v/v)	0.0711 \pm 0.0013	14.0647
Acétone : eau 7:3 (v/v)	0.1202 \pm 0.0084	8.3194
BHA	0.0005 \pm 0.00001	2000.00
BHT	0.0073 \pm 0.0004	136.986

Dans ce modèle de mesure de l'activité antioxydante, le β -carotène subit une décoloration rapide en l'absence d'un antioxydant qui aboutit à une réduction de l'absorbance de la solution d'essai avec le temps de réaction [158], cela est dû à l'acide linoléique qui produit des hydroperoxydes pendant son incubation à 50 °C [159], ces derniers attaquent les insaturations du β -carotène, et en conséquence, la couleur caractéristique de ce dernier disparaît [158]. De ce

Chapitre III : Résultats et Discussions

fait, la présence d'un antioxydant dans l'extrait permettra de réduire au minimum l'oxydation du β -carotène par les hydroperoxydes.

Deba et al. [160] suggèrent que l'activité antioxydante des extraits Méthanolique , Acétonique et les huiles fixes des plantes réside dans le fait que ces derniers ont la capacité de donner des atomes d'hydrogène aux radicaux libres (hydroperoxydes du milieu réactionnel) issus de l'oxydation de l'acide linoléique et, par conséquent, stoppent l'attaque de ces radicaux sur le β -carotène. Dans le même contexte, Mayachiew et Devahastin, dans leur recherche [161], attribuent aux polyphénols et au tocophérol leurs pouvoir antioxydant, de ce fait on peut dire que la forte activité enregistrée dans le cas de l'huile fixe par rapport au extraits phenoliques elle est due à la présence des tocophérols plus les polyphénols. On peut dire que la partie étudiée de la *Nigelle sativa* L. a présenté une activité importante.

III.2.2. Activity antimicrobienne

Les résultats de l'activité antimicrobienne (annexe figure 8, 9, 10, 11,12 et 13) sont représentés dans le tableau III.11. Les trois extraits méthanolique ,acétonique et l'huile fixe ont presque le même niveau d'activité contre les levures (*Candida albicans* ATCC 10231), le diamètre de sensibilité des trois extraits étant respectivement égal à ($13,00 \pm 0,50$ mm < 15mm) ,(10,10 \pm 0,30 mm < 15mm) et (13.5 ± 0.3 mm < 15mm). En peut dire que nos extraits présentent une moyenne activité antimicrobienne contre la *Condida albicans*.

Tableau III.11 : La zone de sensibilité des bactéries aux extraits Methanolique , acetonique et d'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. exprimée en mm.

souches	Extraits			Reference	
	methanol : eau (7:3) (v/v)	acetone : eau (7:3) (v/v)	Huile fixe		
diameter d'Inhibition, d [mm]					
Gram -	<i>Escherichia coli</i>	10.50 ± 0.50 (+)	6.00 ± 0.20 (-)	-	ATCC 10536
Gram +	<i>Bacillus subtilis</i>	15.5 ± 0.30 (++)	14.00 ± 0.50 (+)	-	ATCC 6633
Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>	12.00 ± 0.70 (+)	6.50 ± 0.50 (-)	11.10 ± 0.5	ATCC 6538
Lévure	<i>Candida albicans</i>	13.00 ± 0.50 (+)	10.10 ± 0.30 (+)	13.5 ± 0.3	ATCC 10231

En revanche, dans le cas de souches bactériennes, l'extrait méthanolique révèle un effet considérable contre les souches bactériennes étudiées. Avec une activité élevée contre *Bacillus*

Chapitre III : Résultats et Discussions

subtilis (Gram +) et une activité modérée contre *Escherichia coli* (Gram -) et *Staphylococcus aureus* (Gram +). L'extrait acétonique a une faible activité contre *Bacillus subtilis* (Gram +) et aucune activité contre *Escherichia coli* (Gram -) et *Staphylococcus aureus* (Gram +), pour l'huile fixe des graines aucune sensibilité a été enregistré par *Escherichia coli* (Gram -) et *Bacillus subtilis* (Gram +). Cette différence de sensibilité est due à la concentration en substances bioactive dans les extraits, à la nature des molécules présentes dans nos extraits et à la nature de la paroi externe de la bactérie étudiée. La paroi bactérienne d'*Escherichia coli*, par exemple, est très riche en lipopolysaccharides (LPS) qui empêchent les molécules hydrophobes de traverser la membrane [162].

III.3. Etude de l'effet de rôtissage sur la composition chimique et l'activité biologique d'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L.

III.3.1. Teneur et caractéristiques physico-chimiques d'huile fixe.

Les huiles des graines de *Nigella sativa* ont des couleurs jaunes. Elles prenant la forme liquide à température ambiante avec une odeur agréable. Cette couleur va devenir avec le temps de rôtissage jaune obscure. L'augmentation de l'obscurité et de la rougeur de l'huile avec l'augmentation du temps de torréfaction semblait être due au brunissement non enzymatique entre les sucres réducteurs et des groupes Amino aux températures élevées. La teneur en huile des graines elle est presque stable durant toutes les périodes de torréfaction (Tableau III.12). Ce résultat elle ne s'accorde pas avec les recherches qui ont été faites par d'autres études [127]. La teneur en huile des graines étudiées est semblable avec celle trouvé par E.-S. Abdel-Aal et R. Attia [128]. Par contre cette quantité en huile, est inférieur à celle trouvée par A. Salem, T. Tahu, et I. Abou-El-Fadl [129]. Cette différence en teneur en huile peut être expliquée par les différentes méthodes d'extraction, aux différents modes de traitement de la matière végétales et aux des conditions de stockage des graines.

Chapitre III : Résultats et Discussions

Tableau III.12 : Propriétés physiques et chimiques de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. torréfiées.

Temps de rôtissage	Teneur en huile (%)	d (g/cm ³) à 27°C	η^{27}	I.A (mg (KOH)/g)	I.S (mg (KOH)/g)
5 min	15.68	0.887	1.459 ± 0.002	10.71 ± 0.41	143.33 ± 2.71
10 min	14.89	0.867	1.459 ± 0.003	9.97 ± 0.02	143.86 ± 2.74
15 min	15.02	0.918	1.474 ± 0.00	9.93 ± 0.72	142.72 ± 2.78
20 min	15.42	0.865	1.453 ± 0.023	7.44 ± 0.01	142.01 ± 1.39
30 min	15.46	0.870	1.464 ± 0.001	7.37 ± 0.1	137.75 ± 1.37
40 min	15.35	0.890	1.467 ± 0.003	7.40 ± 0.09	138.06 ± 4.17

Les valeurs des constantes physico-chimiques des huiles des graines de *Nigella sativa* étudiées sont regroupées dans le tableau III.12. Les constantes physiques de l'huile nous donnent des informations préliminaires sur les structures chimiques ainsi les fonctions chimiques qui peuvent être renfermées dans la structure de l'huile fixe. Il est aussi possible de nous donner des indications sur la pureté et la qualité de l'huile[163].

L'indice de réfraction est utilisé pour mesurer la variation de l'insaturation dans l'huile après l'hydrogénation. L'indice de réfraction de l'huile dépend de leurs masses moléculaires, la longueur de la chaîne des acides gras, le degré d'insaturation et le degré de la conjugaison [134]. Les huiles des graines de *Nigella sativa* L. montrent des valeurs d'indice de réfraction qui s'échelonnent de 1,453 à 1,474 (Tableau III.12), en revanche la valeur supérieur est enregistrée dans le cas des graines traitées pendant 15 min.

Les valeurs de la densité des huiles étudiées variées entre de 0,865 g/cm³ à 0,918 g/cm³ (Tableau III.12). Ces résultats montre clairement l'influence du temps de rôtissage sur ce paramètre physique de l'huile. la valeur minimal correspond au l'huile fixe des graines traitées pendant 20 min alors que la valeur maximale est enregistrée dans le cas des graines traitées pendant 15.

L'huile de faible acidité est la plus souhaitable à recommander pour la consommation. Ces huiles doivent avoir une acidité inférieure à 0,1 mg KOH/g. Toutes les huiles étudiées possèdent des valeurs fortes en acidité, les valeurs des indices d'acidité sont entre 7.37 et 10.71 (Tableau III.12). Les résultats montrent clairement la diminution de l'acidité en fonction du temps de rôtissage (figure III.15) cette diminution commence à partir de 20^{ème} minute de rôtissage. La faible acidité est atteinte au bout de 30 à 40min. on peut dire que le rôtissage a une influence positif sur la qualité de l'huile étudiée.

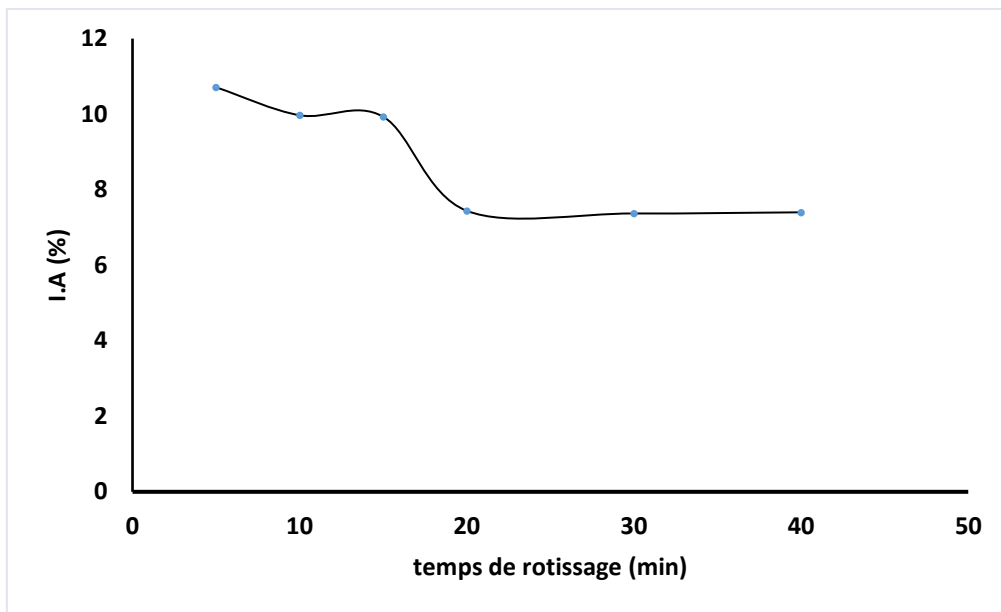


Figure III.15 : La variation de l'indice d'acidité de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. en fonction de temps de rôtissage.

L'indice de saponification est un indicateur de la masse moléculaire des acides gras et des triglycérides ainsi la longueur de chaîne de carbone qui contient l'huile. Il est inversement proportionnel à la masse moléculaire de l'huile. Les valeurs obtenues de l'indice de saponification des huiles étudiées varient de 137.75 à 143.33 mg KOH/g (Tableau III.12). Ces valeurs indiquent que les huiles des graines de *Nigella sativa* L. contiennent des acides gras avec des longues chaînes de carbone. La plus grande valeur enregistrée correspond à l'huile fixe des graines traitées durant 5 min alors que la plus faible valeur est enregistrée dans le cas de l'huile fixe des graines traitées durant 30 min et 40min. D'après la figure III.16 on peut dire que la variation de l'indice de saponification au cours du temps de rôtissage elle est faible c'est-à-dire que le rôtissage n'a aucune influence sur ce paramètre.

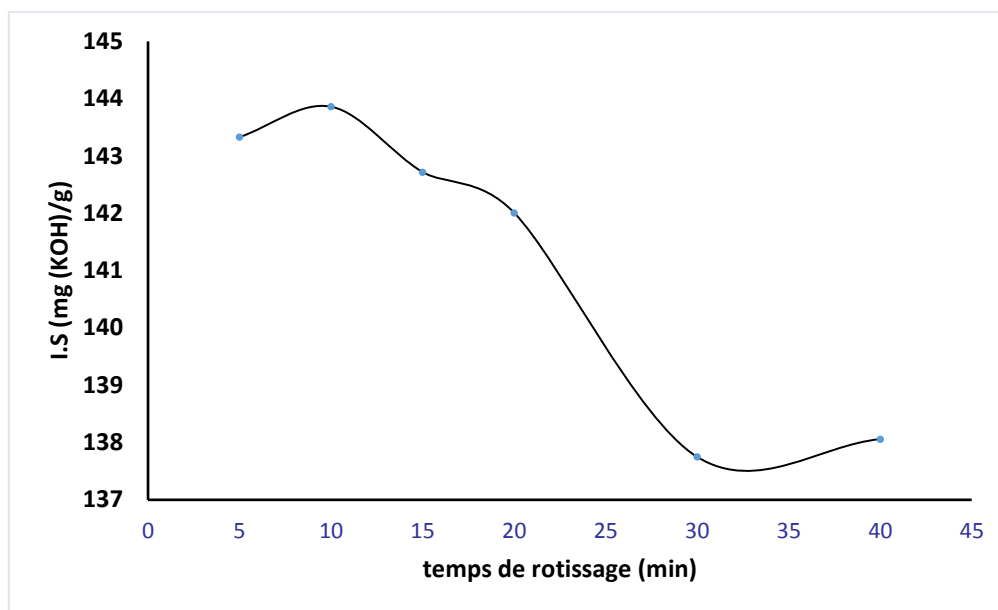


Figure III.16 : La variation de l'indice de saponification de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. en fonction de temps de rôtissage.

III.3.2. Analyse des EMAGs dans l'huile

A partir des chromatogrammes des EMAG des huiles fixes (annexe figure 14,15,16,17,18 et 19), nous avons établi le tableau III.13. Onze acides gras ont été identifiés dans les huiles des fruits étudiés. Les proportions individuelles de chaque acide gras dans les huiles sont aussi mentionnées dans le tableau III.13. L'acide linoléique (18: 2) s'avère être l'acide gras primaire dans l'huiles fixe de *Nigella sativa* non torréfié (58.854%). les teneurs en Acide oléique (18: 1) et acide palmitique (16: 0) étaient respectivement 10.619 et 17.207% du total des acides gras. Autre acides gras ont été trouvés dans des niveaux relativement inférieurs. Pour les huiles de différentes graines de *Nigella sativa* traitées pendant différentes périodes les teneurs trouvés en moyenne 10.148 % d'acide oléique, 60.984 % d'acide linoléique et 17.574 % d'acide palmitique. D'après ces résultats en peut dire que le rôtissage n'a pas modifié la composition en acides gras d'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. d'autre recherches ont été faites par I. Karabulut, G. Durmaz, et A. Hayalogl [164] sur les noyaux d'abricot , ils ont trouvez que la teneur en acides gras ne change pas par le rôtissage ,le même résultats a été confirmée par I. Juárez [165] avec le poivre vert. Par contre Maheswary et al[166] ils sont trouvé que la teneur en acide gras elle a une dépendance significative avec le prétraitement thermique (rôtissage) dans le cas des huiles de Tournesol.

Chapitre III : Résultats et Discussions

Tableau III.13 : Composition en acides gras dans l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. torréfiées.

Acide gras	Temps de rôtissage à 180 °C					
	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min	40 min
C14:0	0.259	0.195	0.202	0.189	0.209	0.208
C16:0	17.574	16.988	16.988	16.818	17.575	16.913
C16:1	0.234	0.304	0.260	0.200	0.254	0.207
C18:0	3.934	3.935	3.913	3.888	4.034	3.910
C18:1	9.902	10.148	10.093	10.094	10.404	10.030
C18:2	60.156	60.984	61.152	60.701	60.014	60.064
C18:3	5.525	5.404	5.414	5.533	5.322	5.677
C20:0	0.747	0.826	0.936	0.748	0.873	1.292
C20:1	0.356	0.271	0.407	0.545	0.381	0.509
C22:0	0.776	0.340	0.220	0.762	0.529	0.832
C22:1	0.537	0.607	0.551	0.612	0.404	0.358
Total AGS	21.510	20.924	20.902	20.708	21.611	22.116
Total AGI	75.584	76.537	76.660	76.329	75.741	75.772

III.3.3. Dosage des Stérols par UV-visible

A partir d'une solution chloroformique de cholestérol de concentration 1mg/ml, nous avons préparé une série de gamme de solutions afin de tracer une courbe d'étalonnage du cholestérol liant la densité optique en fonction de la concentration. Les résultats de ce dosage (tableau III.14) montrent clairement que les teneurs en stérols totaux des huiles des échantillons étudiés des graines de *Nigella sativa* L. sont importantes (14.38 à 28.88 mg/g) cette forte teneur elle peut-être expliquer aux interférences avec d'autres composés qui possèdent des structures chimiques semblables à la structure stérolique comme les méthyls stérols et les alcools tritérpéniques, la vitamine D, le β -carotène et d'autres composés qui absorbent a la longueur d'onde de dosage.

Chapitre III : Résultats et Discussions

(tableau III.15) . Cette teneur elle a augmentée en cour du temps de rôtissage car nous avons enregistré a 15, 20, 30 et 40 min des teneur de 2.79, 3.30 , 3.39 et 3.82 mg par 1 g d'huile, respectivement (figure III.19).

Tableau III.15 : Le taux des tocophérols totaux dans l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. torréfiées.

Temps de rôtissage à 180°C	Teneur (mg/g)
5 min	2.2 ± 0.1
10 min	2.15 ± 0.01
15 min	2.79 ± 0.2
20 min	3.3 ± 0.12
30 min	3.39 ± 0.05
40 min	3.82 ± 0.2

Les taux des composés tocophéroliques les plus élevés ont été détectés dans l'extrait des graines traitées durant 40 min (3.82 mg/g d'huile). Tandis que, les teneurs les plus basses sont observées pour les huiles fixes des graines traitées durant 5 min et 10 min (2.2 et 2.15 mg/g d'huile) respectivement.

Les résultats de cette analyse montrent que les échantillons des huiles étudiées contiennent des quantités importantes en tocophérols totaux ce qui leur confère une importante résistance à l'oxydation et une action vitaminique indéniable. Les résultats obtenues ne s'accorde pas avec d'autres études qui en étaient faites par G. Durmaz [109] et M. Jung [167] sur les noyaux d'abricot et les graines de soja respectivement , ils sont trouvé que la température de rôtissage diminue la teneur en tocophérols dans l'huile.

Chapitre III : Résultats et Discussions

Tableau III.16 : Teneur en tocophérols individuelles (mg/kg) dans l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. torréfiées.

Temps de rôtissage à 180 °C	composés			
	α -tocopherol	α -tocotrienol	γ -Tocopherol	δ -Tocopherol
5 min	49.6 ± 2	77.9 ± 2.9	1384.1 ± 55.4	17.9 ± 0.7
10 min	57.3 ± 2	52 ± 0.4	1073.9 ± 58.7	18.9 ± 0.1
15 min	70.7 ± 4.7	84.8 ± 4	1479.1 ± 24.8	18.6 ± 1.4
20 min	58.3 ± 0.1	113.7 ± 0.9	1848.4 ± 44.4	19.8 ± 0.1
30 min	55.1 ± 2.2	104 ± 4.9	1760.7 ± 154.2	18.6 ± 0.5
40 min	63.7 ± 2.2	99.2 ± 0.3	1807.6 ± 61.4	18.7 ± 0.4

Le contenu de l' γ -tocophérol dans l'huile de *Nigella sativa* L. après 5 min et 10 min de rôtissage en va avoir une diminution remarquable de cette teneur (figure III.20), à partir 15 minute en va avoir une augmentation de cette teneur elle va atteindre une valeur maximal de 1848.4 mg/kg, après 20 min de rôtissage (30 et 40min) cette teneur commence à diminuée mais d'une façon lente. Des tendances similaires ont été observées chez α -tocophérol et α -tocotrienol. Cependant, il n'y avait pas de différences dans le contenu de δ -Tocopherol.

Ces résultats sont en accord avec les résultats trouvés par G. Durmaz [109] . La réduction des tocophérols dans les huiles préparées à partir de graines de *Nigelle sativa* grillées à haute température pourrait s'expliquer par la décomposition thermique des tocophérols et réaction chimique (estérification) des tocophérols avec des fractions d'acide carboxylique d'acides aminés, peptides et protéines à température de rôtissage élevée [168]. En revanche, Yang-Yen, a signalé que le niveau de tocophérol dans les huiles de sésame traitées thermiquement par le chauffage du four a été augmenté [163].

Chapitre III : Résultats et Discussions

quantification des tocophérols totaux par colorimétrie est réalisée avec l'isomère α -tocophérol alors que l'analyse par CLHP montre que le γ -tocophérol est le plus dominant dans l'huile des graines de *Nigella sativa* L. Comme la pente de la courbe d'étalonnage dépend de la valeur du coefficient d'extinction molaire de l'isomère utilisé comme étalon dans le dosage, donc il est tout à fait clair que les valeurs des teneurs en tocophérols totaux ne soient pas les mêmes dans les deux méthodes de quantification. Dans ce cas, nous confirmons que les résultats obtenus par CLHP sont les plus fiables car la détection des tocophérols séparés est faite par fluométrie, technique plus sensible que l'UV.

III.3.6.Extraction et dosage des polyphénols

III.3.6.1.Dosage spectrophotométrique des phénols totaux

Dans la plupart des études, le contenu phénolique total a été mesuré afin d'estimer la contribution de ces substances à l'activité antioxydante [169, 170] La quantification des polyphénols dans les divers extraits de graines de *Nigella sativa* L. a été réalisée à l'aide des méthodes colorimétriques (réactif de Folin-Ciocalte et trichlorure d'alumine). Une courbe d'étalonnage a été établie avec l'acide gallique comme standard à différentes concentrations pour les polyphénols (figure III.4). Les résultats ont été exprimés en mg d'équivalent acide gallique (mg GAE / g MS) les résultats obtenues sont regroupés dans le tableau III.16

Tableau III.16 : Teneur en polyphénols totaux de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. torréfiées.

Temps de rôtissage à 180°C	Teneur en polyphénols totaux (mg GAE /g d'huile)
5(min)	0.0064 ± 0.0005
10 (min)	0.0076 ± 0.0016
15 (min)	0.0121 ± 0.002
20 (min)	0.0090 ± 0.0003
30 (min)	0.0093 ± 0.0003
40 (min)	0.0106 ± 0.0005

D'après la synthèse de l'ensemble de résultats obtenus lors de la quantification des phénols totaux obtenus pour chaque extraits, on peut constater que les teneurs de ces composés varient entre 0.0064 et 0.0121 mg GAE/ g de l'huile. Les taux des composés phénoliques les plus élevés

Chapitre III : Résultats et Discussions

III.3.6.2. Dosage des polyphénols par CLHP

Les études phytochimiques sur les graines traitées thermiquement de *Nigella sativa* L. sont limitées. La CLHP couplée à un détecteur à réseau de photodiode a été utilisée pour séparer et quantifier les composés phénoliques. Ces composés ont été identifiés en fonction de leur temps de rétention et des caractéristiques spectrales de leurs pics par rapport à ceux des étalons (annexe figure 2,3), ainsi que par piquage de l'échantillon avec des étalons.

