



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Blida 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département : Science-alimentaire

Laboratoire Science Technologies Alimentaires et Développement Durable

Spécialité : Nutrition et Diététique Humaine

Filière : Sciences Alimentaires

Mémoire de Fin d'Etude En vue de l'obtention du diplôme de Master
En Science Alimentaire

Thème

Évaluation du pouvoir antioxydant et antimicrobien des extrait végétaux nigella sativa L en vue de leur utilisation dans le domaine d'alimentation diététique.

Présenté par :

Feriel Bouaied & Imene Rahal

Soutenu devant le jury :

Mme GUESSAIBIA N.

MCA /USDB 1

Présidente

Mme DEFFAIRI DJ.

MCB /USDB 1

Examinatrice

Mme BENMANSOUR N.

MCA/USDB 1

Promotrice

Année Universitaire 2020-2021

Remerciements

Avant tout, nous tenons à remercier Dieu le tout puissant de nous avoir donné la force et la patience et le courage d'accomplir ce modeste travail.

À tous les professeurs qui nous ont aidés tout au long de notre cursus universitaire en particulier notre encadreur Madame BENMANSOUR NABAHAT.

À nos juges, madame GUESSAIBIA N et madame DEFFAIRI D pour avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

À madame BOUCHARREB DJAMILA pour nous avoir aidés et nous faciliter la tâche de faire notre expérience d'extraction des huiles dans son entreprise.

Nos remerciements vont également, à Monsieur HACENE ISMAIL de nous avoir aidé pour Effectuer les analyses des huiles.

Un grand merci à tous les enseignants de la faculté des sciences de la nature et la vie, et du département Science alimentaire de l'université Saad Dahleb Blida 1 qui ont contribué à notre formation.

Je remercie très sincèrement toutes les personnes qui d'une façon ou d'une autre, ont participé à l'élaboration de ce travail.

...FERIEL & IMENE

Dédicaces

Nous remercions tout d'abord Allah de nous avoir donné la force, la volonté, le courage et les capacités pour poursuivre nos études et arrivé la.

Je tiens à exprimer ma gratitude et mes plus vifs remerciements à ma chère maman **HAYET** qu'elle représente el hayet pour moi, ma joie de vivre et ma héroïne qui a été toujours prête à sécher mes larmes.

A mon chère papa **MOHAMED** mon sens de l'honneur et de la responsabilité.

Merci d'avoir toujours été avec moi, sans ton amour et ton soutien je ne serais jamais arrivée là où je suis, je t'aime qu'Allah vous protège.

A mon grand père **SAID**.

A mes sœurs et mes frères **MERIEM, LEILA, ABDERAHIM, ADEM, IYED, SABER**.

A tous les membres de ma famille, surtout à mes tants **DJAOUIDA, MANEL, IKRAM, ZOLA, NAWEL**.

A mes amies **HADIA, GHOFAN, FERIEL, IMENE, SIHEM** avec lesquelles j'ai pu partager des moments de bonheur uniques.

Aux amies du **Club SCC** et au groupe de master **NDH** de ma promotion, Merci pour les moments sympathiques qu'on a passés ensemble.

A tous ceux qui m'aiment et qui ont cru en moi...

....Ferial

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail...

A mes très chers parents : Ahmed Et Djahida, symbole de courage et de sacrifice, que le dieu les garde et les protège.

A mes très chers frères : Othemane et Yassine

Et mes très chères sœurs : Radhia, Fatma, Khadija, Zohera, Zineb, Houria, Bouchera.

A mes très chères nièces : Nada, Anfal, Dikra, Batoul, Wildan, Salsabil, Mohamed, Alaa Eddine, Abd el Wadoude, Khalile, Acheraf, Adam, Nouh, Abdel Basset, Daoud, Abd el Momen, Younese, Abd El Ghafoure, Walid.

A tous les beaux frères : Mahfoud, Mohamad, Djallol, Kamel, Amure, Faysal

A mon très chère marie : Maazouze Yakhlef Et Sa Famille.

A ma très chère amie, et binôme feriel.

A tous ceux qui m'aiment et que j'aime

.....**Imene**

المخلص

وقد ركز هذا الموجز على دراسة أحد النباتات الطبية ، *Nigella sativa* L.، من المنطقة الواقعة في مدينة جدة (المملكة العربية السعودية). وتتمثل الأهداف أساسا في تحديد المركبات الفينولية للأنواع التي تمت دراستها وتقييم قوتها المضادة للأكسدة والأجسام.

وكشف الفحص الكيميائي النباتي لمستخلصات بذور *Nigella sativa* L. عن وجود كمية كبيرة من الفلافونويدات والتانين والمستعمرات في المنطقة. ومع ذلك ، فإن التيربينات والأنثوسيانين والجليكوسيدات غائبة في البذور في المنطقة. وتركيزات البولي فينولات والفلافونويدات من مستخلص الميثانوليك *L Nigella sativa* من منطقة Jiddah هي 60 0,15 ملغ من مستخرج EAG/g و 0,45 15 ملغ من مستخرج EQ/g ، على التوالي.

إن المستخلص الميثانولي من بذور نايجيلا ساتيفا *L* التي تم جمعها من منطقة جيدا من الممكن أن يعيد الراديكالي 2.2 المستقر ثنائي الفينيل-1-بيكريليهيدرازيل إلى ثنائي فينيل هيدرازين أصفر اللون مع IC50 0.07 ملغ/مل (70 أوغ/مل). وهذا أقل من نظيره في بي إتش (0.01 ملغ/مل (10 أوغ/مل).

وأظهر الزيت الأساسي ل *Nigella sativa* L. نشاطا متوسطا مقابل السلالات Gr +. يتم كبح البكتيريا *staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis* مع قطرات خاصة من الكبح 15 ملم و 13 ملم. ونحن نلاحظ نشاطا منخفضا في مواجهة الزيوت: الإسكيريلا كولي (12 مم) و (11 مم) *Pseudomonas aeruginosa* (مم). وقد أظهرت دراسة النشاط المضاد للزيوت فيما يتصل بالفطريات حساسية للبيدين (12 *Candida albicans* مم) و *Saccharomyce* (13 *Crapheriae visiae* مم).

الكلمات الرئيسية: *Nigella sativa* L. ، الفحص الكيميائي النباتي ، الأيضات الثانوية (polyphenols and flafonoids) ، النشاط المضاد للأكسدة ، النشاط المضاد للأجسام.

RESUME

Ce mémoire a porté sur l'étude d'une plante médicinale, *Nigella sativa L.* en provenance de la région située dans la ville de Jiddah (Arabie Saoudite.). Les objectifs visés consistent essentiellement à mettre en évidence le dosage des composés phénoliques de l'espèce étudiée et évaluer son pouvoir antioxydant et antibactérien.

L'examen phytochimique des extraits des graines de *Nigella sativa L.* a divulgué la présence d'une quantité importante des flavonoïdes, des tannins et des stérols dans la région. Cependant Les terpènes, les anthocyanes et les glycosides sont absents dans les graines de la région

Les concentrations des polyphénols et des flavonoïdes de l'extrait méthanolique de *Nigella sativa L* récoltée dans la région de Jiddah sont respectivement $60 \pm 0,15$ mg EAG/ g d'extrait et $15 \pm 0,45$ mg EQ / g d'extrait

L'extrait Méthanolique des graines de *Nigella sativa L* récoltée dans la région de Jiddah pouvait ramener le radical libre stable 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) au diphenylpicrylhydrazine jaune-coloré avec IC₅₀ 0.07 mg/ml (70 ug/ml) . Cette dernière est inférieur à celle de B HA (0.01mg/ml (10 ug /ml).

L'huile essentielle de *Nigella sativa L.* a montré une activité moyenne vis à vis des souches Gr +. Les bactéries *staphylococcus aureus* et les *Bacillus subtilis* sont inhibées avec des diamètres d'inhibition respectifs 15 mm et 13 mm. Nous notons une faible activité vis-à-vis des bactéries Gr- : *Escherichia coli* ($\emptyset=12$ mm) et *Pseudomonas aeruginosa* ($\emptyset= 11$ mm) L'étude de l'activité antifongique des huiles vis à vis des deux champignons a montré une sensibilité des levures *Candida albicans*(12 mm) et des *Saccharomyce cerevisiae*(13mm) vis-à-vis de notre huile essentielle

Mots clés : *Nigella sativa L*, screening phytochimique, métabolites secondaires (polyphénols et flavonoïdes), activité antioxydante, activité antibactérienne.