Le profil chromatographique des extraits phénoliques des échantillons étudiés (annexe figure 20, 21, 22, 23 et 24) a révélé la présence des acides phénoliques identifiés à 280 nm. Il y avait trois acides phénoliques connus dans tous les extraits l'acide gallique, l'acide vanillique et l'acide coumarine et des composés inconnus.

L'analyse par CLHP des flavonoïdes a révélé la présence de quatre composés à 360 nm la rutine, apigénine, le kaempférol et l'epicatichine. Les composés les plus abondants dans tous les échantillons des graines de *Nigella sativa* L. étaient l'acide gallique pour les acides phénoliques et la Rutine pour les flavonoïdes. des acides phénoliques et des flavonoïdes identifiés dans les graines de *Nigella sativa* L. par d'autres auteurs, n'ont pas été détectés dans nos échantillons, probablement en raison de différences de variété telle que l'Acide Chlorogénique, acide *p*-Dihydroxybenzoïque, acide Ferulique, *trans*-2hydroxycinnamique, (-)-Epicatechine, (+)-Catechine et d'isorhamnetin [28].

Les résultats (tableau III.17) ont montré que les différences dans la composition phénolique de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. traitées étaient significativement plus quantitatives que qualitatives. À l'exception de l'Epicatechine détectés uniquement dans l'huile fixe des graines traitées pendant 15, 20, 30 et 40 min.

Chapitre III : Résultats et Discussions

Tableau III.17. Teneur ($\mu\text{g}/\text{mL}$ d'huile) d'acides phénoliques et de flavonoïdes dans l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. torréfiées.

composé	Temps de rôtissage à 180°C					
	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min	40 min
Acide gallique	0.66	0.65	60.42	57.14	12.04	11.64
Catéchine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Acide vanillique	0.00	0.00	56.04	53.56	0.46	0.35
Epicatchine	0.00	0.00	40.01	98.90	14.06	4.42
Acide coumarique	0.00	0.00	12.06	12.38	3.19	10.13
Apigénine	1.41	1.20	7.06	55.22	4.21	0.73
Naringénine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Rutine	0.45	0.45	668.84	121.91	135.14	20.26
Quercétine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Kaempferol	0.04	0.04	1.57	0.34	0.41	0.00

Nous avons suivi l'évolution des composés abondants (figure III 21 et figure III.22) pour l'acide gallique la valeur enregistrée dans le cas de l'huile fixe des graines traitées pendant 5 min et de 0.66 ($\mu\text{g}/\text{mL}$ d'huile) Pour les graines traitées pendant 10 min la valeur enregistrées et de 0.65 ($\mu\text{g}/\text{mL}$ d'huile) en peut dire qu'il n'y a pas de changement. Après 15 min de rôtissage on va avoir une augmentation importante de la teneur elle est de l'ordre de 60.42 ($\mu\text{g}/\text{mL}$ d'huile) cette augmentation elle causé par l'altération des tanins hydrolysables dérivés de l'acide gallique[173] . à partir de 20 min de rôtissage la teneur en acide gallique commence à démunie elle va atteindre la valeur de 11.64 ($\mu\text{g}/\text{mL}$ d'huile) après 40 min de rôtissage.

Des tendances similaires ont été observées chez la rutine (tableau III.17), une augmentation importante a été enregistrée à 15 min de rôtissage cette teneur elle va commencer à diminuer à partir de 20 min de rôtissage et elle va atteindre une valeur de 20.6 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) d'huile après 40 min de rôtissage . Pour les composés mineurs comme le kaempférol, l'apigénine et l'acide vanillique nous avons remarqué les mêmes tendances que les autres composés majoritaires .la teneur de ces composés elle diminuait de manière significative et elle va atteindre une valeur minime.

Ces résultats nous ont permis de dire que ces composés ne sont pas stables thermiquement à haute température par rapport à l'acide gallique. le point important dans cette analyse c'est l'apparition de l'epicatichine dans les huiles des graines traitées pendant 15,20,30 et 40 or

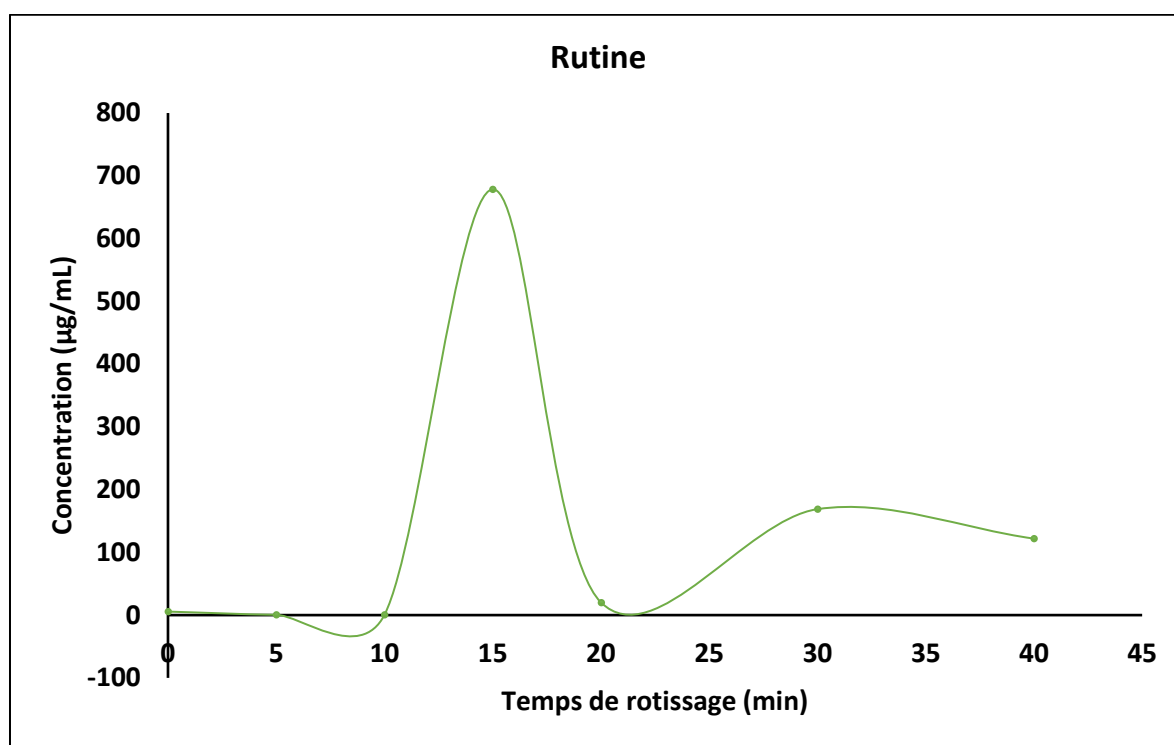


Figure III.22 : La variation de la teneur en rutine dans l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. en fonction du temps de rôtissage.

III.3.7. Evaluation de l'activité antioxydante de l'huile fixe.

III.3.7.1. Teste DPPH

L'activité antioxydante des différentes huiles des graines de *Nigella sativa* L traitées pendant plusieurs moments et des antioxydants standard (BHT et BHA) par rapport au DPPH • a été évalué à l'aide d'un spectrophotomètre suite à la réduction de ce radical, qui s'accompagne de son passage de la couleur violette (DPPH •) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurable à 515 nm. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances antiradicalaires [176].

Les résultats du pouvoir antioxydant des huiles des graines traitées sont présentées par (annexe Figure. 25, 26, 27,28 , 29 et 30) Les valeurs IC50 déterminées en mg / ml, exprimant la concentration efficace des différents extraits antioxydants de *Nigelle Sativa* L nécessaire pour piéger et réduire 50% de DPPH • dissous dans l'acétate d'éthyle, sont résumés dans le Tableau III.16 .Les résultats obtenus ont montré que les extraits de *Nigelle sativa* L. présente un pouvoir antioxydant très important par rapport à d'autres huiles tels que l'huile de Noyau d'Abricot [109] et l'huile d'Argon [177] . Cette activité elle est comparable avec celle des antioxydants

Chapitre III : Résultats et Discussions

de référence BHT (922.0391 mL/mg) et BHA (787.6289 mL/mg) Toutefois, les antioxydants standards sont 3 fois plus actifs que nos extraits.

Tableau III.18 : Les valeurs d'EC 50 des différents huiles des graines torréfiées pendant différents temps dans le test du DPPH.

Temps de rôtissage (min) à 180°C	EC50 (mg/mL)	ARP (mL/mg)
5	0.0066±0.0001	151.51
10	0.0039±0.0004	256.41
15	0.0032±0.0003	312.5
20	0.004±0.0001	250.00
30	0.0039±0.0002	256.41
40	0.0057±0.0003	175.44
BHT	0.0011 ± 0.0001	922.0391
BHA	0.0013 ± 0.0003	787.6289

D'après les résultats obtenus de ce screening, on peut remarquer que les huiles fixes obtenues à partir des graines de *Nigella sativa* L. traitées pendant plusieurs temps ont affichés un pouvoir antiradicalaire allant de 151.1 au 312.5 mg/mL. Le rôtissage a entraîné une nette augmentation de l'activité antioxydante mesurée par les tests DPPH.

L'activité antioxydante de l'huile de *Nigella sativa* L a progressivement augmenté pendant la torréfaction, atteignant un maximum apparent en moins de 15 minutes. Il y avait une légère diminution de la capacité antioxydante des échantillons après une durée de torréfaction de 20 min. Tandis que, l'huile des graines traitées pendant 5 min présente un statut antiradicalaire faible. Ce résultats est en accord avec la littérature la plus part des recherche ont trouvé que le temps idéal de la torréfaction est entre 15 et 20 min [109, 172, 178].

On a essayé de trouver une corrélation linéaire entre les valeurs de ARP et les teneurs en tocophérols totaux, on a obtenu un coefficient de corrélation positif ($R^2 = 0.62$). Ce résultat, décrit que l'efficacité antiradicalaire des extraits varie avec la teneur en tocophérol totaux des huiles

Chapitre III : Résultats et Discussions

étudiées. Une explication possible de ce résultat peut être retirée, par le fait que les extraits possédant une activité réductrice du DPPH. Importante peuvent renfermer que des molécules antioxydantes tels que les caroténoïdes, les vitamines, des composés phénoliques, flavonoïdes, etc

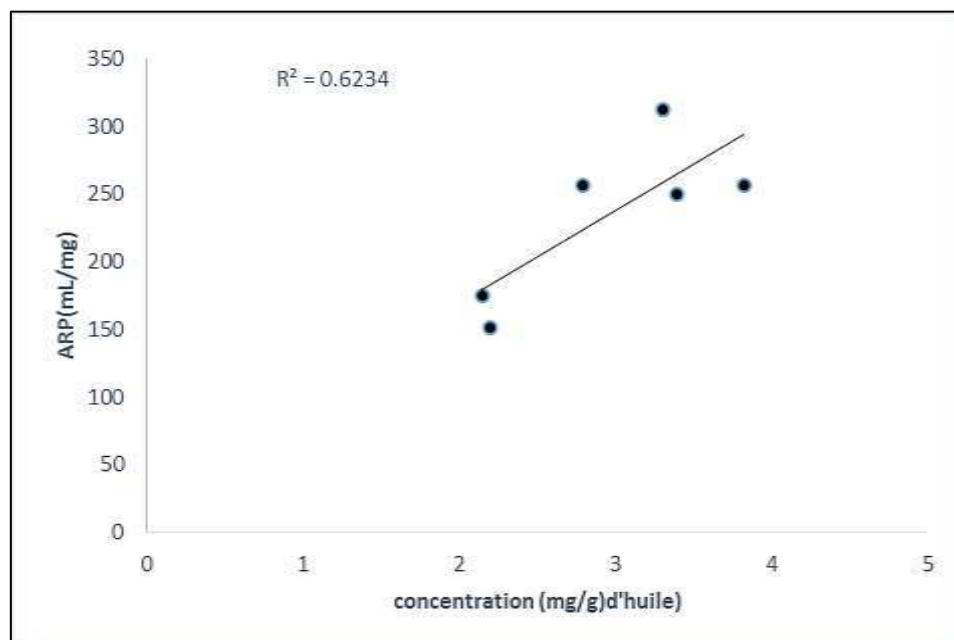


Figure III.23 : La variation des valeurs d'ARP du test du DPPH en fonction des concentrations en tocophérols de l'huile fixe des graines torréfiées.

Nous avons enregistré une corrélation linéaire positif mais elle est faible par rapport à celle trouvé avec la teneur en tocophérols totaux entre les valeurs d'ARP et la teneur en polyphénols totaux de l'huile des graines torréfiées à partir de ce résultats en peut dire que l'activité antiradicalaire des huiles étudiées elle n'est pas due forcément a la présence des polyphénols elle due à d'autre substances responsable sur cette activité tels que les caroténoïdes, les vitamines, etc.

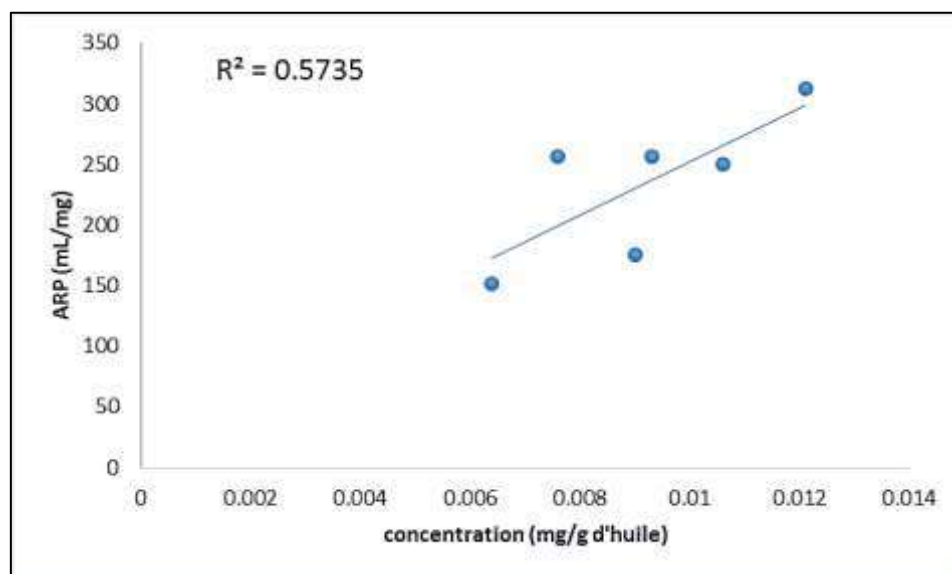


Figure III.24. La variation des valeurs d'ARP du test du DPPH en fonction des concentrations en tocophérols de l'huile fixe des graines traitées.

III.3.7.2. Teste de blanchiment de β -carotène

Les activités inhibitrices de peroxydation des lipides par l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. ont été évaluées par l'essai du blanchiment du β -carotène qui est fondé sur la perte de la couleur jaune de β -carotène due à sa réaction aux radicaux qui sont constitués par oxydation d'acide linoléique dans une émulsion. La présence de différents antioxydants peut gêner l'ampleur du blanchiment du β -carotène en neutralisant le radical libre de linoléate et d'autres radicaux libres formés dans le système [179]. Cette méthode est employée couramment parce que le β -carotène montre une activité biologique forte et est un composé physiologique important [179].

En outre, le β -carotène est employé comme agent de coloration en boissons, et sa décoloration réduirait nettement la qualité de ces produits [179]. De ce fait, il est employé dans l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits lipidiques des graines de *Nigella sativa* L. La cinétique de blanchiment du β -carotène selon la présence ou l'absence dans les extraits lipidiques de *Nigella sativa* L. et de l'antioxydant standard (BHA et BHT) est montrée dans la Figure III.12. Comme l'indique la Figure III.12, les courbes ont la même allure, ce qui implique la même interprétation : au temps (t_0) : la densité optique de tous les extraits, le standard et le contrôle (-), étant presque la même et présentant un seuil d'absorbance d'environ 0.700. Cela est expliqué par le fait qu'à ce moment-là il n'y a aucun RL qui a été formé dans le milieu

Chapitre III : Résultats et Discussions

réactionnel, par conséquent le β -carotène reste hautement insaturé, la couleur jaune confère alors une absorbance maximale, ce temps peut être nommé « temps de repos » ; – au temps ($t : 0h$): l'absorbance commence à diminuer progressivement pour tous les extraits, le standard et le contrôle (–), ce qui indique sans doute le début de la formation des RLs dans le milieu réactionnel généré par l'acide linoléique suite à la rupture des doubles liaisons par le tween 20, on préfère nommer ce temps « temps de génération » ; – après ce temps ($0 \text{ min} < t \leq 120 \text{ min}$): l'étude de cinétique de blanchiment du β -carotène montre que celui-ci diminue graduellement avec le temps, pour atteindre un état stationnaire au bout de 120 min, Après ce temps-là, il reste constant, ce qui montre que toutes les doubles liaisons présentes dans le β -carotène sont dégradées, ce qui s'achève à l'épuisement irréversible de la coloration jaune par la transformation en une couleur blanche, c'est donc le blanchiment total du β -carotène, ce temps est dit « temps d'épuisement ».

Par ailleurs, d'après la Figure III.12, on remarque que la courbe qui correspond au contrôle (–) diminue d'une façon rapide, car il n'y a aucun antioxydant qui puisse inhiber ou diminuer l'oxydation du β -carotène.

L'activité antioxydante de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. exprimée par le EC50 (la concentration en extrait qui inhibe le blanchiment de 50 % β -carotène) est calculée à partir du graphe du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration d'extrait en utilisant l'équation exponentielle (annexe figure 31,32,33,34,35 et 36)

Les résultats de blanchiment du β -carotène Tableau III.19 ont indiqué que La torréfaction a entraîné une nette augmentation de l'activité antioxydante qui a été mesurée par le test de blanchiment de β -carotène. Cette Activité antioxydante de l'huile fixe de *Nigella sativa* L. augmente progressivement pendant la torréfaction jusqu'à atteindre un maximum apparent dans les 15min. Il y avait une légère diminution de la capacité antioxydante des échantillons après une durée de torréfaction de 30 min.

L'activité la plus élevée a été montrée par l'huile fixe des graines traitées pendant 15 min (ARP = 666.66) elle est 5 fois supérieur que l'activité de l'antioxydant de référence BHA. Une faible activité a été enregistrée dans le cas de l'huile des graines traitées pendant 5 min.

L'augmentation de l'activité antioxydante des huiles des noix d'Abricot torréfiées avait déjà été rapportée par Karabulut [109]. Cette augmentation est principalement liée aux composés relativement polaires dans l'huile accumulés au cours de rôtissage.

Chapitre III : Résultats et Discussions

Tableau III.19 Les valeurs d'IC 50 des différents huiles des graines torréfiées dans le test de blanchiment de β -carotène

Temps de rôtissage (min) à 180°C	EC50 (mg/mL)	ARP(mL/mg)
5	0.0027 \pm 0.0001	370.37
10	0.0021 \pm 0.0004	476.19
15	0.0015 \pm 0.0003	666.66
20	0.0017 \pm 0.0003	588.23
30	0.0017 \pm 0.0001	588.23
40	0.0019 \pm 0.0002	526.32
BHT	0.0005 \pm 0.00001	2000
BHA	0.0073 \pm 0.0004	136.99

L'analyse statistique montre la présence d'une corrélation linéaire significative entre la teneur de ces huiles en polyphénols totaux et le pourcentage d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique ($R^2 = 0.9296$) ce qui indique la contribution de ces composés qui sont les antioxydants dominants dans ces extraits (pouvoir antioxydant de la plante).

Ces résultats sont en accord avec les résultats de plusieurs groupes de recherche, qui ont rapporté une corrélation positive entre le contenu phénolique, le contenu en tocophérols et l'activité antioxydante .

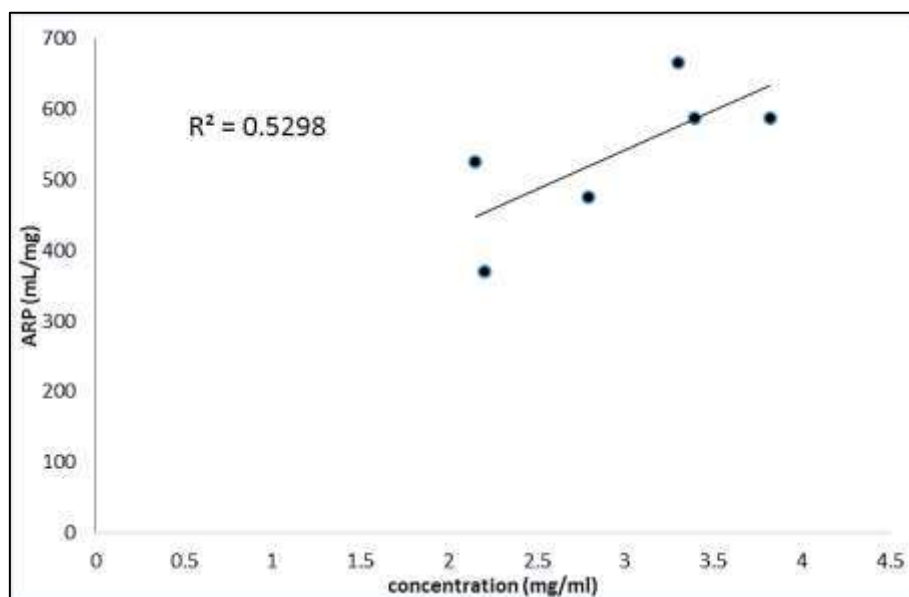


Figure III.25 : La variation des valeurs d'ARP du Teste de blanchiment de β -carotène en fonction des concentrations en tocophérols totaux de l'huile fixe des graines torrifiées.

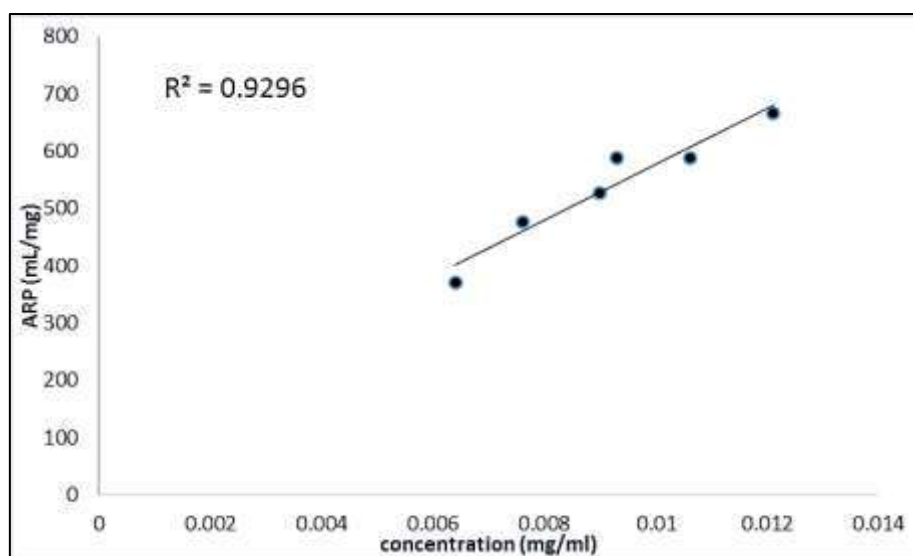


Figure III.26 : La variation des valeurs d'ARP du Teste de blanchiment de β -carotène en fonction des concentrations en polyphénols totaux de l'huile fixe des graines torrifiées.

Beaucoup de recherches ne pouvaient pas trouver de corrélation significative entre la teneur totale des antioxydants et l'activité antioxydante des extraits des plantes. Cela peut être due que les fruits et légumes contiennent beaucoup de différents composants antioxydants, y compris les caroténoïdes, des vitamines, des composés phénoliques, flavonoïdes, etc., ce qui pourrait affecter la mesure de l'activité antioxydante. De plus, dans notre étude, il n'y avait pas de

Chapitre III : Résultats et Discussions

encourageants et mériteraient d'être confirmés par d'autres tests *in vitro* et *in vivo*. Mais, pour faire la distinction entre les extraits doués d'un effet piègeur du radical DPPH proprement dit de ceux ayant un effet protecteur de B-carotène, nous devons faire d'autres techniques complémentaires, et ce n'est qu'après l'analyse des valeurs d'EC₅₀ qui seront obtenues par ces techniques complémentaires, qu'on peut affirmer l'effet piègeur des radicaux libres ou réducteur des oxydes de l'acide linoléique de ces extraits phénoliques. En outre, ces résultats montrent que nos extraits fournissent des activités antioxydantes assez importantes qui peuvent être liées à la présence de certaines molécules bioactives.

Conclusion générale

Conclusion générale

Nous avons vu que *Nigella sativa* L., est une plante utilisée d'abord comme épice puis comme remède depuis plus de 2000 ans dans la culture orientale, a un large spectre d'activité, et plus particulièrement son constituant principal, dans le présent travail, nous nous sommes intéressés en premier lieu à la détermination de la composition chimique de l'huile fixe extraite à partir des graines de *Nigella sativa* L. ,de l'extrait Méthanolique et l'extrait acétonique des tourteaux et nous avons évalué leurs activités antioxydante et antibactérienne .

Ibn Sina, connu sous le nom d'Avicenne (980-1037), traite de *Nigella sativa* L. dans son ouvrage « le Livre de la guérison de l'âme » ou « *Kitab Al-Chifâ*». Il conseillait de griller les graines de *Nigella sativa* avant de les utilisés comme remède, de cet effet, dans la deuxième partie de ce travail nous avons étudié un facteur important celui du rôtissage et son effet sur la composition chimique et l'activité antioxydante des huiles des graines de la plante étudiée.

Les résultats de la présente étude ont montré que les graines de *Nigella sativa* L. contiennent des quantités acceptables en matières grasses brutes. La teneur en huile des graines est de 15,2%. Cette valeur elle est faible par rapport aux valeurs trouvées par d'autres chercheurs.

L'analyse par CPG de l'huile extraite des graines de *Nigella sativa*, a montré que les acides oléiques (C18 : 1) (10.619%), linoléiques (C18 : 2) (58.854%) et linoléique (C18 : 3) (5.466%) étaient les principaux acides gras insaturés. Les principaux acides gras saturés de l'huile de graines de *Nigella sativa* L. étaient l'acide palmitique (C16 : 0) (17.207%) et stéarique (C18 : 0) (4.329%) Les teneurs importantes en acides gras insaturés suggèrent leur utilisation potentielle nutritionnelle pour des prestations de santé. La quantification des stérols dans les huiles des graines de *Nigella sativa* L a été faite par la méthode colorimétrique de Liebermann-Burchard.la teneur des stérols est 2.8815 mg/g d'huile elle est supérieur que celle précédemment données publiées par (Atta, 2003)

L'analyse des tocophérols en huiles dans l'échantillon étudié de *Nigella sativa* L.par HPLC fait apparaitre une forte prédominance des isomères (γ)-tocophérol et forte quantité de α -tocotrienol avec des teneurs de 1989,00mg/kg et 126,7 mg/kg respectivement. en revanche d'après nos connaissances aucune recherche a confirmé la présence de l'isomère α -tocotrienol dans les huiles des graines de *Nigella sativa* L.

Les résultats de l'analyse quantitative des extraits phénoliques obtenus par le système d'extraction (MeOH/Eau :7/3), montrent que les tourteaux des graines contiennent toutes des

Conclusion générale

composés phénoliques avec une teneur de 0.008mgGAE /g des tourteaux. La valeur de la quantité des flavonoïdes obtenus par la méthode du chlorure d'aluminium est de 0.0007mg CE/g de tourteaux.. Le dosage des composés phénoliques par la méthode de Folin-Ciocalteu obtenus par le système d'extraction (Acétone/Eau :7/3) montrent que la valeur de la teneur est de 0,5962 mg / g de tourteaux. Cependant, la teneur en flavonoïdes totaux est de 0,2746 mg/g tourteaux.

L'analyse qualitative et quantitative des polyphénols des extraits méthanoliques, acétoniques des tourteaux et de l'extrait phénolique des huiles fixes de *Nigella sativa* L a été faite par HPLC. cette analyse a révélé la présence des différents composés acides phénoliques et flavonoïdes tels que l'acide gallique, le kaempférol, la rutine, l'apigénine, la naringine et la quercétine, avec l'absence de catéchine, acide vanillique, épicatechine et l'acide coumarique dans les deux extraits des tourteaux. Pour les huiles fixes nous avons enregistré la présence de l'acide Gallique ,acide Vanillique, acide Coumarique, Apigenin ,Rutin ,Kaempferol et l'absence de Naringenin ,Catéchine ,Epicatchine et la Quercetin.

Les flavonoïdes dominants Pour les extraits methanolique et acetonique des tourteaux étaient la rutine suivi de l 'Apigenine .En revanche le seul acide phénolique détecté dans les deux extraits est l'acide gallique. pour l'extrait phénolique des huiles fixes des grains de *Nigella sativa* L le flavonoïde majoritaire était la rutine suivi de l 'Apigenine et de Kaempferol .contrairement au extraits phénoliques des tourteaux, l'analyse chromatographique a révélé la présence de trois acide phénolique dont ,l'acide gallique est le composé dominant ,l'acide vanillique et l'acide Coumarique.

La détermination de l'activité antioxydante des extraits par la mesure de leur pouvoir piègeur du radical DPPH par donation de protons et leur aptitude à retarder la cinétique de décoloration du β -carotène permet de constater que les extraits des graines de *Nigella sativa* semblent présenter un intérêt réel et potentiel par leurs activités antioxydantes qui ont été établies *in vitro*. les huiles fixes de la plante présente une très forte capacité à piéger le radical libre que les extraits methanolique et acetonique des tourteaux et ils ont un statut antiradicalaire remarquable par rapport au BHT.

Dans le teste de blanchiment du β -carotène les huiles fixes présente un effet protecteur non négligeable de l'ordre de 33.4448 mL/mg comparé à celui du BHT (1369.86 mL/mg) et il est incomparable avec celui de BHA (2000 mL/mg) . En revanche le pouvoir protecteur des

Conclusion générale

extraits méthanolique (14.0647 mL/mg) et acétonique (8.3194mL/mg) il est très faible par rapport à l'effet des antioxydants des références et aux huiles fixes des graines.

Les trois extraits méthanolique ,acétonique et l'huile fixe ont presque le même niveau d'activité antimicrobienne contre les levures (*Candida albicans* ATCC 10231), le diamètre de sensibilité des trois extraits étant respectivement égal à $(13,00 \pm 0,50 \text{ mm})$, $(10,10 \pm 0,30 \text{ mm})$ et $(13.5 \pm 0.3 \text{ mm})$. En revanche, dans le cas de souches bactériennes, l'extrait méthanolique révèle un effet considérable contre les souches bactériennes étudiées. Avec une activité élevée contre *Bacillus subtilis* et une activité modérée contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. L'extrait acétonique a une forte activité contre *Bacillus subtilis* et faible contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, pour les huiles fixes des graines aucune sensibilité a été enregistré par *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*.

Le niveau des γ -tocophérol et α -tocotrienol les isomères des tocophérols des huiles de la *Nigelle Sativa*, étaient abaissés par rôtissage par rapport aux huiles des graines non torréfiées. De ce fait, on pourrait présumer que la disparition des tocophérols a été compensée par les polyphénols qui sont apparus pendant le prétraitement. Ces résultats ont été confirmés par les tests antioxydants dans lesquels DPPH et blanchiment du β -carotène.

Les radicaux ont été récupérés mieux par les huiles des graines grillées comparé à l'échantillon non torréfié. Selon les résultats de cette étude, nous pouvons affirmer que la durée de conservation des huiles fixes des graines de *Nigella sativa* L. pourrait être améliorée par un rôtissage approprié. Plus loin des études pourraient être consacrées à la clarification de la structure moléculaire de chaque composé phénolique individuel.

Egalement il sera envisageable, de tester ces huiles fixes biologiquement pour tenter de chercher par exemple des anti-inflammatoires, des antifongiques, des inhibiteurs d'enzyme, ou autres. Aussi, serait-il souhaitable, pour une meilleure compréhension du mode d'action des dérivés polyphénoliques et des tocophérols, d'évaluer in vitro et in vivo l'activité antioxydante de chacun de ces composés pris séparément. Ce qui permettrait alors de mettre en évidence le principe actif des huiles fixes des graines et/ou une éventuelle synergie entre les différents composés présent.

Bibliographie

Bibliographie

- [1] L. A. Pham-Huy, H. He, and C. Pham-Huy, "Free radicals, antioxidants in disease and health," *International journal of biomedical science: IJBS*, vol. 4, p. 89, 2008.
- [2] A. Gurib-Fakim, "Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow," *Molecular aspects of Medicine*, vol. 27, pp. 1-93, 2006.
- [3] N. Galaffu, K. Bortlik, and M. Michel, "An industry perspective on natural food colour stability," in *Colour additives for foods and beverages*, ed: Elsevier, 2015, pp. 91-130.
- [4] K. B. Pandey and S. I. Rizvi, "Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease," *Oxidative medicine and cellular longevity*, vol. 2, pp. 270-278, 2009.
- [5] A. Dudtschenko, A. Kos' jakov, and V. Krivenko, "Spicy-aromatic and spicy tasting plants. A encyclopedia," 1989.
- [6] M. L. Salem, "Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed," *International immunopharmacology*, vol. 5, pp. 1749-1770, 2005.
- [7] B. Saidi, *La Graine de Nigella: remède sacré ou sacré remède?: Habba Sawda*: Ed. Iqra, 2010.
- [8] O. BENZINE, "Caractérisation par HPLC de quelques composés chimique de l'huile de nigelle (*Nigella Sativa*), et recherche d'une activité antimicrobienne," 2013.
- [9] G. Bonnier, "La grande flore en couleur. Édition Belin," tomes 1-2-3-4, Paris, France, 1 401 p1990.
- [10] A. Özel, U. Demirel, İ. Güler, and K. Erden, "Farklı Sıra Aralığı ve Tohumluk Miktarlarının Çörek Otunda (*Nigella sativa* L.) Verim ve Bazı Tarımsal Karakterlere Etkisi," *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, vol. 13, pp. 17-25, 2009.
- [11] P. B. Jean-Paul, "La Nigelle, une panacée peu connue en Occident," Université de Bourgogne, 1987.
- [12] B. B. Aggarwal and A. B. Kunnumakkara, *Molecular targets and therapeutic uses of spices: modern uses for ancient medicine*: World Scientific, 2009.
- [13] M. Akhtar and M. Aslam, "Anticestodal principles of *Nigella sativa*, Linn.(Kalonji) seeds," *Pak. J. Pharmacol*, vol. 14, pp. 7-14, 1997.
- [14] P. J. Houghton, R. Zarka, B. de las Heras, and J. Hault, "Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation," *Planta medica*, vol. 61, pp. 33-36, 1995.
- [15] M. Mansour, O. Ginawi, T. El-Hadiyah, A. El-Khatib, O. Al-Shabanah, and H. Al-Sawaf, "Effects of volatile oil constituents of *Nigella sativa* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice: evidence for antioxidant effects of thymoquinone," *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*, vol. 110, pp. 239-252, 2001.
- [16] L. Canonica, G. Jommi, C. Scolastico, and A. Bonati, "The pharmacologically active principle in *Nigella sativa*," *Gazz Chim Ital*, vol. 93, pp. 404-7, 1963.
- [17] M. Burits and F. Bucar, "Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil," *Phytotherapy Research*, vol. 14, pp. 323-328, 2000.
- [18] M. Salman, R. Khan, and I. Shukla, "Antimicrobial activity of *N. sativa* oil against *Staphylococcus aureus* obtained from clinical specimens," in *The 38th Annual Conference of Indian Pharmacological Society*, 2005.

Bibliographie

- [19] N. Salman and A. L. Saives, "Indirect networks: an intangible resource for biotechnology innovation," *r&d Management*, vol. 35, pp. 203-215, 2005.
- [20] E. Aboutabl, A. El-Azzouny, and F. Hammerschmidt, "Aroma volatiles of *Nigella sativa* L. seeds," in *Prog Essent Oil Res., Proceeding International Symposium Essential Oils. DeGruyer, Berlin*, 1986, pp. 49-55.
- [21] J. Z. Ansari, A. Haq, M. Yousaf, T. Ahmad, and S. Khan, "Evaluation of different medicinal plants as growth promoters for broiler chicks," *Sarhad J. Agri*, vol. 24, pp. 323-330, 2008.
- [22] S. N. Goyal, C. P. Prajapati, P. R. Gore, C. R. Patil, U. B. Mahajan, C. Sharma, S. P. Talla, and S. K. Ojha, "Therapeutic Potential and Pharmaceutical Development of Thymoquinone: A Multitargeted Molecule of Natural Origin," *Frontiers in pharmacology*, vol. 8, p. 656, 2017.
- [23] M. Guillén, M. D. Benaiges, and F. Valero, "Comparison of the biochemical properties of a recombinant lipase extract from *Rhizopus oryzae* expressed in *Pichia pastoris* with a native extract," *Biochemical engineering journal*, vol. 54, pp. 117-123, 2011.
- [24] L. Ait Mbarek, H. Ait Mouse, N. Elabbadi, M. Bensalah, A. Gamouh, R. Aboufatima, A. Benharref, A. Chait, M. Kamal, and A. Dalal, "Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts," *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 40, pp. 839-847, 2007.
- [25] A. E. Al-Snafi, "Bioactive components and pharmacological effects of *Canna indica*-An Overview," *International Journal of Pharmacology and toxicology*, vol. 5, pp. 71-75, 2015.
- [26] N. Salem Jr, B. Litman, H. Y. Kim, and K. Gawrisch, "Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system," *Lipids*, vol. 36, pp. 945-959, 2001.
- [27] I. Merfort, V. Wray, H. Barakat, S. Hussein, M. Nawwar, and G. Willuhn, "Flavonol triglycosides from seeds of *Nigella sativa*," *Phytochemistry*, vol. 46, pp. 359-363, 1997.
- [28] S. Bourgou, R. Ksouri, A. Bellila, I. Skandrani, H. Falleh, and B. Marzouk, "Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots," *Comptes Rendus Biologies*, vol. 331, pp. 48-55, 2008.
- [29] D. Sompolinsky, Z. Samra, W. Karakawa, W. Vann, R. Schneerson, and Z. Malik, "Encapsulation and capsular types in isolates of *Staphylococcus aureus* from different sources and relationship to phage types," *Journal of clinical microbiology*, vol. 22, pp. 828-834, 1985.
- [30] D. J. Amit, H. Gutfreund, and H. Sompolinsky, "Storing infinite numbers of patterns in a spin-glass model of neural networks," *Physical Review Letters*, vol. 55, p. 1530, 1985.
- [31] S. Malik, H. Cun-Heng, and J. Clardy, "Isolation and structure determination of nigellicine, a novel alkaloid from the seeds of *nigellasativa*," *Tetrahedron letters*, vol. 26, pp. 2759-2762, 1985.
- [32] S. Malik, S. S. Hasan, M. I. Choudhary, C.-Z. Ni, and J. Clardy, "Nigellidine—a new indazole alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*," *Tetrahedron letters*, vol. 36, pp. 1993-1996, 1995.

- [33] A. Al-Gaby, "Amino acid composition and biological effects of supplementing broad bean and corn proteins with *Nigella sativa* (black cumin) cake protein," *Food/Nahrung*, vol. 42, pp. 290-294, 1998.
- [34] D. Guha, D. Biswas, and S. Purkayastha, "Suppression of penicillin-induced epileptiform activity by *Nigella sativa*: possible mediation by neurotransmitters," *Biogenic Amines*, vol. 19, pp. 309-321, 2005.
- [35] P. Dubey, B. Singh, B. Mishra, K. Kant, and R. Solanki, "*Nigella* (*Nigella sativa* L.): A high value seed spice with immense medicinal potential," *Indian Journal of Agricultural Sciences*, vol. 86, pp. 967-979, 2016.
- [36] M. B. Atta, "Some characteristics of *nigella* (*Nigella sativa* L.) seed cultivated in Egypt and its lipid profile," *Food chemistry*, vol. 83, pp. 63-68, 2003.
- [37] I. A. Al-Saleh, G. Billedo, and I. I. El-Doush, "Levels of selenium, dl- α -tocopherol, dl- γ -tocopherol, all-trans-retinol, thymoquinone and thymol in different brands of *Nigella sativa* seeds," *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 19, pp. 167-175, 2006.
- [38] E. Aboutabl, F. Soliman, S. El-Zalabani, E. Brunke, and T. El-kersk, "Essential oil of *Achillea fragrantissima* (Forssk.) Sch. Bip.," *J Pharm Sci*, vol. 27, pp. 215-219, 1986.
- [39] S. Cheikh-Rouhou, S. Besbes, B. Hentati, C. Blecker, C. Deroanne, and H. Attia, "*Nigella sativa* L.: Chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction," *Food Chemistry*, vol. 101, pp. 673-681, 2007.
- [40] B. Ribeiro, P. G. de Pinho, P. B. Andrade, P. Baptista, and P. Valentão, "Fatty acid composition of wild edible mushrooms species: A comparative study," *Microchemical Journal*, vol. 93, pp. 29-35, 2009.
- [41] F. A. Saleh, N. El-Darra, K. Raafat, and I. El Ghazzawi, "Phytochemical Analysis of *Nigella sativa* L. Utilizing GC-MS Exploring its Antimicrobial Effects against Multidrug-Resistant Bacteria," *Pharmacognosy Journal*, vol. 10, 2018.
- [42] B. Nickavar, F. Mojab, K. Javidnia, and M. A. R. Amoli, "Chemical composition of the fixed and volatile oils of *Nigella sativa* L. from Iran," *Zeitschrift für Naturforschung C*, vol. 58, pp. 629-631, 2003.
- [43] C. DRĂGULESCU and N. ROMAN, "THE CORMOPYTE FLORA OF CERNETU VILLAGE (TELEORMAN COUNTY, ROMANIA)," *Acta Oecologica Carpatica*, vol. 10, 2017.
- [44] F. Benkaci-Ali, A. Baaliouamer, B. Y. Meklati, and F. Chemat, "Chemical composition of seed essential oils from Algerian *Nigella sativa* extracted by microwave and hydrodistillation," *Flavour and fragrance journal*, vol. 22, pp. 148-153, 2007.
- [45] F. Benkaci-Ali, A. Baaliouamer, J. P. Wathelet, and M. Marlier, "Chemical composition of volatile oils from Algerian *Nigella sativa* L. seeds," *Journal of Essential Oil Research*, vol. 22, pp. 318-322, 2010.
- [46] S. C. El-Saleh, O. A. Al-Sagair, and M. I. Al-Khalaf, "Thymoquinone and *Nigella sativa* oil protection against methionine-induced hyperhomocysteinemia in rats," *International journal of cardiology*, vol. 93, pp. 19-23, 2004.
- [47] K. Ghedira and R. Le Jeune, "Huile de nigelle cultivée, *Nigella sativa* L.(Ranunculaceae)," *Phytothérapie*, vol. 8, pp. 124-128, 2010.

Bibliographie

- [48] A. Sokmen, B. M. Jones, and M. Erturk, "Antimicrobial activity of extracts from the cell cultures of some Turkish medicinal plants," *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, vol. 13, pp. 355-357, 1999.
- [49] N. P. Seeram, L. S. Adams, S. M. Henning, Y. Niu, Y. Zhang, M. G. Nair, and D. Heber, "In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice," *The Journal of nutritional biochemistry*, vol. 16, pp. 360-367, 2005.
- [50] S. H. M. Aljabre, M. A. Randhawa, N. Akhtar, O. M. Alakloby, A. M. Alqurashi, and A. Aldossary, "Antidermatophyte activity of ether extract of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 101, pp. 116-119, 2005.
- [51] A. Ghannadi, V. Hajhashemi, and H. Jafarabadi, "An investigation of the analgesic and anti-inflammatory effects of *Nigella sativa* seed polyphenols," *Journal of medicinal food*, vol. 8, pp. 488-493, 2005.
- [52] N. Ilaiyaraja and F. Khanum, "*Nigella sativa* L: a review of therapeutic applications," *Journal of Herbal Medicine and Toxicology*, vol. 4, pp. 1-8, 2010.
- [53] S. Swamy and B. Tan, "Cytotoxic and immunopotentiating effects of ethanolic extract of *Nigella sativa* L. seeds," *Journal of ethnopharmacology*, vol. 70, pp. 1-7, 2000.
- [54] E. I. Salim and S. Fukushima, "Chemopreventive potential of volatile oil from black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds against rat colon carcinogenesis," *Nutrition and Cancer*, vol. 45, pp. 195-202, 2003.
- [55] A. Haq, M. Abdullatif, P. I. Lobo, K. S. Khabar, K. V. Sheth, and S. T. Al-Sedairy, "*Nigella sativa*: effect on human lymphocytes and polymorphonuclear leukocyte phagocytic activity," *Immunopharmacology*, vol. 30, pp. 147-155, 1995.
- [56] M. L. Salem and M. S. Hossain, "Protective effect of black seed oil from *Nigella sativa* against murine cytomegalovirus infection," *International journal of immunopharmacology*, vol. 22, pp. 729-740, 2000.
- [57] A. Haq, P. I. Lobo, M. Al-Tufail, N. R. Rama, and S. T. Al-Sedairy, "Immunomodulatory effect of *Nigella sativa* proteins fractionated by ion exchange chromatography," *International journal of immunopharmacology*, vol. 21, pp. 283-295, 1999.
- [58] M. Ismail, G. Al-Naqeep, and K. W. Chan, "*Nigella sativa* thymoquinone-rich fraction greatly improves plasma antioxidant capacity and expression of antioxidant genes in hypercholesterolemic rats," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 48, pp. 664-672, 2010.
- [59] M. M. Khattab and M. N. Nagi, "Thymoquinone supplementation attenuates hypertension and renal damage in nitric oxide deficient hypertensive rats," *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, vol. 21, pp. 410-414, 2007.
- [60] C. Toparslan, "A propos de *Nigella sativa* L," Université de Lorraine, 2012.
- [61] M. Mubarak, A. Shaija, and T. Suchithra, "A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production," *Algal Research*, vol. 7, pp. 117-123, 2015.