Abstract

This brief focused on the study of a medicinal plant, *Nigella sativa* L., from the region located in the city of Jiddah (Saudi Arabia). The objectives are essentially to identify the determination of the phenolic compounds of the species studied and to evaluate its antioxidant and antibacterial power.

Phytochemical examination of *Nigella sativa* L. seed extracts revealed a significant amount of flavonoids, tannins and sterols in the area. However Terpenes, anthocyanins and glycosides are absent in seeds in the area

The concentrations of polyphenols and flavonoids of the methanolic extract of *Nigella sativa* L collected in the Jiddah region are 60 0,15 mg EAG/g extract and 15 mg extract respectively.

Methanolic extract from *Nigella sativa* L seeds collected from the Jiddah region could return the free radical 2,2 stable diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) to yellow-coloured diphenylpicrylhydrazine with IC₅₀ 0.07 mg/ml (70 ug/ml). This is lower than that of B HA (0.01mg/ml (10 ug/ml).

The essential oil of *Nigella sativa* L. showed an average activity vis-à-vis the strains Gr +. The bacteria *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* are inhibited with respective diameters of inhibition 15 mm and 13 mm. We note a low activity vis-à-vis With regard to the bacteria Gr- : *Escherichia coli* (Ø=12 mm) and *Pseudomonas aeruginosa* (Ø= 11 mm) The study of the antifungal activity of the oils with regard to the two fungi showed a sensitivity of the yeasts *Candida albicans*.

Keywords: *Nigella sativa* L, phytochemical screening, secondary metabolites (polyphenols and flavonoids), antioxidant activity, antibacterial activity.

Liste des figures

Figure 1 : Classification botanique selon Bentham et Hooker.....	8
Figure 2 : Aspect morphologique de la plante <i>Nigella sativa L</i>	10
Figure 3 : précipitation moyenne mensuelle en (mm) et Variation des températures de la station de Jeddah Arabie saoudite.....	20
Figure 4: <i>Nigella sativa L</i> (fleurs : A, B et graines : C, D et E).....	21
Figure 5 : graines entières et graines broyés par un mixeur électrique.....	23
Figure 6: courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	27
Figure 7: courbe d'étalonnage de la quercétine.....	28
Figure 8: Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.....	28
Figure 9 : Rendements de la masse des extraits secs des échantillons <i>Nigella sativa L</i> récoltée dans la région de Jiddah.....	35
Figure 10 : Les résultats du dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes condensés dans les extraits méthanoïques de <i>Nigella sativa L</i> récoltée dans la région de Jiddah.....	39
Figure 11 : Pourcentage d'inhibition d'extrait Méthanoliques de <i>Nigella sativa L</i> récoltée dans la région de Jiddah (EMG) et de BHA (Hydroxyanisole butylé).....	40
Figure 12: IC50 en ug/ml de BHA (Hydroxyanisole butylé) et d'extrait Méthanolique de <i>Nigella sativa L</i> récoltée dans la région de Jiddah.....	41

Liste des tableaux

Tableau 1 : Différents noms communs de *N. sativa* dans différentes régions du monde.....

Tableau 2 : Présente la répartition des autres espèces cultivées de *Nigella* dans le monde.....

Tableau 3 : Composition des graines de *Nigella sativa* L.....

Tableau 4 : Répartition en acides aminés des protéines de graines de *Nigella sativa* L.....

Tableau 5 : Comparaison de la composition des graines de Nigelle avec celle d'autres.....

Tableau 6 : Localisation et texture du sol de la station d'étude.....

Tableau 7 : Microorganismes-cible utilisés et les principales maladies qu'ils peuvent causer.....

Tableau 8 : Screening phytochimique.....

Tableau 9 : estimation de la sensibilité des souches.....

Tableau 10 : Résultats du screening phytochimique de *Nigella sativa* L. récoltée dans la région de Jiddah.....

Tableau 11 : les résultats de l'étude qualitative : détermination des diamètres des zones d'inhibition.....

Tableau 12 : les résultats de l'étude quantitative : détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).....

Liste des abréviations

NS : Nigella Sativa

HE : Huile essentielle

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

CPG-SM : Chromatographie en phase gazeuse - Spectrométrie de masse

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance

DL50 : La dose létale 50

% : pourcentage

°C : degré césure

ATCC: American Type Collection Culture.