Bibliographie

- [62] A. C. I. Capuchino, C. C. Chan, L. A. Cua, and A. R. S. Del Mundo Jr, "Characterization of Saponifiable Lipids (Melted Fat, Lecithin, and Plant Oils) Using Grease-Spot, Saponification and Unsaturation Tests."
- [63] S. Sawhney and R. Singh, *Introductory practical biochemistry*: Alpha Science Int'l Ltd., 2000.
- [64] F. Shahidi and Y. Zhong, "Lipid oxidation and improving the oxidative stability," *Chemical society reviews*, vol. 39, pp. 4067-4079, 2010.
- [65] H. Dinel, M. Schnitzer, and G. Mehuys, "Soil lipids: origin, nature, content, decomposition, and effect on soil physical properties," *Soil biochemistry*, vol. 6, 1990.
- [66] S. M. Budge and C. C. Parrish, "Lipid biogeochemistry of plankton, settling matter and sediments in Trinity Bay, Newfoundland. II. Fatty acids," *Organic Geochemistry*, vol. 29, pp. 1547-1559, 1998.
- [67] C. C. Parrish, "Lipid biogeochemistry of plankton, settling matter and sediments in Trinity Bay, Newfoundland. I. Lipid classes," *Organic Geochemistry*, vol. 29, pp. 1531-1545, 1998.
- [68] J. Velisek, *The chemistry of food*: John Wiley & Sons, 2013.
- [69] S. Liengprayoon, F. Bonfils, J. Sainte-Beuve, K. Sriroth, E. Dubreucq, and L. Vaysse, "Development of a new procedure for lipid extraction from *Hevea brasiliensis* natural rubber," *European journal of lipid science and technology*, vol. 110, pp. 563-569, 2008.
- [70] A. M. R. Alvarez and M. L. G. Rodríguez, "Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations," *Grasas y aceites*, vol. 51, pp. 74-96, 2000.
- [71] D. Threlfall, W. Griffiths, and T. Goodwin, "Biosynthesis of the prenyl side chains of plastiquinone and related compounds in maize and barley shoots," *Biochemical Journal*, vol. 103, p. 831, 1967.
- [72] N. Hounsome, B. Hounsome, D. Tomos, and G. Edwards-Jones, "Plant metabolites and nutritional quality of vegetables," *Journal of food science*, vol. 73, pp. R48-R65, 2008.
- [73] M. Sano, C. Ernesto, R. G. Thomas, M. R. Klauber, K. Schafer, M. Grundman, P. Woodbury, J. Growdon, C. W. Cotman, and E. Pfeiffer, "A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease," *New England Journal of Medicine*, vol. 336, pp. 1216-1222, 1997.
- [74] P. Sookwong, K. Nakagawa, K. Murata, Y. Kojima, and T. Miyazawa, "Quantitation of tocotrienol and tocopherol in various rice brans," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 55, pp. 461-466, 2007.
- [75] W. Sichert-Hellert, M. Kersting, C. Chahda, R. Schäfer, and A. Kroke, "German food composition database for dietary evaluations in children and adolescents," *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 20, pp. 63-70, 2007.
- [76] R. Brigelius-Flohe and M. G. Traber, "Vitamin E: function and metabolism," *The FASEB Journal*, vol. 13, pp. 1145-1155, 1999.
- [77] M. Naudet, J. Soulier, and M. Farines, "Principaux constituants chimiques des corps gras," *Karleskind, (ed). Manuel des Corps Gras. Paris*, pp. 65-115, 1992.
- [78] A. Aberoumand and S. Deokule, "Comparison of phenolic compounds of some edible plants of Iran and India," *Pakistan Journal of Nutrition*, vol. 7, pp. 582-585, 2008.

Bibliographie

- [79] J.-J. Macheix, A. Fleuriet, and C. Jay-Allemand, *Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*: PPUR presses polytechniques, 2005.
- [80] P. M. Dewick, *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*: John Wiley & Sons, 2002.
- [81] D. De Beer, E. Joubert, W. Gelderblom, and M. Manley, "Phenolic compounds: a review of their possible role as in vivo antioxidants of wine," *South African Journal of Enology and Viticulture*, vol. 23, pp. 48-61, 2002.
- [82] K. E. Heim, A. R. Tagliaferro, and D. J. Bobilya, "Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships," *The Journal of nutritional biochemistry*, vol. 13, pp. 572-584, 2002.
- [83] D. Grassi, G. Desideri, and C. Ferri, "Flavonoids: antioxidants against atherosclerosis," *Nutrients*, vol. 2, pp. 889-902, 2010.
- [84] A. Gómez-Caravaca, M. Gómez-Romero, D. Arráez-Román, A. Segura-Carretero, and A. Fernández-Gutiérrez, "Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 41, pp. 1220-1234, 2006.
- [85] P.-G. Pietta, "Flavonoids as antioxidants," *Journal of natural products*, vol. 63, pp. 1035-1042, 2000.
- [86] P. Sarni-Manchado and V. Cheynier, *Les polyphénols en agroalimentaire: Techniques & documentation*, 2006.
- [87] M. M. Derikvand, J. B. Sierra, K. Ruel, B. Pollet, C.-T. Do, J. Thévenin, D. Buffard, L. Jouanin, and C. Lapierre, "Redirection of the phenylpropanoid pathway to feruloyl malate in Arabidopsis mutants deficient for cinnamoyl-CoA reductase 1," *Planta*, vol. 227, pp. 943-956, 2008.
- [88] D. Malešev and V. Kuntić, "Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions," *Journal of the Serbian chemical society*, vol. 72, pp. 921-939, 2007.
- [89] R. J. Nijveldt, E. Van Nood, D. E. Van Hoorn, P. G. Boelens, K. Van Norren, and P. A. Van Leeuwen, "Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications," *The American journal of clinical nutrition*, vol. 74, pp. 418-425, 2001.
- [90] K. Ghedira, "Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique," *Phytothérapie*, vol. 3, pp. 162-169, 2005.
- [91] M. Medić-Šarić, I. Jasprica, A. Mornar, A. Smolčić-Bubalo, and P. Golja, "Quantitative analysis of flavonoids and phenolic acids in propolis by two-dimensional thin layer chromatography," *JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, vol. 17, pp. 459-463, 2004.
- [92] J. W. Erdman Jr, D. Balentine, L. Arab, G. Beecher, J. T. Dwyer, J. Folts, J. Harnly, P. Hollman, C. L. Keen, and G. Mazza, "Flavonoids and heart health: proceedings of the ILSI North America flavonoids workshop, May 31–June 1, 2005, Washington, DC," *The Journal of nutrition*, vol. 137, pp. 718S-737S, 2007.

Bibliographie

- [93] M. Emerenciano, S. Koifman, and M. Pombo-de-Oliveira, "Acute leukemia in early childhood," *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 40, pp. 749-760, 2007.
- [94] P. Hutzler, R. Fischbach, W. Heller, T. P. Jungblut, S. Reuber, R. Schmitz, M. Veit, G. Weissenböck, and J.-P. Schnitzler, "Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy," *Journal of experimental botany*, vol. 49, pp. 953-965, 1998.
- [95] J. P. Piquemal, J. Pilmé, O. Parisel, H. Gérard, I. Fourré, J. Berges, C. Gourlaouen, A. De La Lande, M. C. Van Severen, and B. Silvi, "What can be learnt on biologically relevant systems from the topological analysis of the electron localization function?," *International Journal of Quantum Chemistry*, vol. 108, pp. 1951-1969, 2008.
- [96] P. A. Southorn and G. Powis, "Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions," in *Mayo Clinic Proceedings*, 1988, pp. 381-389.
- [97] I. Stein, M. Schwarz, and U. Heywang, "Ketotricyclo. 5.2. 1.0! decane derivatives," ed: Google Patents, 1998.
- [98] J. Moss and L. Otten, "A relationship between colour development and moisture content during roasting of peanuts," *Canadian Institute of food science and technology journal*, vol. 22, pp. 34-39, 1989.
- [99] D. L. Ermak and H. Buckholz, "Numerical integration of the Langevin equation: Monte Carlo simulation," *Journal of Computational Physics*, vol. 35, pp. 169-182, 1980.
- [100] M. Shimoda, Y. Nakada, M. Nakashima, and Y. Osajima, "Quantitative comparison of volatile flavor compounds in deep-roasted and light-roasted sesame seed oil," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 45, pp. 3193-3196, 1997.
- [101] C. T. Young and A. R. Hovis, "A Method for the Rapid Analysis of Headspace Volatiles of Raw and Roasted Peanuts: A Research Note," *Journal of food science*, vol. 55, pp. 279-280, 1990.
- [102] K. Mayerpotschak, "Infrared roasting of nuts, particularly hazelnuts," *Confectionery production*, vol. 51, pp. 313-313, 1985.
- [103] D. Machiels and L. Istasse, "La réaction de Maillard: importance et applications en chimie des aliments," *Ann. Méd. Vét*, vol. 146, pp. 347-352, 2002.
- [104] W. Baltes and G. Bochmann, "Model reactions on roast aroma formation. II. Mass spectrometric identification of furans and furanones from the reaction of serine and threonine with sucrose under the conditions of coffee roasting," *Z. Lebensm. Unters. Forsch*, vol. 184, pp. 179-186, 1987.
- [105] S. Saklar, S. Ungan, and S. Katnas, "Instrumental crispness and crunchiness of roasted hazelnuts and correlations with sensory assessment," *Journal of food science*, vol. 64, pp. 1015-1019, 1999.
- [106] M. Özdemir, F. Açıktur, M. Yildiz, G. Biringen, T. Gürcan, and M. Löker, "Effect of roasting on some nutrients of hazelnuts (*Corylus Avellena* L.)," *Food chemistry*, vol. 73, pp. 185-190, 2001.
- [107] A. NOR, "Recueil des normes françaises des corps gras, graines oléagineuses et produits dérivés," *Association Française de NORmalisation eds, Paris*, p. 95, 1984.

Bibliographie

- [108] B. H. Jennings and C. C. Akoh, "Enzymatic modification of triacylglycerols of high eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids content to produce structured lipids," *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 76, pp. 1133-1137, 1999.
- [109] G. Durmaz, İ. Karabulut, A. Topçu, M. Asiltürk, and T. Kutlu, "Roasting-related changes in oxidative stability and antioxidant capacity of apricot kernel oil," *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 87, pp. 401-409, 2010.
- [110] O. K. Laghouiter, M. Benalia, A. Djeridane, I. Bombarda, and M. Yousfi, "Chemical characterization and in vitro antioxidant capacity of nine Algerian date palm cultivars (*Phoenix dactylifera* L.) seed oil," *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, pp. 1-15.
- [111] A. Emmerie and C. Engel, "Colorimetric determination of tocopherol (vitamin E): II Adsorption experiments," *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, vol. 58, pp. 283-289, 1939.
- [112] C. Paquot and J. Mercier, "Résultats expérimentaux sur l'autoxydation des corps gras I. Autoxydation comparée desters purs," *Rev. Frain. Corps Gras*, vol. 9, pp. 275-282, 1962.
- [113] M. Flanzly and P. Dubois, "The Determination of Total Tocopherols. Application to Grape Seeds Oil," *Ann. Technol. Agr.*, vol. 13, pp. 67-75, 1964.
- [114] I. Karabulut, A. Topcu, A. Yorulmaz, A. Tekin, and D. S. Ozay, "Effects of the industrial refining process on some properties of hazelnut oil," *European journal of lipid science and technology*, vol. 107, pp. 476-480, 2005.
- [115] V. L. Singleton, R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventós, "[14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent," in *Methods in enzymology*. vol. 299, ed: Elsevier, 1999, pp. 152-178.
- [116] D. Marinova, F. Ribarova, and M. Atanassova, "Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables," *Journal of the university of chemical technology and metallurgy*, vol. 40, pp. 255-260, 2005.
- [117] A. Ben Saad, B. Dalel, I. Rjeibi, A. Smida, S. Ncib, N. Zouari, and L. Zourgui, "Phytochemical, antioxidant and protective effect of cactus cladodes extract against lithium-induced liver injury in rats," *Pharm Biol*, vol. 55, pp. 516-525, Dec 2017.
- [118] A. Ben Saad, B. Dalel, I. Rjeibi, A. Smida, S. Ncib, N. Zouari, and L. Zourgui, "Phytochemical, antioxidant and protective effect of cactus cladodes extract against lithium-induced liver injury in rats," *Pharmaceutical biology*, vol. 55, pp. 516-525, 2017.
- [119] I. Chevalley, "Contribution à l'étude phytochimique des Saxifragacées: isolement d'antioxydants à partir de " *Saxifraga stellaris* L." et " *Saxifraga cuneifolia* L." et d'un composé antifongique de " *Ribes rubrum* L. ", " Université de Lausanne, Faculté des sciences, 2000.
- [120] J. C. Espín, C. Soler-Rivas, and H. J. Wichers, "Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 48, pp. 648-656, 2000.
- [121] G. Cirillo, F. Puoci, F. Iemma, M. Curcio, O. I. Parisi, U. G. Spizzirri, I. Altimari, and N. Picci, "Starch-quercetin conjugate by radical grafting: synthesis and biological

- characterization," *Pharmaceutical development and technology*, vol. 17, pp. 466-476, 2012.
- [122] L. Qi, Z. Xu, X. Jiang, C. Hu, and X. Zou, "Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles," *Carbohydrate research*, vol. 339, pp. 2693-2700, 2004.
- [123] D. J. Gray and R. N. Trigiano, "Getting started with tissue culture: media preparation, sterile technique, and laboratory equipment," in *Plant Development and Biotechnology*, ed: CRC Press, 2004, pp. 15-37.
- [124] S. Laouini, L. Segni, M. Ouahrani, N. Gherraf, and S. Mokni, "Phytochemical analysis, antioxidant and antimicrobial activities of leaves extract of date palm grown in Algeria," *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, vol. 4, pp. 142-154, 2012.
- [125] F. Flores, F. El Yahyaoui, G. De Billerbeck, F. Romojaro, A. Latche, M. Bouzayen, J. C. Pech, and C. Ambid, "Role of ethylene in the biosynthetic pathway of aliphatic ester aroma volatiles in Charentais Cantaloupe melons," *Journal of experimental botany*, vol. 53, pp. 201-206, 2002.
- [126] S. Giri, G. Biswas, P. Pradhan, S. C. Mandal, and K. Acharya, "Antimicrobial activities of basidiocarps of wild edible mushrooms of West Bengal, India," *International Journal of PharmTech Research*, vol. 4, pp. 1554-1560, 2012.
- [127] M. Y. Jung, J. Y. Bock, S. O. Baik, J. H. Lee, and T. K. Lee, "Effects of roasting on pyrazine contents and oxidative stability of red pepper seed oil prior to its extraction," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 47, pp. 1700-1704, 1999.
- [128] E.-S. Abdel-Aal and R. Attia, "Characterization of black cumin (*Nigella sativa*) seeds 1-chemical composition and lipids," *Alexandria Science Exchange*, vol. 14, pp. 467-467, 1993.
- [129] A. Salem, T. Tahu, and I. Abou-El-Fadl, "Studies on variation, heritability and characters association in black cumin (*Nigella sativa* L.)," *Egyptian Journal of Agriculture Research*, vol. 79, pp. 1439-1447, 2001.
- [130] D. Nichols and K. Sanderson, "Chemical and functional properties of food lipids," ed: CRC Press, New York, 2003.
- [131] A. Gad, M. El-Dakhkhny, and M. Hassan, "Studies on the chemical constitution of Egyptian *Nigella sativa* L. oil," *Planta Medica*, vol. 11, pp. 134-138, 1963.
- [132] G. Üstun, L. Kent, N. Cekin, and H. Civelekoglu, "Investigation of the technological properties of *Nigella sativa* (black cumin) seed oil," *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 67, pp. 958-960, 1990.
- [133] K. Nyam, C. Tan, O. Lai, K. Long, and Y. C. Man, "Physicochemical properties and bioactive compounds of selected seed oils," *LWT-Food Science and technology*, vol. 42, pp. 1396-1403, 2009.
- [134] D. S. Nichols and K. Sanderson, "The nomenclature, structure, and properties of food lipids," *Chemical and functional properties of food lipids*, pp. 29-59, 2003.
- [135] E. Sherwin, "Oxidation and antioxidants in fat and oil processing," *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 55, pp. 809-814, 1978.
- [136] A. Z. Worden, J.-H. Lee, T. Mock, P. Rouzé, M. P. Simmons, A. L. Aerts, A. E. Allen, M. L. Cuvelier, E. Derelle, and M. V. Everett, "Green evolution and dynamic adaptations revealed by genomes of the marine picoeukaryotes *Micromonas*," *Science*, vol. 324, pp. 268-272, 2009.

Bibliographie

- [137] E. Abdel-Aal and R. Attia, "Characterization of black Figure 2: Effect of Nigella sativa treatments and production interval on serum total lipids (mg/dl) levels. cumin (Nigella sativa): Chemical composition and lipids," *Alex. Sci. Exch. J.*, vol. 14, pp. 467-481, 1993.
- [138] H. E. Monfalouti, D. Guillaume, C. Denhez, and Z. Charrouf, "Therapeutic potential of argan oil: a review," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 62, pp. 1669-1675, 2010.
- [139] S. Gharby, H. Harhar, D. Guillaume, A. Roudani, S. Boulbaroud, M. Ibrahimi, M. Ahmad, S. Sultana, T. B. Hadda, and I. Chafchaouni-Moussaoui, "Chemical investigation of Nigella sativa L. seed oil produced in Morocco," *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, vol. 14, pp. 172-177, 2015.
- [140] A. Karleskind, "Détermination des caractéristiques physiques des corps gras," *Mauel des corps gras*, vol. 2, p. 1290, 1992.
- [141] M. F. Ramadan, "Nutritional value, functional properties and nutraceutical applications of black cumin (Nigella sativa L.): an overview," *International journal of food science & technology*, vol. 42, pp. 1208-1218, 2007.
- [142] S. Tan, Y. Chiew, B. Ahmad, and K. Kadir, "Tocotrienol-Rich Vitamin E from Palm Oil (Tocovid) and Its Effects in Diabetes and Diabetic Nephropathy: A Pilot Phase II Clinical Trial," *Nutrients*, vol. 10, p. 1315, 2018.
- [143] C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, and L. Jiménez, "Polyphenols: food sources and bioavailability," *The American journal of clinical nutrition*, vol. 79, pp. 727-747, 2004.
- [144] Z. L. Wang and J. Song, "Piezoelectric nanogenerators based on zinc oxide nanowire arrays," *Science*, vol. 312, pp. 242-246, 2006.
- [145] C. Manach, G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert, and C. Rémésy, "Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies," *The American journal of clinical nutrition*, vol. 81, pp. 230S-242S, 2005.
- [146] P. Jones and T. Vogt, "Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers," *Planta*, vol. 213, pp. 164-174, 2001.
- [147] A. Bala, B. Kar, P. K. Haldar, U. K. Mazumder, and S. Bera, "Evaluation of anticancer activity of Cleome gynandra on Ehrlich's Ascites Carcinoma treated mice," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 129, pp. 131-134, 2010.
- [148] Z. Zhu, Z. Liang, R. Han, and X. Wang, "Impact of fertilization on drought response in the medicinal herb Bupleurum chinense DC.: growth and saikosaponin production," *Industrial crops and products*, vol. 29, pp. 629-633, 2009.
- [149] C.-C. Toma, N.-K. Olah, L. Vlase, C. Mogoşan, and A. Mocan, "Comparative studies on polyphenolic composition, antioxidant and diuretic effects of Nigella sativa L.(black cumin) and Nigella damascena L.(lady-in-a-mist) seeds," *Molecules*, vol. 20, pp. 9560-9574, 2015.
- [150] A. A. Mariod, R. M. Ibrahim, M. Ismail, and N. Ismail, "Antioxidant activity and phenolic content of phenolic rich fractions obtained from black cumin (Nigella sativa) seedcake," *Food chemistry*, vol. 116, pp. 306-312, 2009.

Bibliographie

- [151] G. G. Duthie, S. J. Duthie, and J. A. Kyle, "Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants," *Nutrition research reviews*, vol. 13, pp. 79-106, 2000.
- [152] U. Justesen and P. Knuthsen, "Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes," *Food chemistry*, vol. 73, pp. 245-250, 2001.
- [153] A. Bouyahya, J. Abrini, Y. Bakri, and N. Dakka, "Screening phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'*Origanum compactum*," *Phytothérapie*, vol. 15, pp. 379-383, 2017.
- [154] M. Benalia, A. Djeridane, N. Gourine, S. Nia, E. Ajandouz, and M. Yousfi, "Fatty acid profile, tocopherols content and antioxidant activity of algerian pumpkin seeds oil (*Cucurbita pepo* L)," *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, vol. 8, pp. 9-25, 2015.
- [155] K. F. Khattak and T. U. Rahman, "Effect of gamma irradiation on the vitamins, phytochemicals, antimicrobial and antioxidant properties of *Ziziphus mauritiana* Lam. leaves," *Radiation Physics and Chemistry*, vol. 127, pp. 243-248, 2016.
- [156] A. Ratz-Lyko and J. Arct, "Evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of enzymatically hydrolysed *Cucurbita pepo* and *Linum usitatissimum* seedcakes," *Food science and biotechnology*, vol. 24, pp. 1789-1796, 2015.
- [157] T. E. Moussa-Ayoub, K. Youssef, S. K. El-Samahy, L. W. Kroh, and S. Rohn, "Flavonol profile of cactus fruits (*Opuntia ficus-indica*) enriched cereal-based extrudates: Authenticity and impact of extrusion," *Food Research International*, vol. 78, pp. 442-447, 2015.
- [158] A. Khadhri, I. Bouali, S. Belkhir, R. Mokded, S. Smiti, P. Falé, M. E. M. Araújo, and M. L. M. Serralheiro, "In vitro digestion, antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of two species of *Ruta*: *Ruta chalepensis* and *Ruta montana*," *Pharmaceutical biology*, vol. 55, pp. 101-107, 2017.
- [159] J. Kubola and S. Siriamornpun, "Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro," *Food chemistry*, vol. 110, pp. 881-890, 2008.
- [160] F. Deba, T. D. Xuan, M. Yasuda, and S. Tawata, "Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*," *Food control*, vol. 19, pp. 346-352, 2008.
- [161] P. Mayachiew and S. Devahastin, "Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts," *LWT-Food Science and Technology*, vol. 41, pp. 1153-1159, 2008.
- [162] B. Carpenter and C. Jung, "Transmission of IPv6 over IPv4 domains without explicit tunnels," ed: RFC 2529, March, 1999.
- [163] H.-F. Yang-Yen, J.-C. Chambard, Y.-L. Sun, T. Smeal, T. J. Schmidt, J. Drouin, and M. Karin, "Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction," *Cell*, vol. 62, pp. 1205-1215, 1990.

Bibliographie

- [164] I. Karabulut, G. Durmaz, and A. A. Hayaloglu, "Fatty acid selectivity of lipases during acidolysis reaction between oleic acid and monoacid triacylglycerols," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 57, pp. 10466-10470, 2009.
- [165] I. Juárez, I. A. Ludwig, E. Huarte, G. Pereira-Caro, J. M. Moreno-Rojas, C. Cid, and M.-P. De Peña, "Influence of heat treatment on antioxidant capacity and (poly) phenolic compounds of selected vegetables," *Food chemistry*, vol. 197, pp. 466-473, 2016.
- [166] J. W. Veldsink, B. G. Muuse, M. M. Meijer, F. P. Cuperus, R. L. van de Sande, and K. P. van Putte, "Heat pretreatment of oilseeds: effect on oil quality," *Lipid/Fett*, vol. 101, pp. 244-248, 1999.
- [167] M. Jung, J. Bock, S. Back, T. Lee, and J. Kim, "Pyrazine contents and oxidative stabilities of roasted soybean oils," *Food chemistry*, vol. 60, pp. 95-102, 1997.
- [168] H. Yoshida, I. Kondo, and G. Kajimoto, "Participation of free fatty acids in the oxidation of purified soybean oil during microwave heating," *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 69, pp. 1136-1140, 1992.
- [169] M. B. Arnao, A. Cano, and M. Acosta, "Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion," *Free Radical Research*, vol. 31, pp. 89-96, 1999.
- [170] I. Hwang, H.-C. Chen, and J. Sheen, "Two-component signal transduction pathways in Arabidopsis," *Plant physiology*, vol. 129, pp. 500-515, 2002.
- [171] S. J. Misnawi, B. Jamilah, and S. Nazamid, "Changes in polyphenol ability to produce astringency during roasting of cocoa liquor. Faculty of Food Science and Biotechnology, UPM Serdang, Selangor, Malaysia.(Doi). www3.interscience.wiley.com/journal, 2004.
- [172] G. Durmaz and V. Gökmen, "Changes in oxidative stability, antioxidant capacity and phytochemical composition of Pistacia terebinthus oil with roasting," *Food chemistry*, vol. 128, pp. 410-414, 2011.
- [173] R. F. Kokaly and A. K. Skidmore, "Plant phenolics and absorption features in vegetation reflectance spectra near 1.66 μm ," *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*, vol. 43, pp. 55-83, 2015.
- [174] M. R. B. Lemos, E. M. de Almeida Siqueira, S. F. Arruda, and R. C. Zambiasi, "The effect of roasting on the phenolic compounds and antioxidant potential of baru nuts [Dipteryx alata Vog.]," *Food Research International*, vol. 48, pp. 592-597, 2012.
- [175] A. Rodrigues, M. Pérez-Gregorio, M. García-Falcón, and J. Simal-Gándara, "Effect of curing and cooking on flavonols and anthocyanins in traditional varieties of onion bulbs," *Food Research International*, vol. 42, pp. 1331-1336, 2009.
- [176] L. Majhenič, M. Škerget, and Ž. Knez, "Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts," *Food chemistry*, vol. 104, pp. 1258-1268, 2007.
- [177] M. Rahmani, "Composition chimique de l'huile d'argane «vierge»,," *Cahiers agricultures*, vol. 14, pp. 461-465 (1), 2005.
- [178] Y.-H. Chu, "Effects of soybean pretreatments on crude oil quality," *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 72, pp. 177-181, 1995.

Bibliographie

- [179] N. Ghedadba, H. Bousselsela, L. Hambaba, S. Benbia, and Y. Mouloud, "Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L," *Phytothérapie*, vol. 12, pp. 15-24, 2014.
- [180] A. Pukalskas, P. R. Venskutonis, S. Salido, P. de Waard, and T. A. van Beek, "Isolation, identification and activity of natural antioxidants from horehound (*Marrubium vulgare* L.) cultivated in Lithuania," *Food chemistry*, vol. 130, pp. 695-701, 2012.
- [181] A. Kadri, Z. Zarai, A. Békir, N. Gharsallah, M. Damak, and R. Gdoura, "Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L. essential oil from Tunisia," *African journal of biotechnology*, vol. 10, pp. 3908-3914, 2011.

Annexes

Annexes

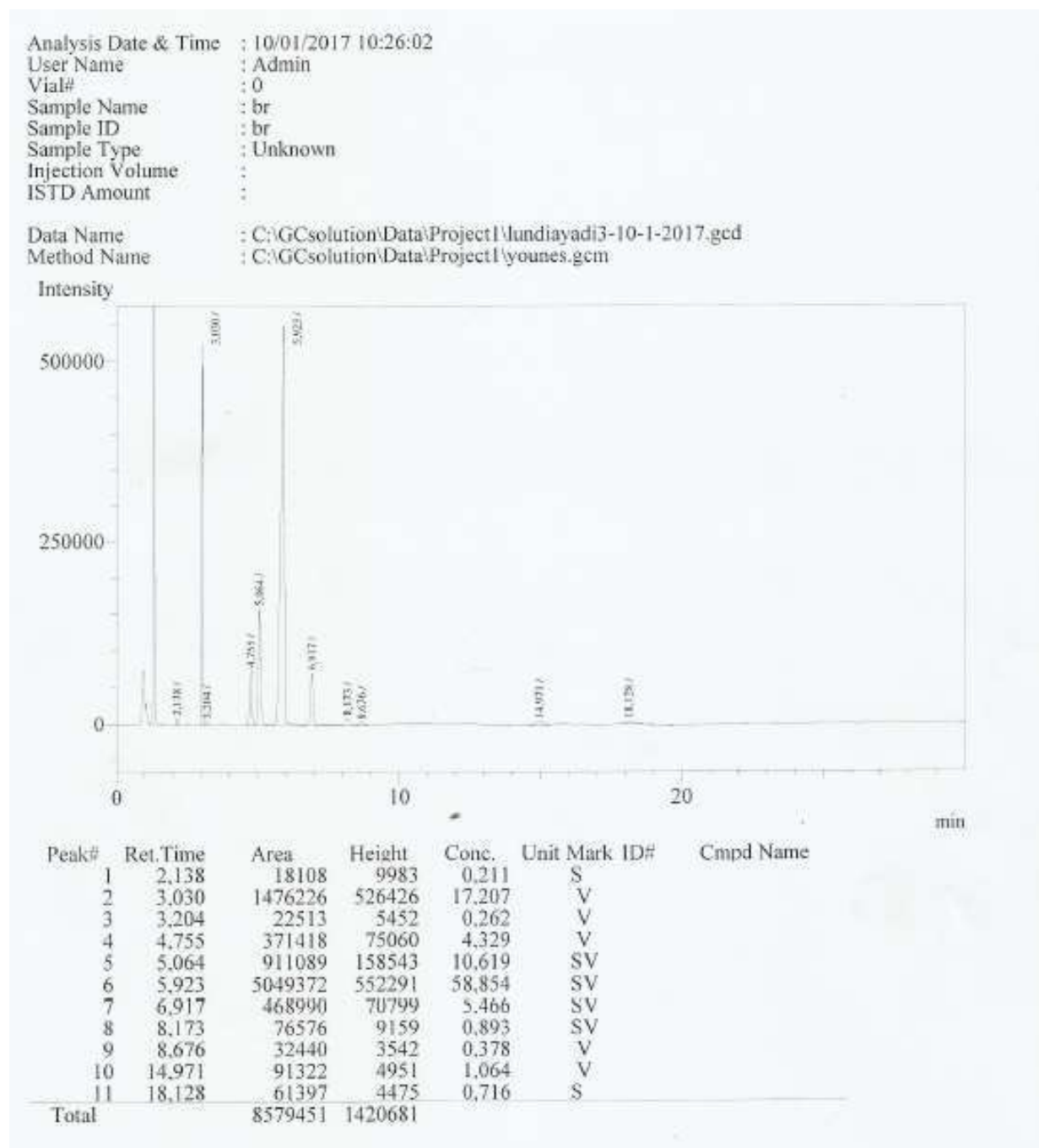


Figure 1 : chromatogramme CPG des EMAG de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. non torréfiées

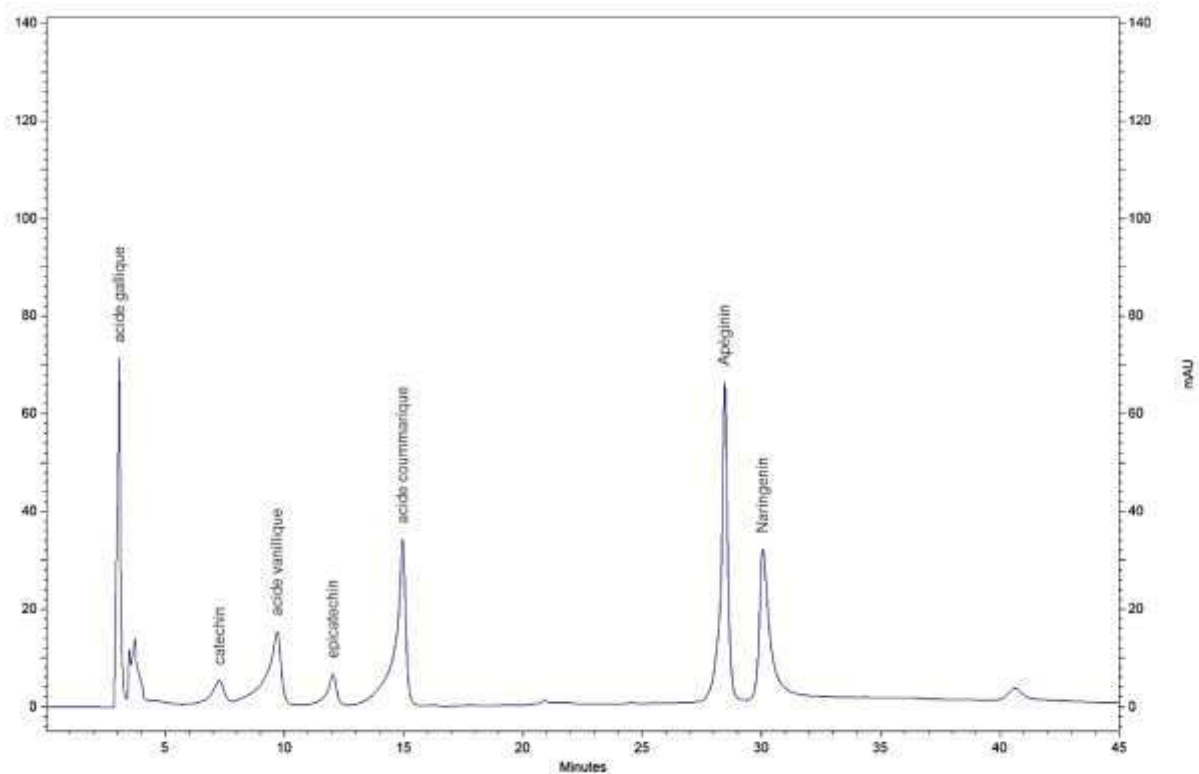


Figure 2 : chromatogramme CLHP des acides phénoliques standards a 360 nm

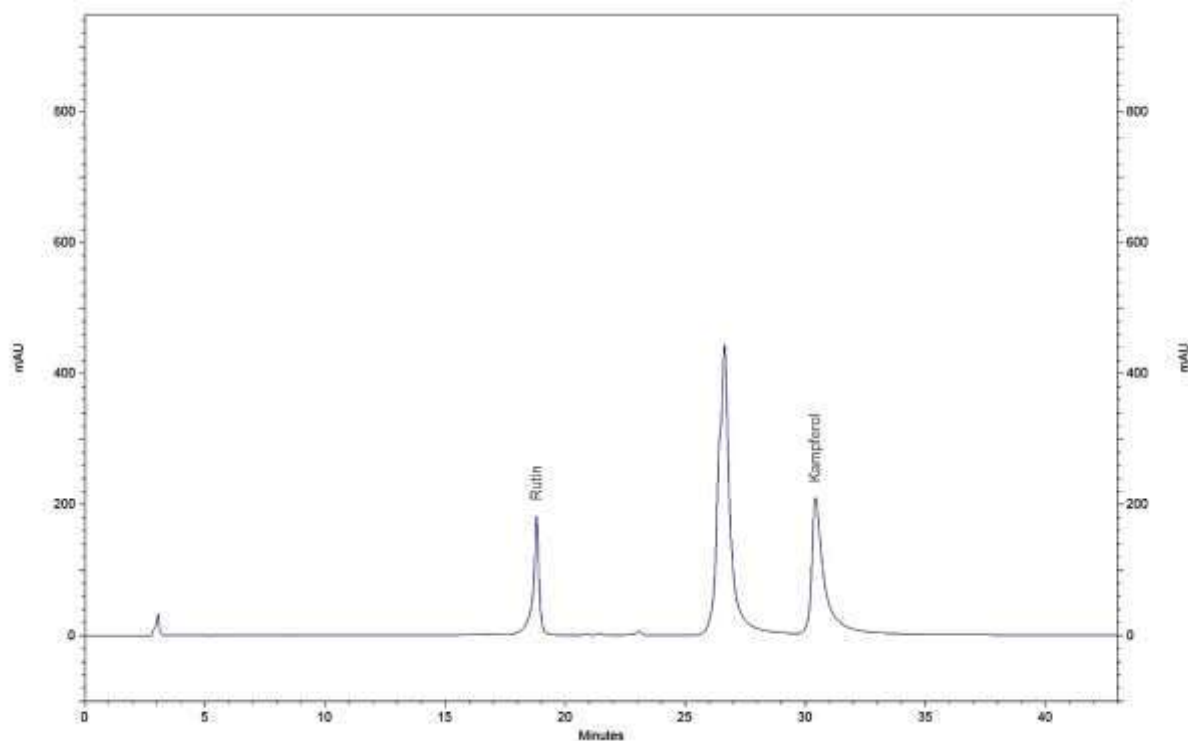


Figure 3 : chromatogramme CLHP des flavonoïdes standards a 280 nm

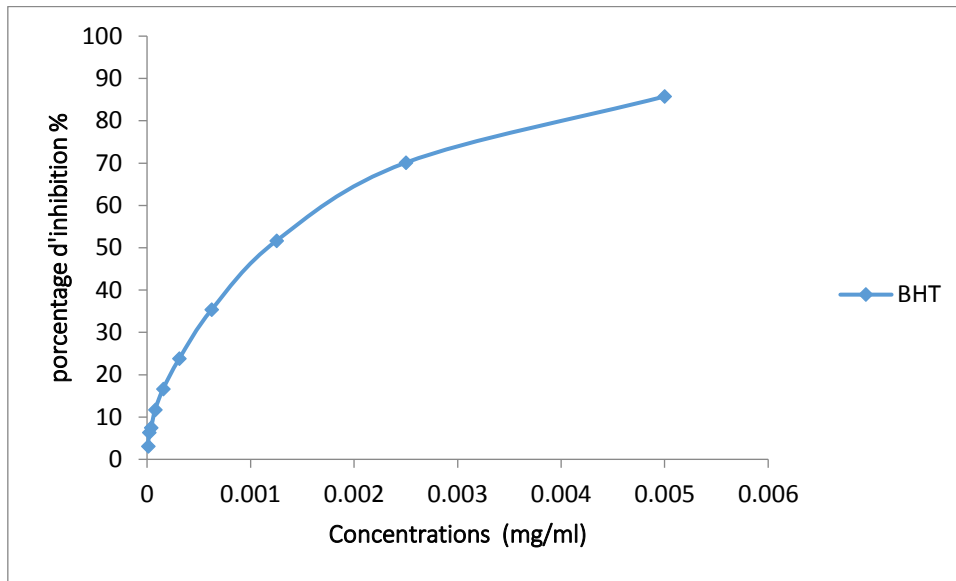


Figure 4 : La variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'antioxydant BHT dans le test du DPPH.

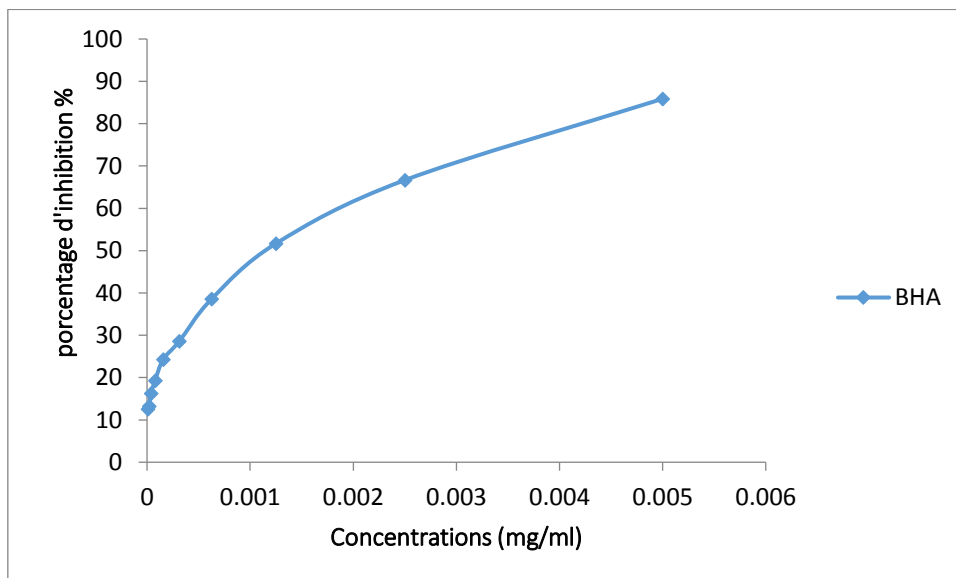


Figure 5 : La variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'antioxydant BHA dans le test du DPPH.

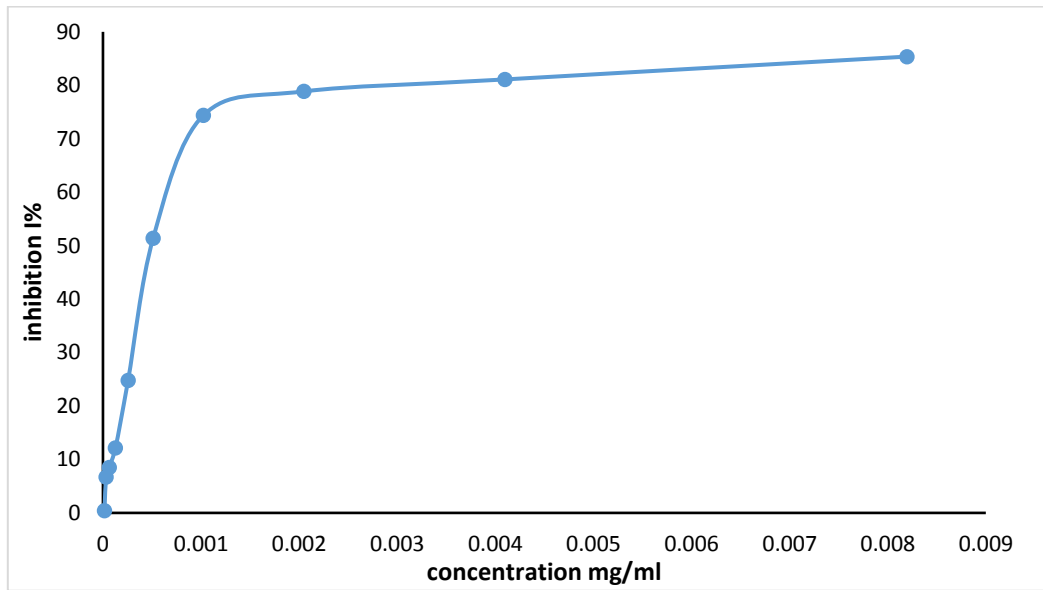


Figure 6 : La variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'antioxydant BHT dans le test de blanchiment du β -carotène

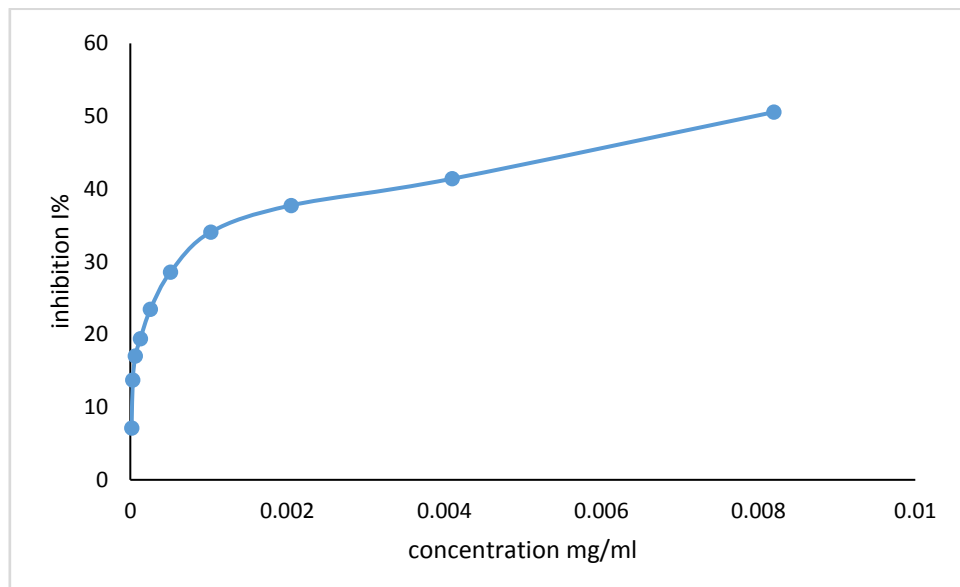


Figure 7 : La variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'antioxydant BHA dans le test de blanchiment du β -carotène