AlCl₃ : trichlorur d'aluminium

BHA : Hydroxyanisole butylé

CRD : centre de recherche et développement

CMI : la concentration minimale inhibitrice

D : Diamètre

DPPH : 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

EAG : équivalent d'acide gallique

ES : d'extrait sec

EQ : équivalent de Quercetine

HE : huile essentielle

HF : huile fixe

H₂SO₄: sulfate de sodium anhydre

HPLC : chromatographie en phase liquide haute pression

IC₅₀ : concentration inhibitrice de 50% des radicaux libre

IL-8 : l'interleukine 8

mm : millimétré

nm : nanomètre

RL : radical libre

Rdt : rendement

SB : bouillon schaedler

TRP : potentiel de récepteur transitoire

TSB : bouillon tryptone soja

TQ : Thym quinone

UV : ultra-violet

UFC : unité formant colonie

µg : microgramme

V/V : volume/volume

Ø : Diamètre

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction.....1

Chapitre 1 : Généralité sur la plante

I.1. Généralités.....5

I.2. Historique.....5

I.3. Origine.....6

I.4. Etymologie.....6

I.5. Systématique.....8

 I.5.1. Classification botanique.....8

 I.5.2. Autres espèces cultivées dans le monde.....8

I.6. Description botanique de la plante

 I.6.1. Les exigences écologiques

 I.6.2. Les exigences culturales

I.7. La culture de la nigelle en Algérie

I.8. Composition phytochimique de *Nigella sativa L.*

 I.8.1. Composition générale

 I.8.2.. Composés du métabolite secondaire

 I.8.3. L'huile

 I.8.3. 1.Huile fixe

 I.8.3. 2. Huile essentielle

 I.9.. Toxicité

I.10.L'utilisation de *Nigella sativa L.* dans le domaine d'alimentation diététique.

 I.10.1.Définition de diététique

 I.10.2.Valeur nutritionnelle de *Nigella sativa L.*

 I.11. Propriétés

Chapitre 02 : Matériel et Méthode

II. 1.Choix, localisation et climatologie de la station d'étude

II.2.Matériel

II.2.1.Matériel végétal

II.2.2.Matériel Microbien

II.3. Méthodes

II.3.1 Préparation des extraits

II.3.2.Screening phytochimique

II.3.3. Caractérisation quantitative des extraits

II.3.3.1.Dosage des Poly-phénols et flavonoïdes

II.3.4 Activité anti-oxydante (in vitro)

II.3.5 Activité anti bactérienne

II.3.5.1.Préparation des échantillons

Chapitre 03 : Résultats et discussions

III.1.Rendement des Huiles essentielles des deux régions

III.2. Screening Phytochimique

III-3.Dosage des polyphénols et des flavonoïdes.....

III-3-1-Dosage des polyphénols.....

III-3-2 Dosage des flavonoïdes.....

III-4-Activité antioxydante de l'extrait Méthanolique de *Nigella sativa L.*.....

III-4-1-Détermination du pourcentage d'inhibition du radical DPPH.....

III-4-2-Détermination d'IC50.....

II.5. Activité antimicrobienne.....42

Conclusion.....47

Introduction

Introduction

Parmi les plantes médicinales les plus utilisées et qui ont suscité un grand intérêt pour les pays méditerranéens et asiatiques, on retrouve *Nigella sativa* L. Cette plante appartenant à la famille des Ranunculaceae, est communément connue sous le nom de Nigelle ou Cumin noir. À travers le monde, on ne dénombre pas moins d'une soixantaine de noms communs.

La Nigelle suscite un véritable engouement dans le monde, notamment sur le plan thérapeutique, sans compter ses nombreuses utilisations dans le domaine culinaire par les populations méditerranéennes depuis la nuit des temps. Les graines de Nigelle ont permis principalement l'extraction d'huile, bénéfique pour les soins du visage et pour traiter les affections cutanées. Les différentes recherches archéologiques pratiquées en Egypte, et notamment concernant la tombe du Pharaon Toutânkhamon (v.-1353 à -1343), ont permis de découvrir une fiole d'huile de graine de Nigelle appelée « huile des Pharaons ». De même, la médecine traditionnelle ayurvédique, originaire de l'Inde, a toujours exploité les bienfaits de cette plante (**KARRANDOU, 2016**)

Si en Europe, elle fut quelque peu oublié, dans les pays allant du Proche au Moyen Orient et au Maghreb elle a, de tout temps, été considérée comme la reine des plantes médicinales. Aujourd'hui, deux facteurs la propulsent conjointement sur le devant de la scène : il y a d'un côté ce fameux retour au naturel provoqué par une réelle prise de conscience des effets indésirables des produits chimiques, et de l'autre, l'intérêt toujours plus vivace que lui portent les membres de la communauté musulmane (**SLIMANE, 2012**).