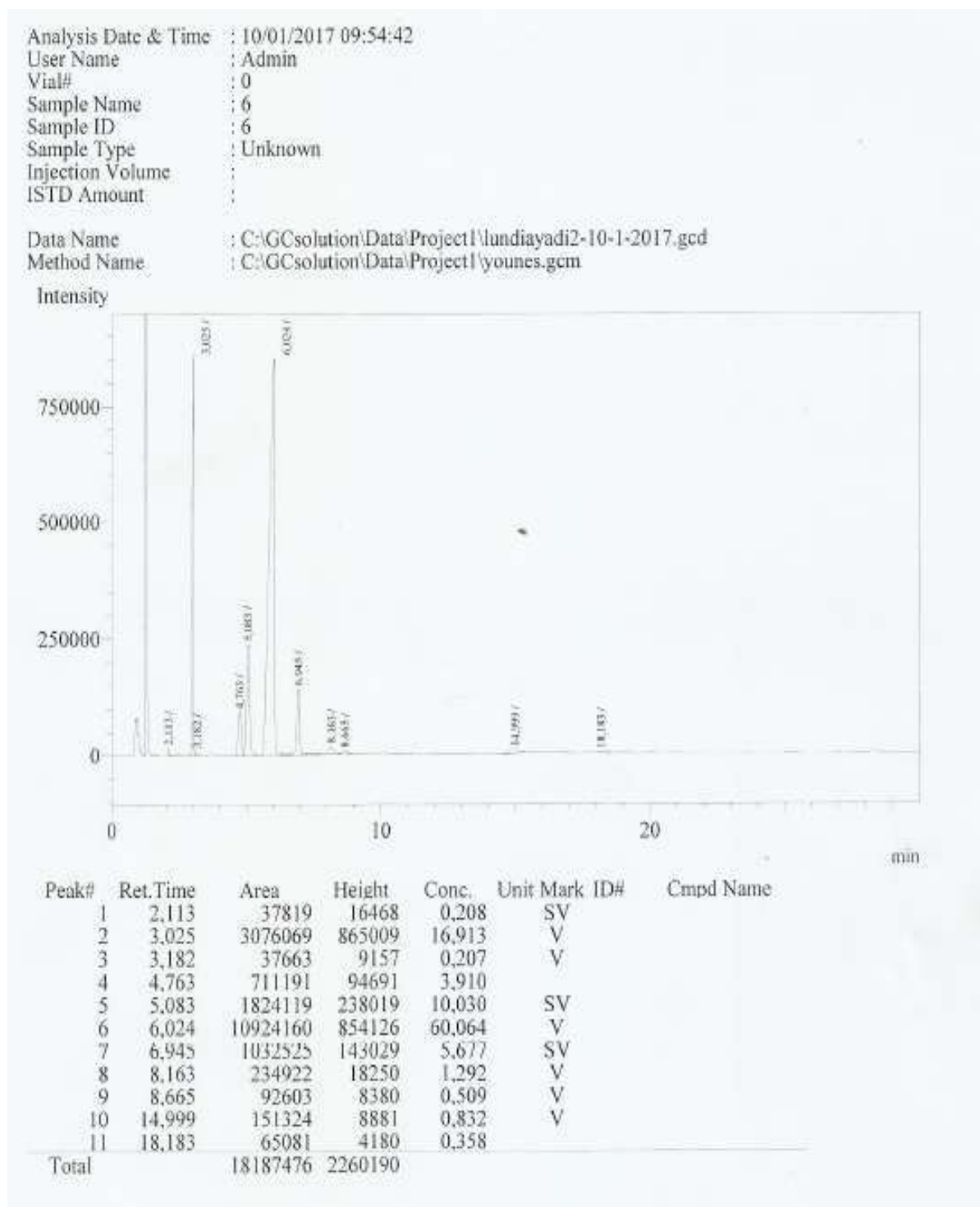


Figure 14 : chromatogramme CPG des EMAG de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. torréfiées pendant 40min

Annexes

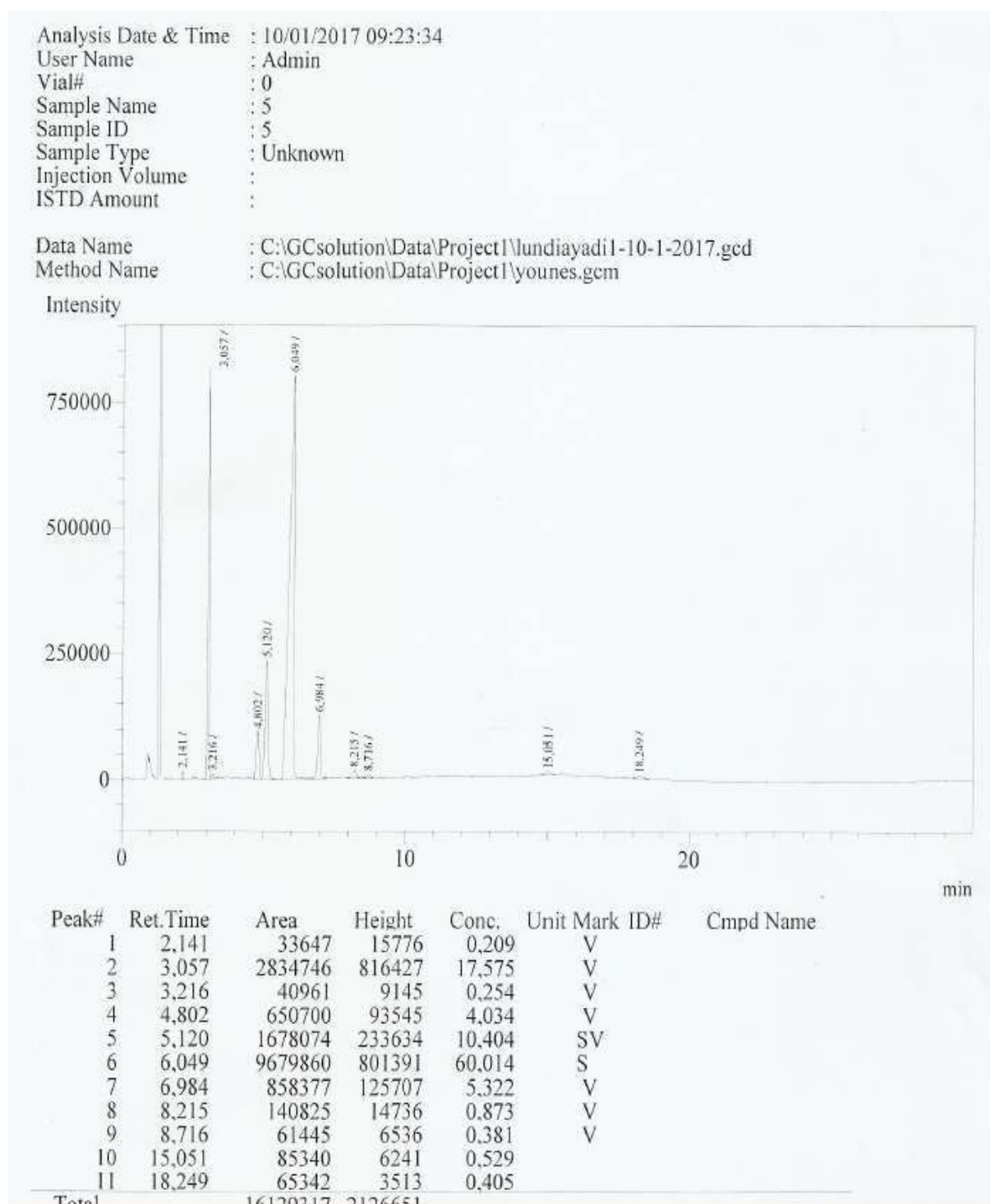


Figure 15 : chromatogramme CPG des EMAG de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. torréfiées pendant 30 min

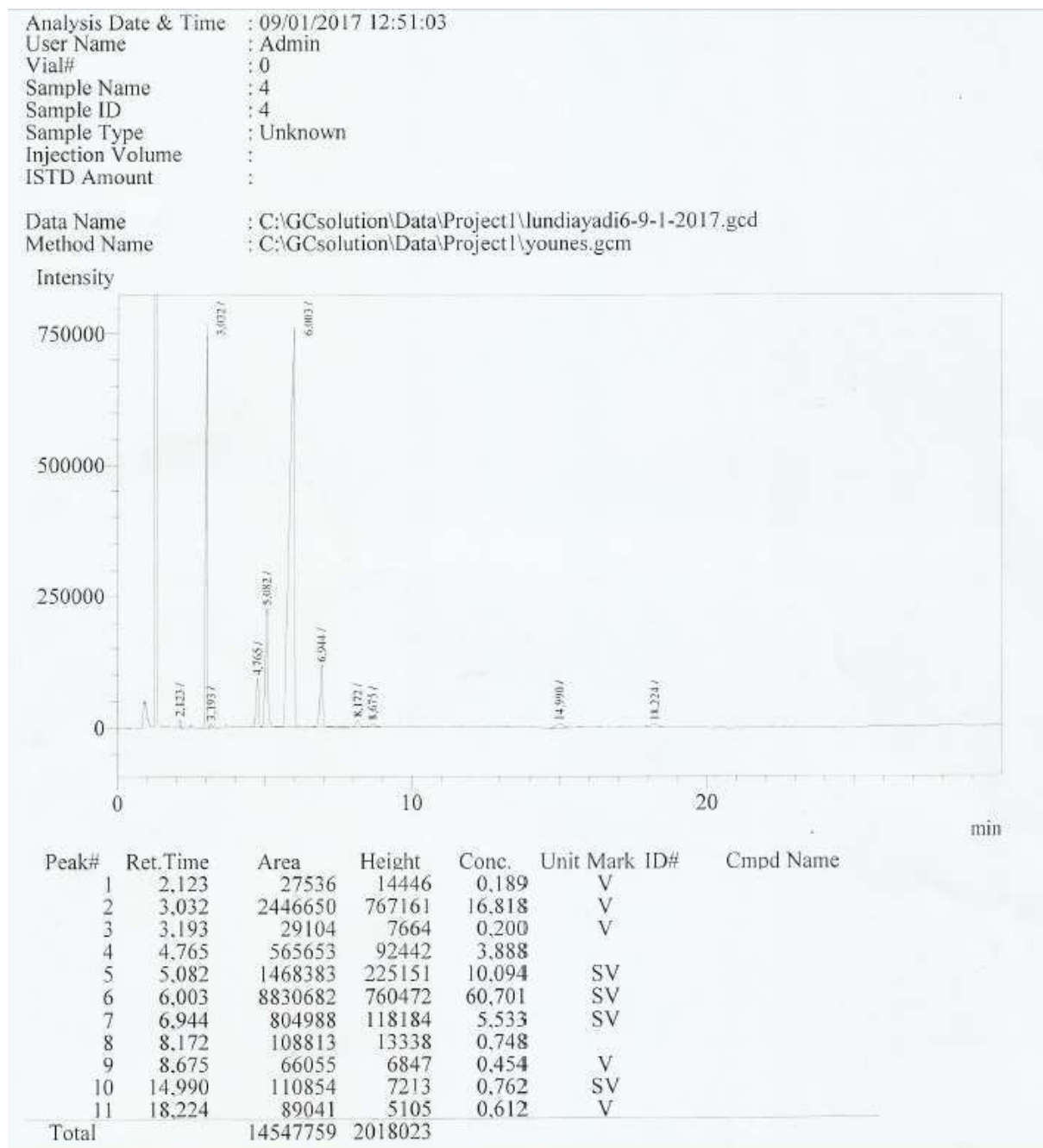


Figure 16 : chromatogramme CPG des EMAG de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. torrifiées pendant 20 min

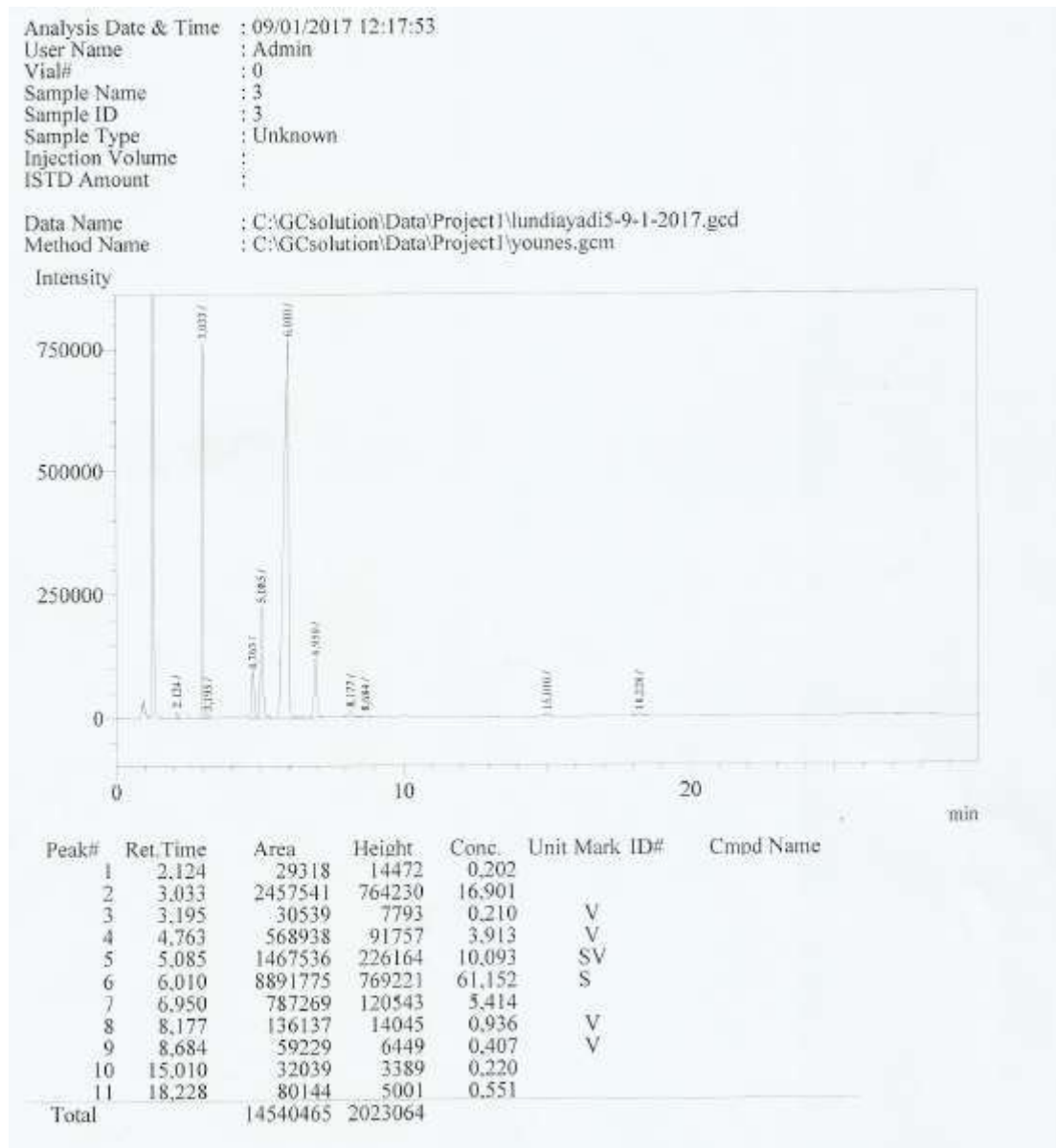


Figure 17 : chromatogramme CPG des EMAG de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. torréfiées pendant 15 min

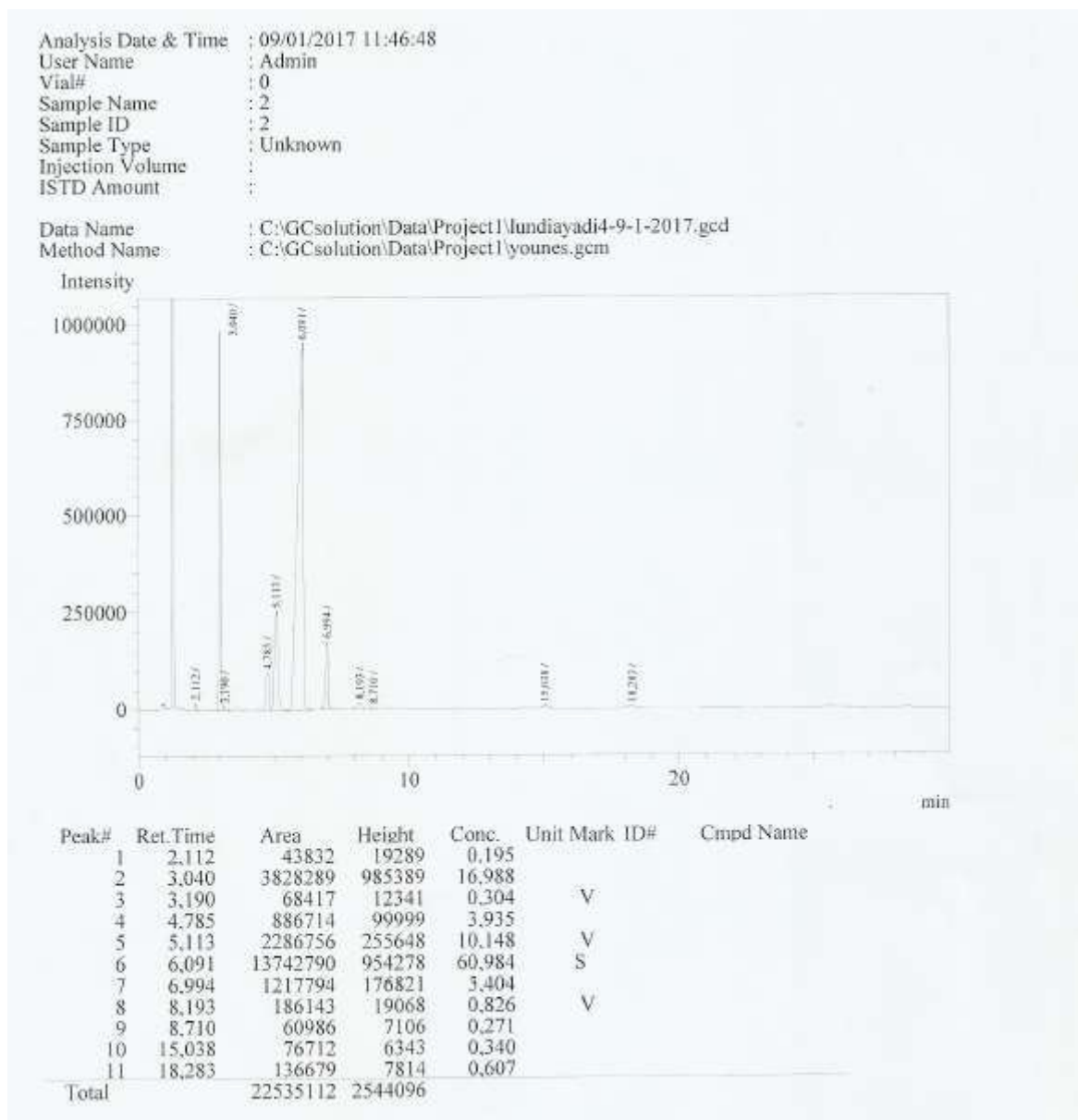


Figure 18: chromatogramme CPG des EMAG de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. torréfiées pendant 10 min

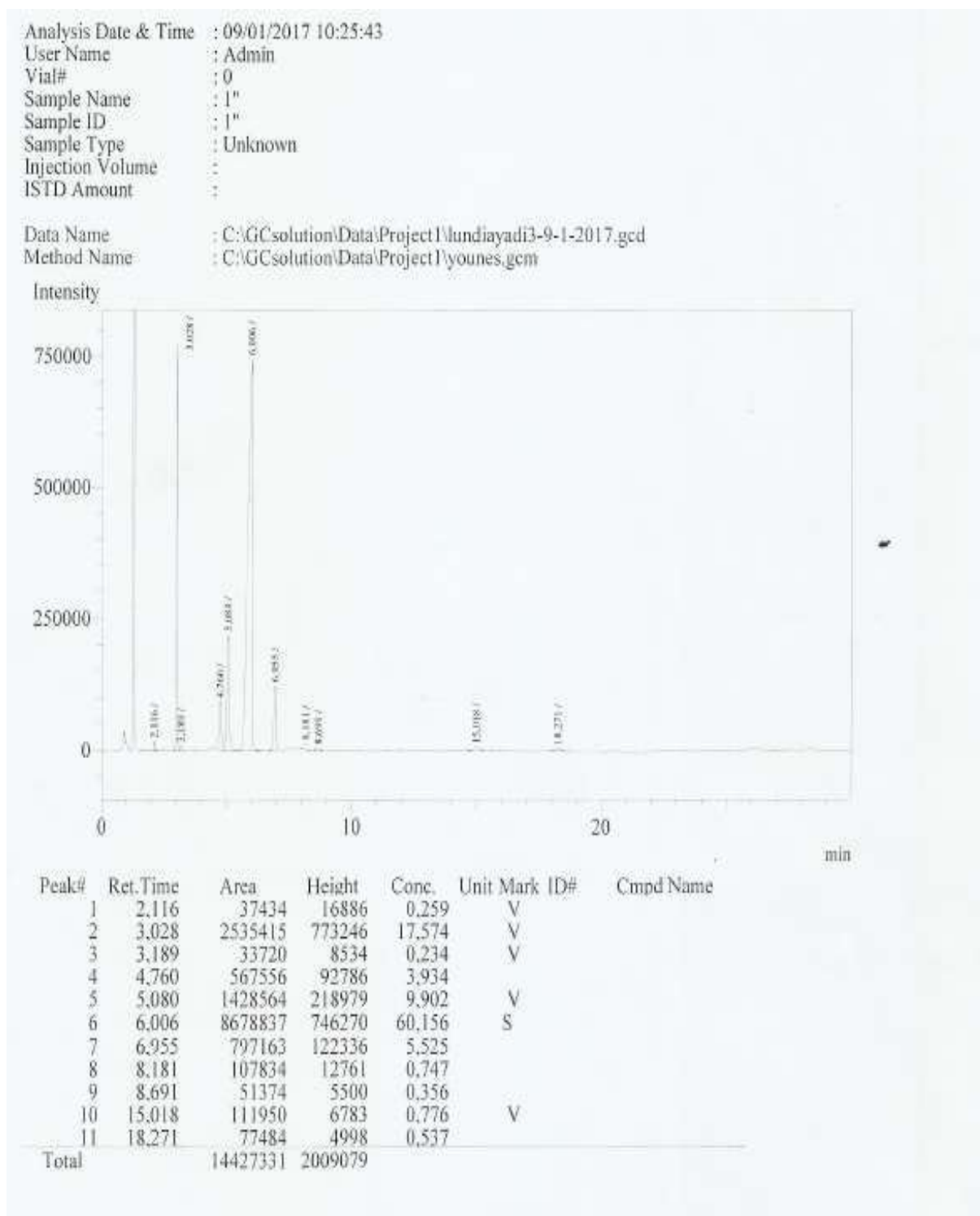


Figure 19: chromatogramme CPG des EMAG de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. torréfiées pendant 5 min

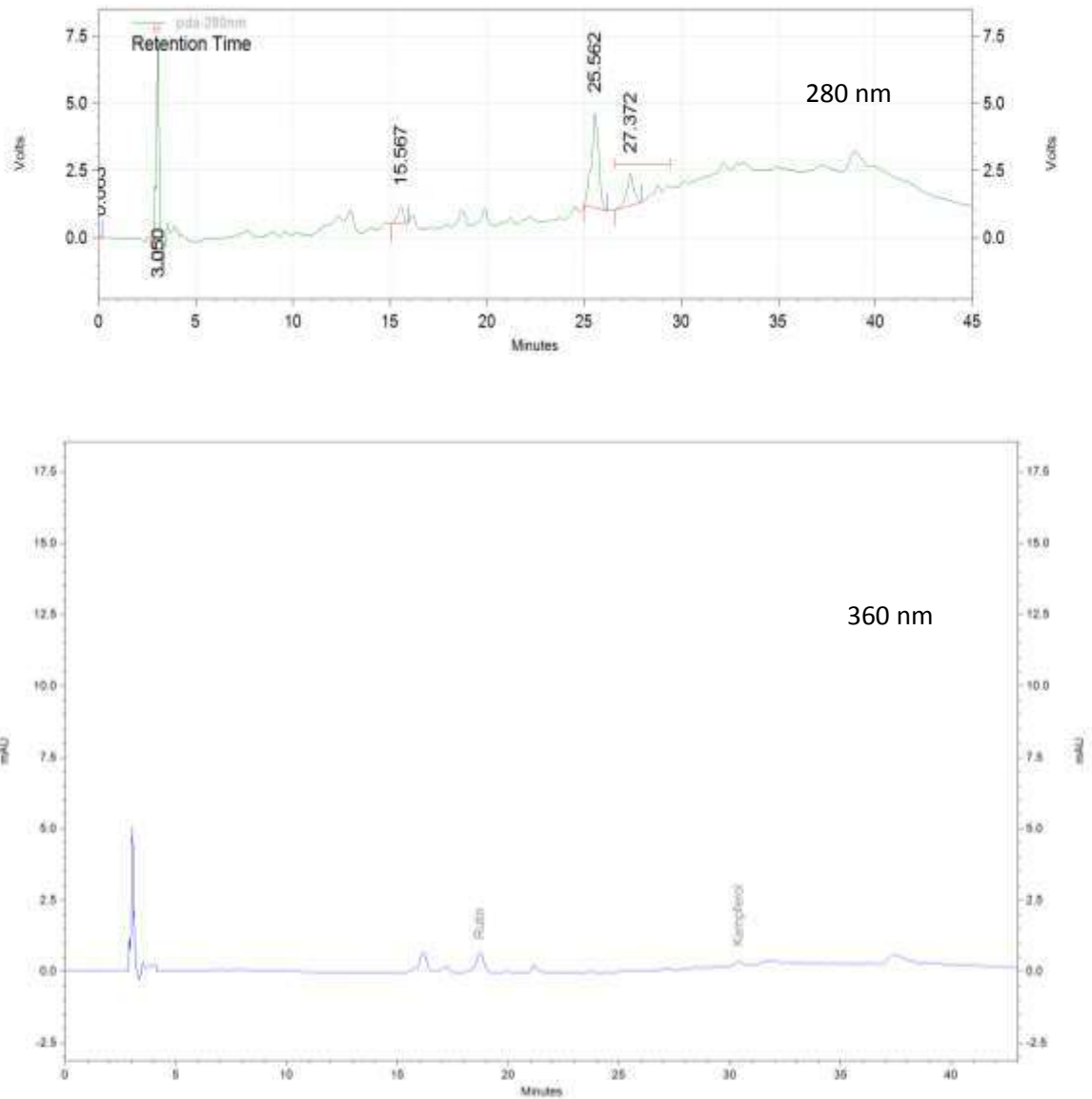


Figure.20: Chromatogrammes CLHP des composés phénoliques de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. torréfiées pendant 5 min à 280 nm et 360 nm

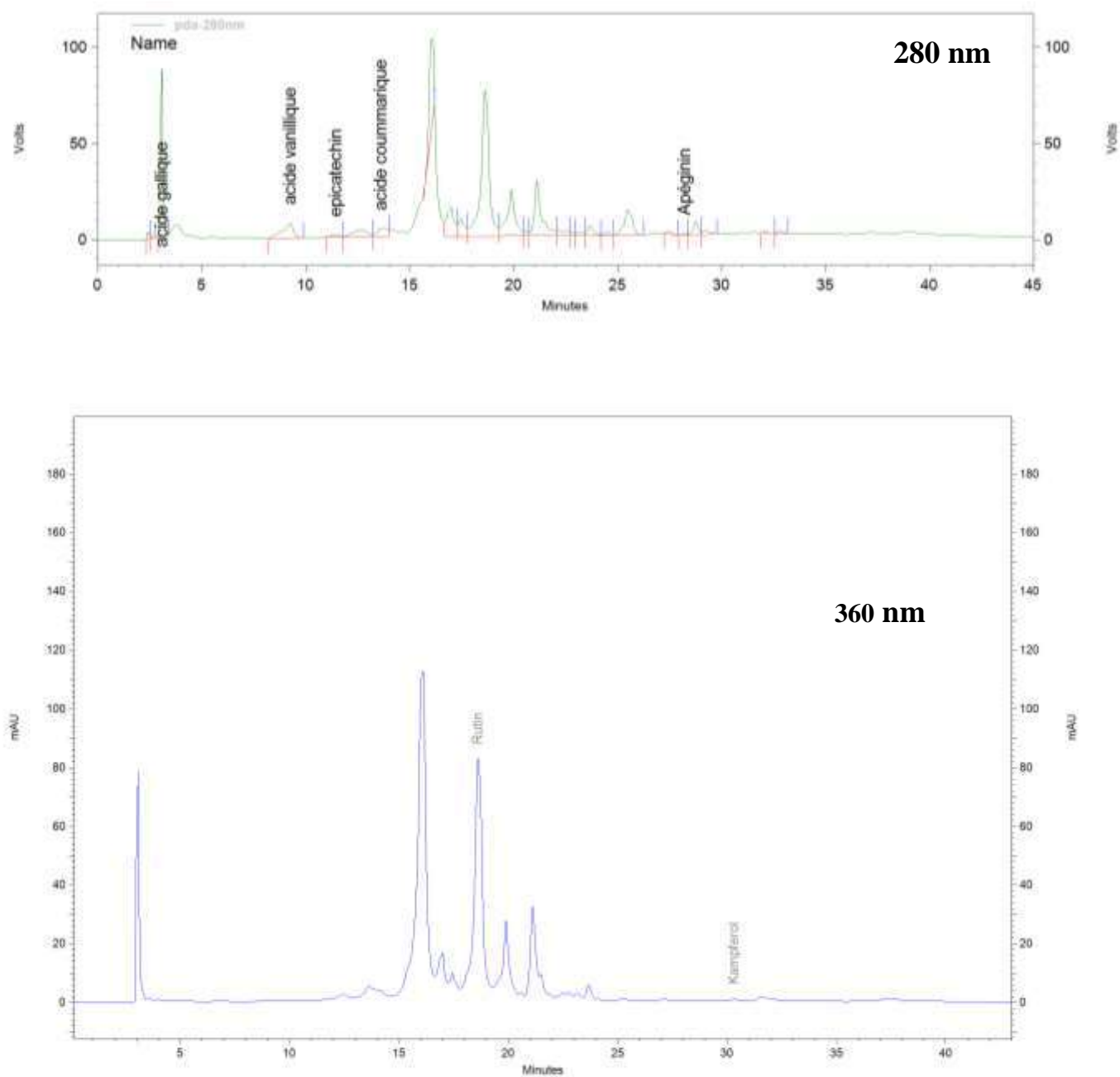


Figure.21: Chromatogrammes CLHP des composés phénoliques de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. torréfiées pendant 15 min à 280 nm et 360 nm

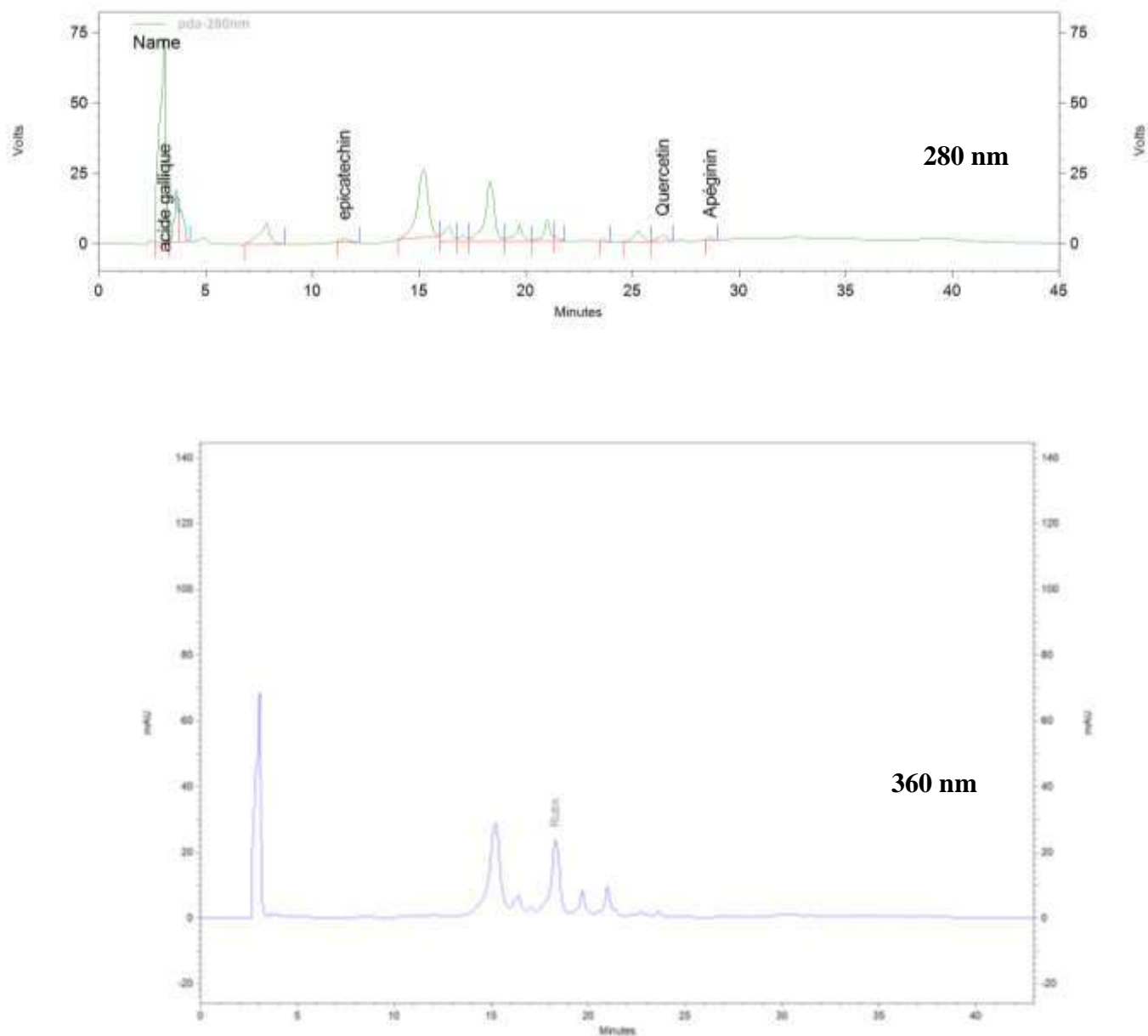


Figure.22: Chromatogrammes CLHP des composés phénoliques de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. torréfiées pendant 20 min à 280 nm et 360 nm

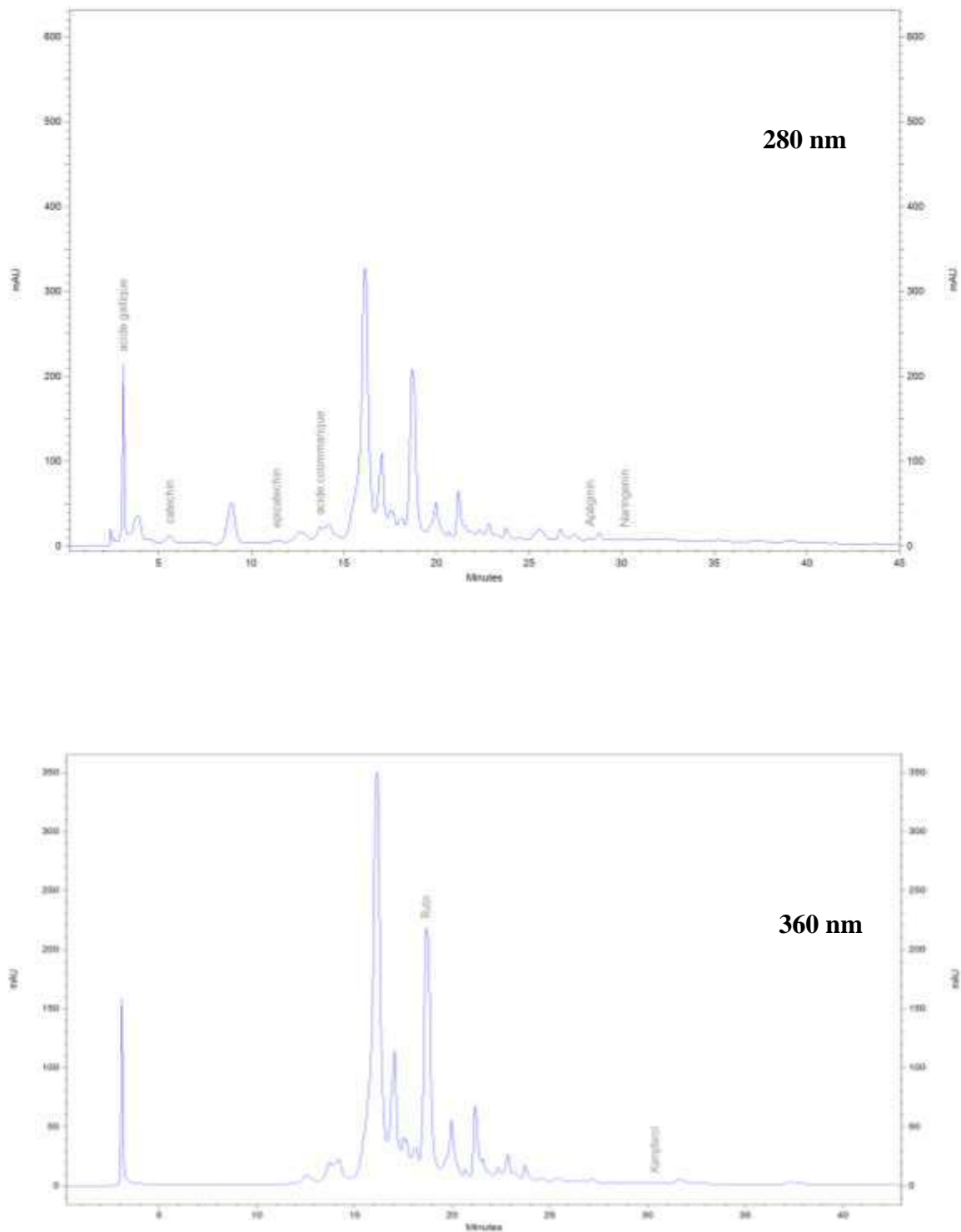


Figure.23: Chromatogrammes CLHP des composés phénoliques de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. torréfiées pendant 30 min à 280 nm et 360 nm

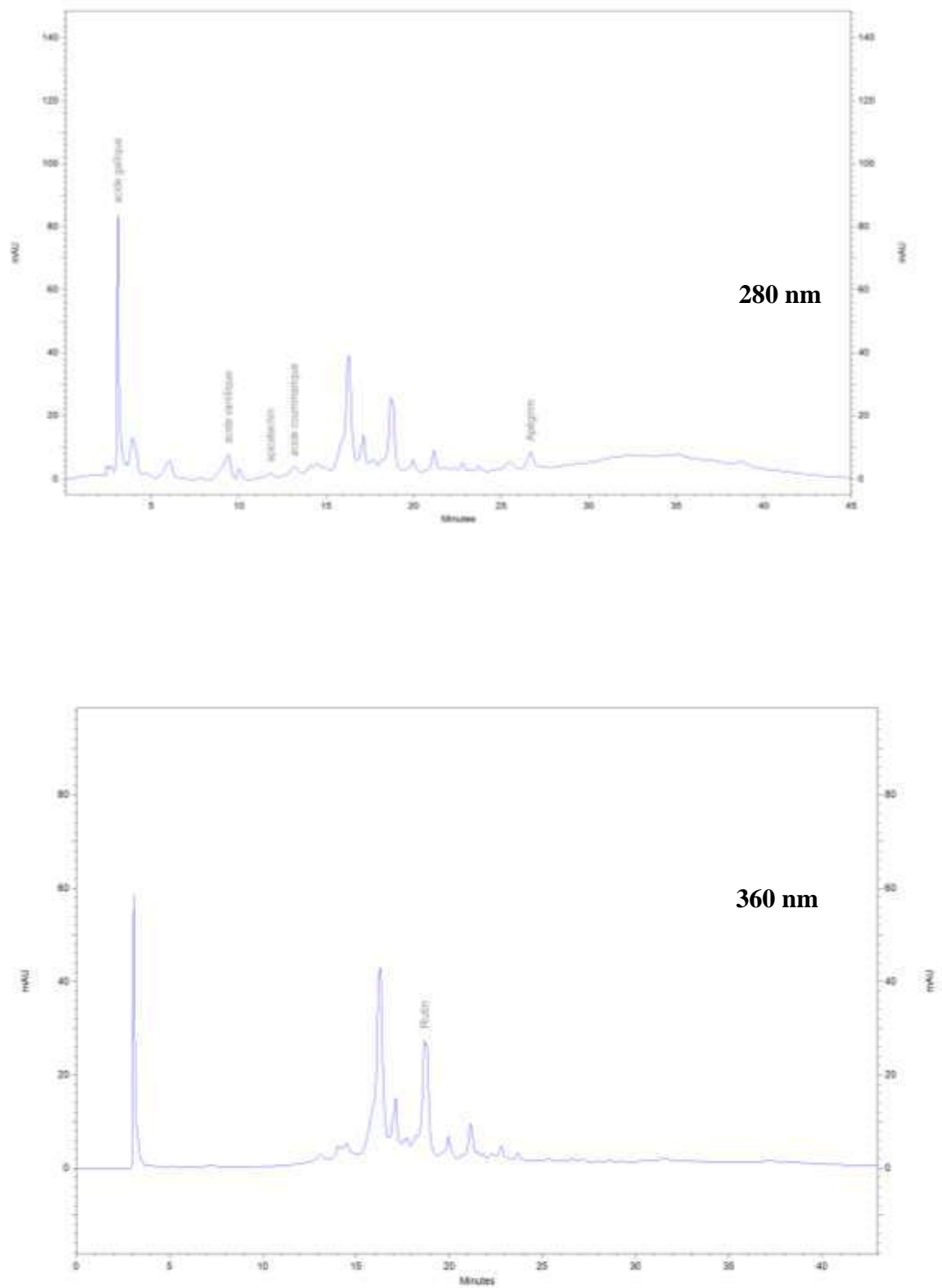


Figure.24: Chromatogrammes CLHP des composés phénoliques de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. torréfiées pendant 40 min à 280 nm et 360 nm

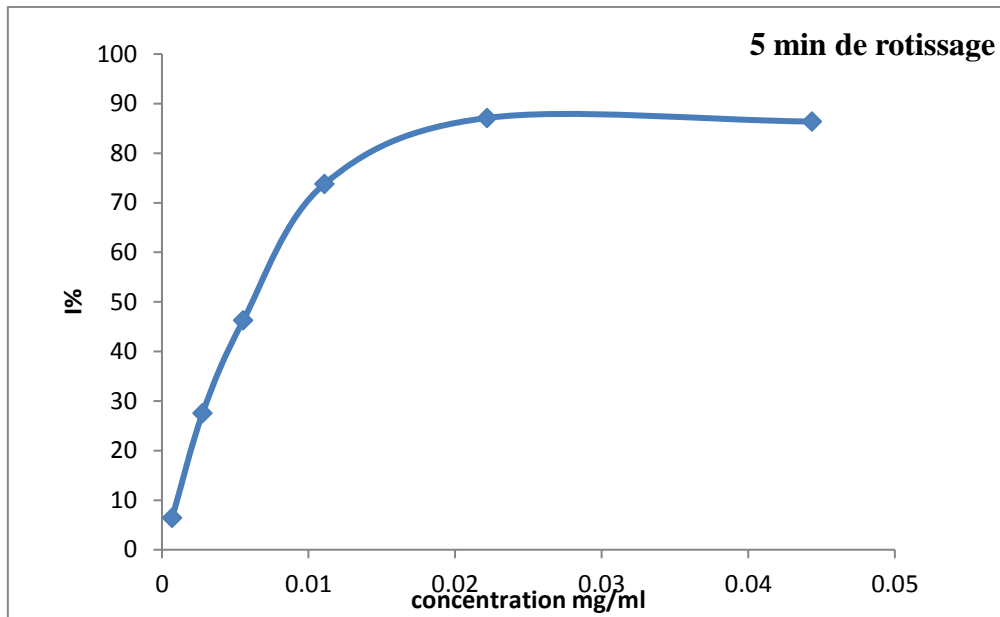


Figure .25 : La variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations en huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. torréfiées pendant 5 min dans le test du DPPH

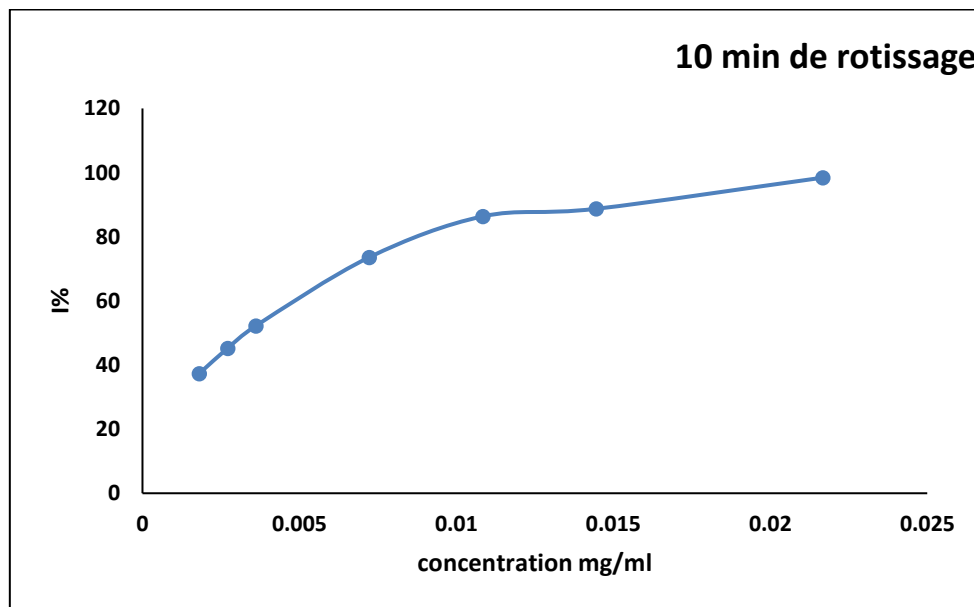


Figure .26 : La variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations en huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. torréfiées pendant 10 min dans le test du DPPH