Depuis quelques années, de nombreuses publications scientifiques paraissent régulièrement, que ce soit pour étudier la composition chimique des graines de Nigelle et de ses extraits, ou pour explorer le champ de ses possibilités thérapeutiques. A l'heure actuelle, de nombreuses équipes de recherche de par le monde s'intéressent de près aux différentes vertus de *Nigella sativa* L. et de ses composants, dont la thymoquinone qui suscite un intérêt tout particulier et qui se trouve être le sujet d'innombrables publications scientifiques (**SLIMANE, 2012**).

De nombreux sites à visée commerciale fleurissent sur Internet, proposant des crèmes, lotions, shampoings et autres produits à base de graine ou d'huile de *Nigella sativa* L. La nigelle est mentionnée comme remède miracle dans certains forums avec des témoignages plus ou moins fondés. Cependant, bien qu'il s'agisse de phytothérapie, la Nigelle est loin d'être dénuée de toute toxicité. Un regard éclairé est nécessaire avant toute utilisation, et une mise en garde devant toute consommation abusive se révèle être indispensable.

Par ce travail, nous vous invitons à découvrir la plante *Nigella sativa* L provenant de la région de jiddah par une description botanique et phytochimique. Ensuite, nous nous intéresserons à l'utilisation culinaire et traditionnelle, ainsi qu'aux différents produits à base de Nigelle. Dans la partie expérimentale Nous déterminons le rendement des huiles essentielles, le dosage des métabolismes secondaires (poly phénols et les flavonoïdes), le pouvoir antioxydant et antimicrobien des huiles essentielles de l'espèce *Nigella sativa* L. Nous terminons par une conclusion et des perspectives.

Chapitre I : Généralité sur la plante

I.1.Généralités

Du latin nigellus “noirâtres”, la nigelle nous offre ses petites graines aromatiques menées d’une noire intense communément connues sous le nom de « cumin noir », black seed en Anglais, habbat al baraka ou encore el habba sawda dans les pays arabes, sanoudje en Algérie (GHEDIRA, 2006).

Parmi les graines condimentaires et médicinales les plus importantes cultivées en Algérie la *Nigella sativa* L. (CHOPRA *et al* ,1956 ; NADKARNI,1967). La graine noire fait partie de la famille des Renonculacée. Comme le nom suggère, la minuscule (2-4-mm de long), noir en forme de bateau Les graines sont utilisées dans l'alimentation et la médecine. Le beau blanc ou Les fleurs bleues ont des sépales et des feuilles finement divisées. Cette plante est largement cultivée et peut être cultivé comme une plante de jardin annuelle dans de nombreuses régions des États-Unis (YARNELL, 2011).

L'origine de *Nigella sativa* L. n'est pas bien établie. La plante était certainement largement cultivée il y a plus de 3000 ans. La *Nigella sativa* L. est inhérente à l'Europe du Sud-est, à l'Afrique du Nord et à l'Asie du Sud-ouest. Il est cultivé dans des pays tels que la région méditerranéenne du Moyen-Orient, l'Europe du Sud, l'Inde, le Pakistan, Oman, l'Arabie saoudite, Israël, la Syrie et la Turquie (GILANI et KHARE, 2004).

Nigella sativa L.est une plante rustique de saison fraîche, température optimale de 15°C et une gamme de 5 à 25°C. Elle pousse en plein soleil sur une large gamme de sol bien drainés à pH6-7 mais préféré le sable sol limoneux, elle est assez tolérante à la sécheresse et peut survive sans des sols secs mais nécessite un arrosage régulier pendant les périodes de sécheresse prolongée (LIM ,2013).

I.2 Historique :

La Nigella est l'une des plus utiles des herbes qui sont considérées comme une panacée pour promouvoir la santé et le traitement d'un large éventail de maladies depuis plus de 2000 ans (DARAKHSHAN *et al* ,2015).