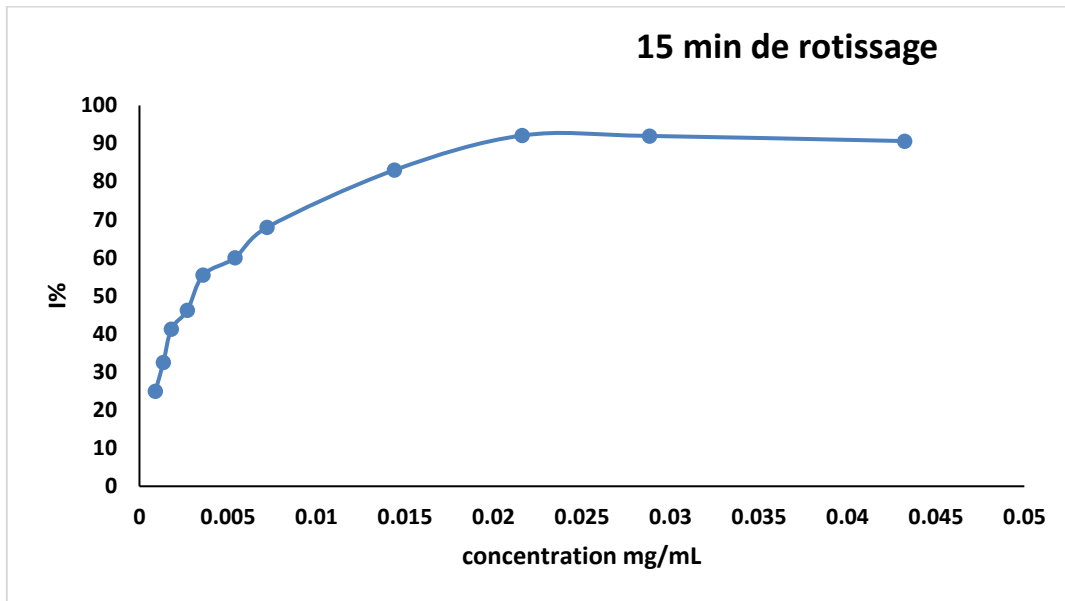


Figure 27 : La variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations en huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. torréfiées pendant 15 min dans le test du DPPH

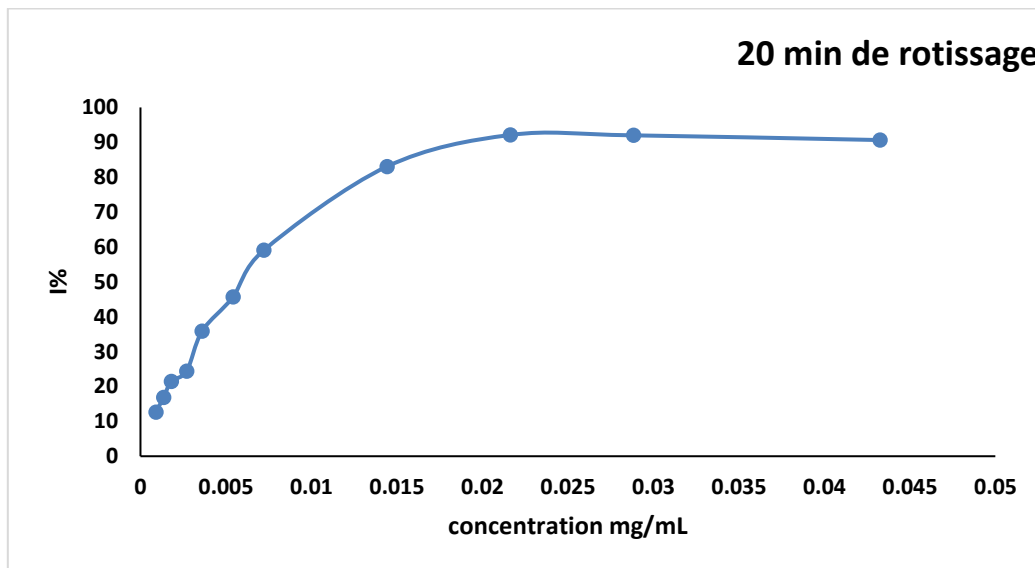


Figure 28 : La variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations en huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. torréfiées pendant 20 min dans le test du DPPH

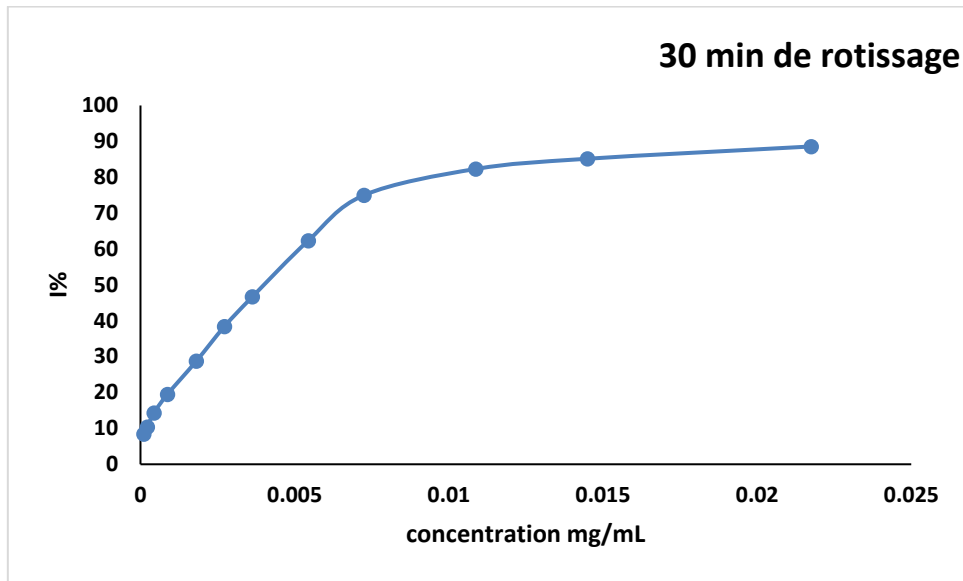


Figure 29 : La variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations en huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. torréfiées pendant 30 min dans le test du DPPH

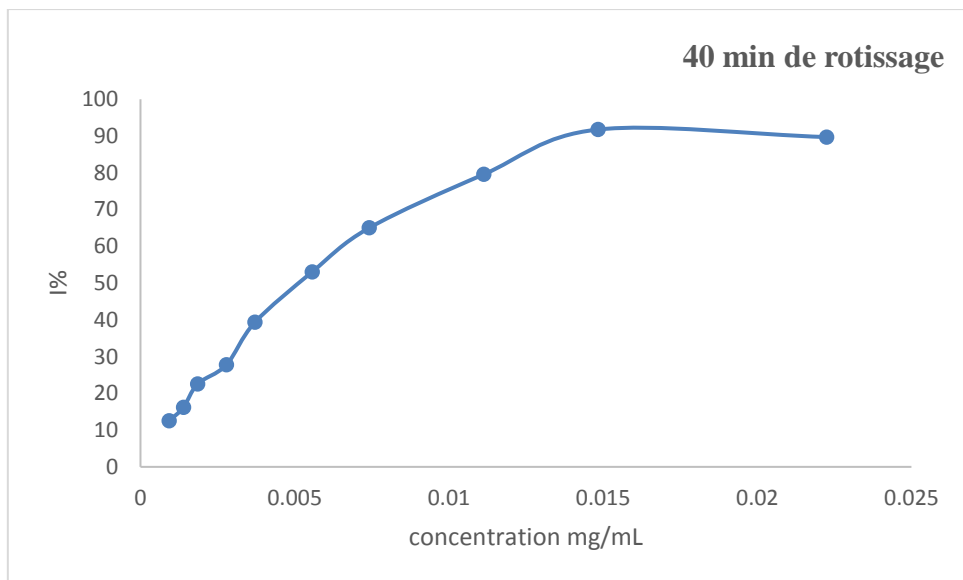


Figure 30 : La variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations en huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. torréfiées pendant 40 min dans le test du DPPH

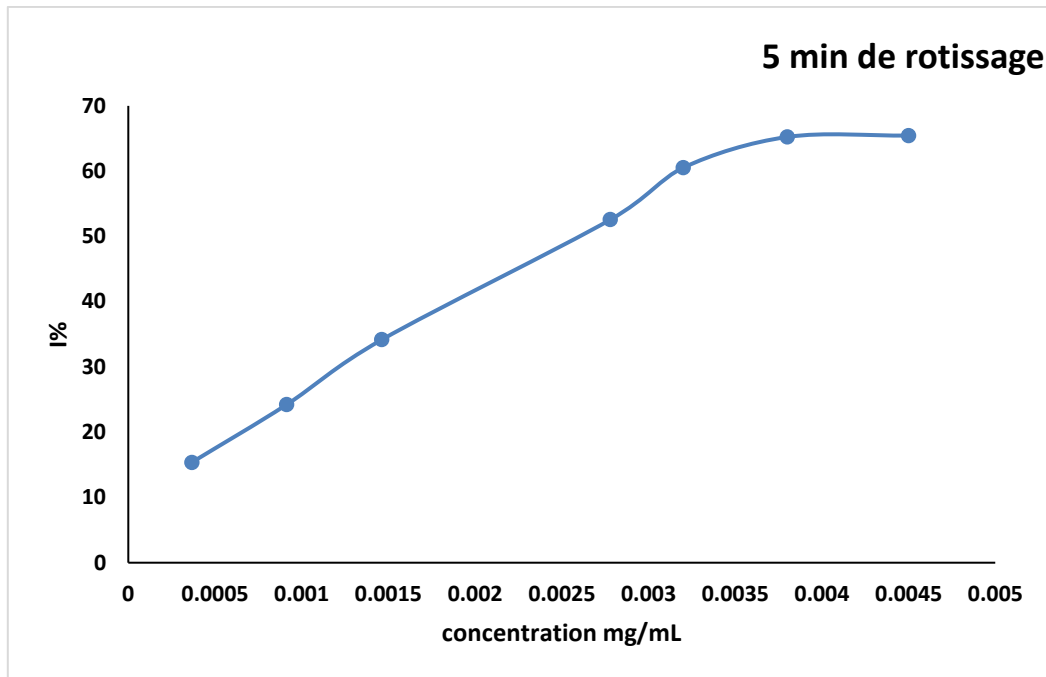


Figure 31 : La variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. torréfiées pendant 5 min dans le test de blanchiment du β -carotène

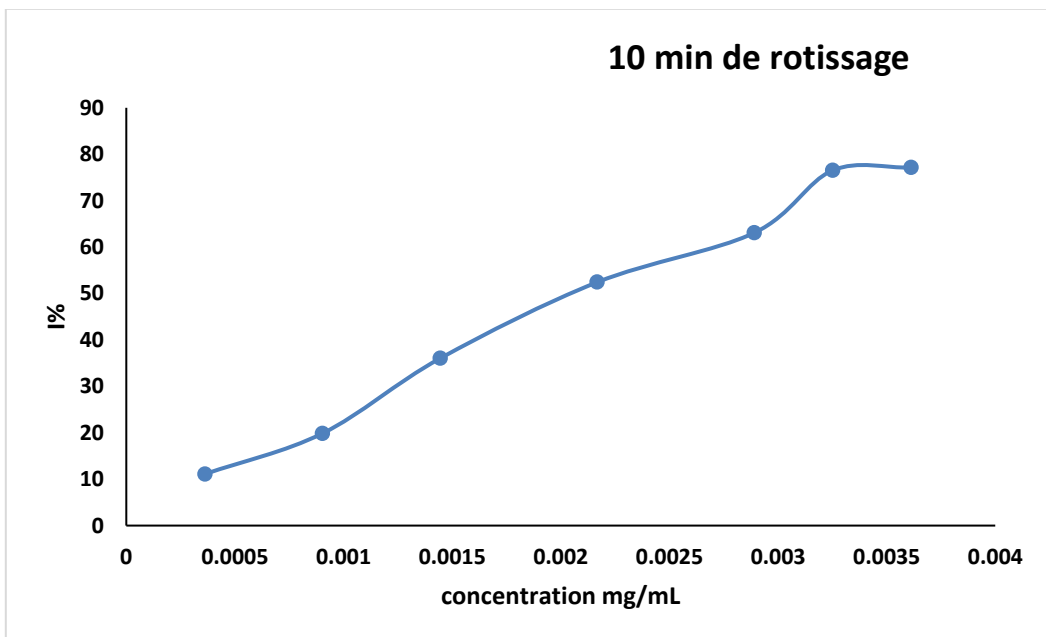


Figure 32 : La variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. torréfiées pendant 10 min dans le test de blanchiment du β -carotène

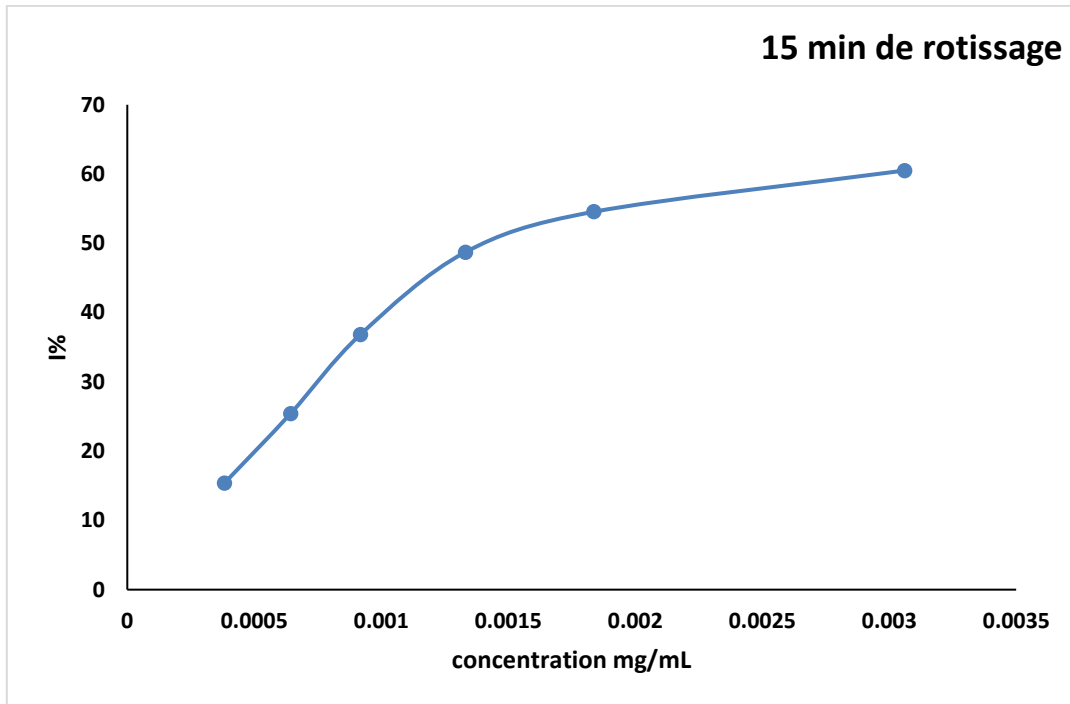


Figure 33 : La variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. torréfiées pendant 10 min dans le test de blanchiment du β -carotène

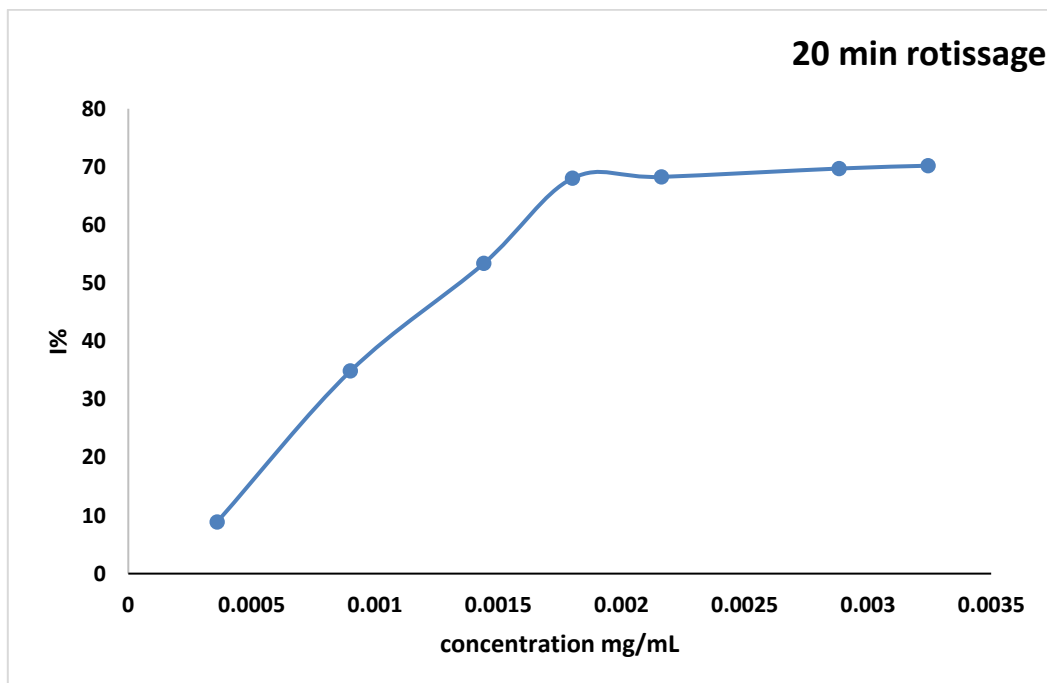


Figure 34 : La variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'huile fixe des graines torréfiées pendant 15 min dans le test de blanchiment du β -carotène

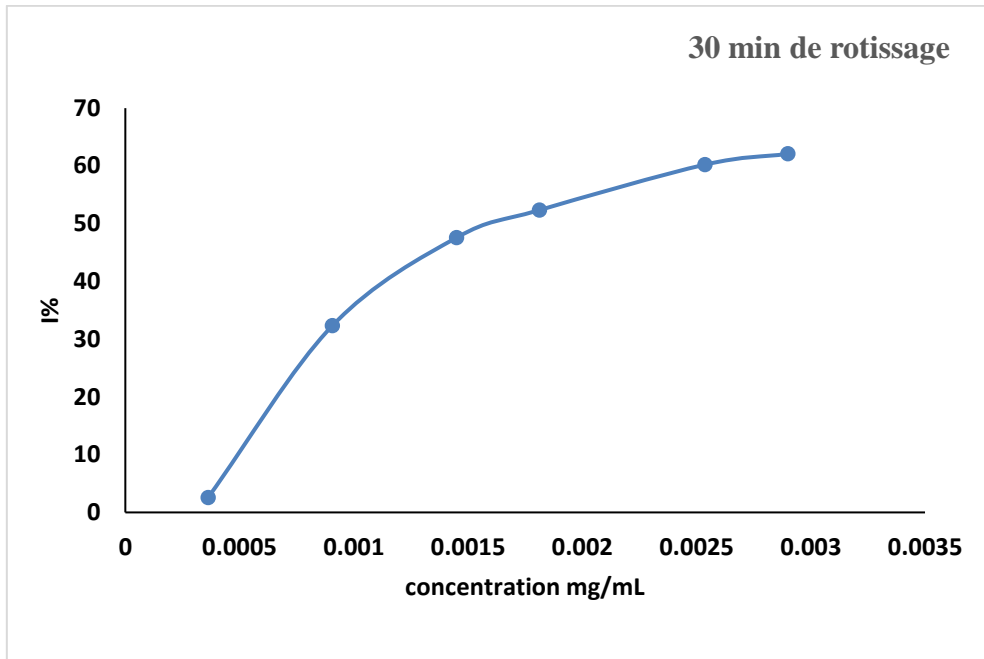


Figure 35 : La variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. torréfiées pendant 30,min dans le test de blanchiment du β -carotène

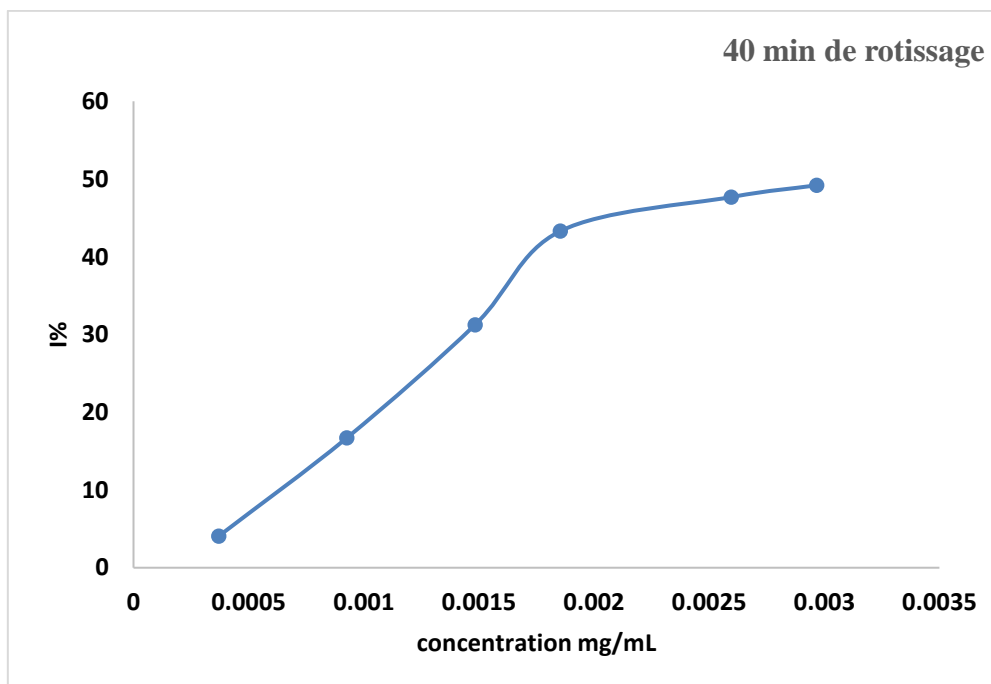


Figure 36 : La variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. torréfiées pendant 40 min dans le test de blanchiment du β -carotène.

Annexes

Tableau 1. Les principaux acides gras saturés.

Acides	Nom systématique	Symbole chimique	formule
Laurique	Dodécanoïque	C 12 : 0	C12H24O2
Myristique	Tétradécanoïque	C 14 : 0	C14H28O2
Palmitique	Hexadécanoïque	C 16 : 0	C16H32O2
Stéarique	Octadécanoïque	C 18 : 0	C18H36O2
Arachidique	Eicosanoïque	C 20 : 0	C20H40O2
Behénique	Docasanoïque	C 22 : 0	C22H44O2
Lignocérique	tétracosanoïque	C 24 : 0	C24H48O2

Tableau 2. Les principaux acides gras insaturés.

Acides	Nom systématique	Symbole	formule
Myristoléique	Cis-9-tétradéca-noïque	C14 : 1	C14H26O2
Palmitoléique	Cis-9-hexadéca-noïque	C16 : 1	C16H30O2
Oléique	Cis-9-octadéca-noïque	C18 : 1	C18H34O2
Vaccénique	11-trans-octadécanoïque	C18 : 1	C18H34O2
Linoléique	Cis-9-cis-12-octa-décatriénoïque	C18 : 2	C18H32O2
Linoléinique	Cis-9-cis-12-cis15-Octadécatriénoïque	C18 : 3	C18H30O2
Arachidonique	Cis-5-cis-8-cis-11-cis-14-écosapentaénoïque	C20 : 4	C20H32O2
Erucique	Cis-13- docasénoïque	C22 : 1	C22H34O2