La tradition historique de graine noire dans la médecine est substantielle aussi religieuse. Les graines de *Nigella sativa* L.ont été prescrites par le docteur égyptien et grec ancien pour traiter une variété de problème, notamment les maux de tête, la congestion, les maux de dents et les vers intestinaux, comme ainsi qu’un diurétique pour favoriser les menstruations et augmenter la production laitière (GOREJA ,2003).

Le prophète Mohammed (la paix est sur lui) a dit : ' **utilisez cette graine Noire ; il a une cure pour chaque maladie sauf la mort** ' (**Sahih Bokhari**).

La nigelle a été trouvée sur la tombe de Toutankhamon, elle était considérée par les égyptiens de l'antiquité comme une panacée. Chez les grecs anciens, la nigelle était considérée comme un remède précieux dans le traitement des affections hépatique et digestives. Pour Discordes (médecine Grec du premier siècle et auteur de *De Materia Medica*). Les graines de nigelle étaient utilisées pour traiter les maux de tété, les algies dentaires, la congestion nasale et pour combattre les vers intestinaux ; comme diurétique, pour favoriser les menstruations et comme galactagogues (**GHEDIRA, 2006**).

C'était l'une des plantes les plus précieuses qu'était connu et utilisé par les anciens Romains et grecs .Elle est également utilisée en ayurvédique (**JADHAV et al ,2005**).

Les petites graines noires ont suscité un vif intérêt pour la recherche scientifique qui a donné lieu à des recherches pour décrire son nature et de prouver son spectre d'activité biologique (**BOURGOU et al, 2008**).

Dans la Bible, *Nigella sativa* est identifiée comme étant « le cumin noir curatif » (**GHEDIRA, 2006**).

I.3. Origine

Nigella sativa L. c'est une plante herbacée originaire du moyen orient, de l'Europe centrale et de l'ouest de l'Asie et maintenant elle est cultivée dans plusieurs régions dans le monde surtout dans le bassin méditerranéen et en Inde (**GUIGNARD, 2001**).

I.4. Etymologie

La Nigelle doit son nom à ses graines. En effet, le genre *Nigella L.* issu du mot latin «niger» signifie noir à cause de la couleur des graines de la plupart des espèces de *Nigella*. Le nom d'espèce *sativa* vient du latin et signifie «cultivé». Il existe plusieurs espèces, toutes originaires d'Eurasie et elles sont considérées comme très anciennes parmi les plantes à fleurs.

Les Grecs nommaient *Nigella sativa* « μελάνθιον » melanthion, de « melas » qui veut dire noir et « anthos » fleur, donc l'étymologie tire du même attribut (**DIOSCORIDE, 2002**). *N. sativa* possède une multitude de noms à travers le monde. Quelques-uns sont cités dans le **tableau 1**. Les noms les plus communs sont : cumin noir ou poivrete.

Tableau 1 : Différents noms communs de *N. sativa* L. dans différentes régions du monde (BENHADOU et ANDALOUSSI, 2009)

Région	synonymes de <i>N. sativa</i>
Arabique	Sinouj, Sanouz, Shune Habbah sawda, Habbat barraka, Kamun aswad
Arménienne	Shoushma
Allemande	Zwiebelsame, Schwarzkümmel
Anglaise	Black seed, Black cumi Devil in the bush, Love the mist, Fennel flower Onion seed
Estonienne	Mustköömen
Finlandaise	Neidonkuka
Française	Cheveux de vénus, cum noir, Nigelle, Poivrette
Hindi	Kalounji, Munga reala
Hongroise	Feketekömény, Parasztbor Kerti katicavirá Borzaskata mag
Italienne	Nigella, Melanzis
Norvégienne	Svartkarve
Polonaise	Czarnuszkawna
Punjabie	Kalongi
Russe	Charnushka
Singhalaise	Kaluduru
Espagnole	Niguilla, Pasionara
Suédoise	Svartkummin
Tamile	Karun jiragam

Turquie	Çörekottu siyah
---------	-----------------

I.5. Systématique

I.5.1. Classification botanique

La classification botanique, provient du système établi par **Bentham et Hooker**. Cette classification n'est pas phylogénétique et reste à l'heure actuelle très utilisée pour la classification des espèces végétales.

La place du genre *Nigella* dans la systématique est précisée dans le schéma de la **figure 1**.

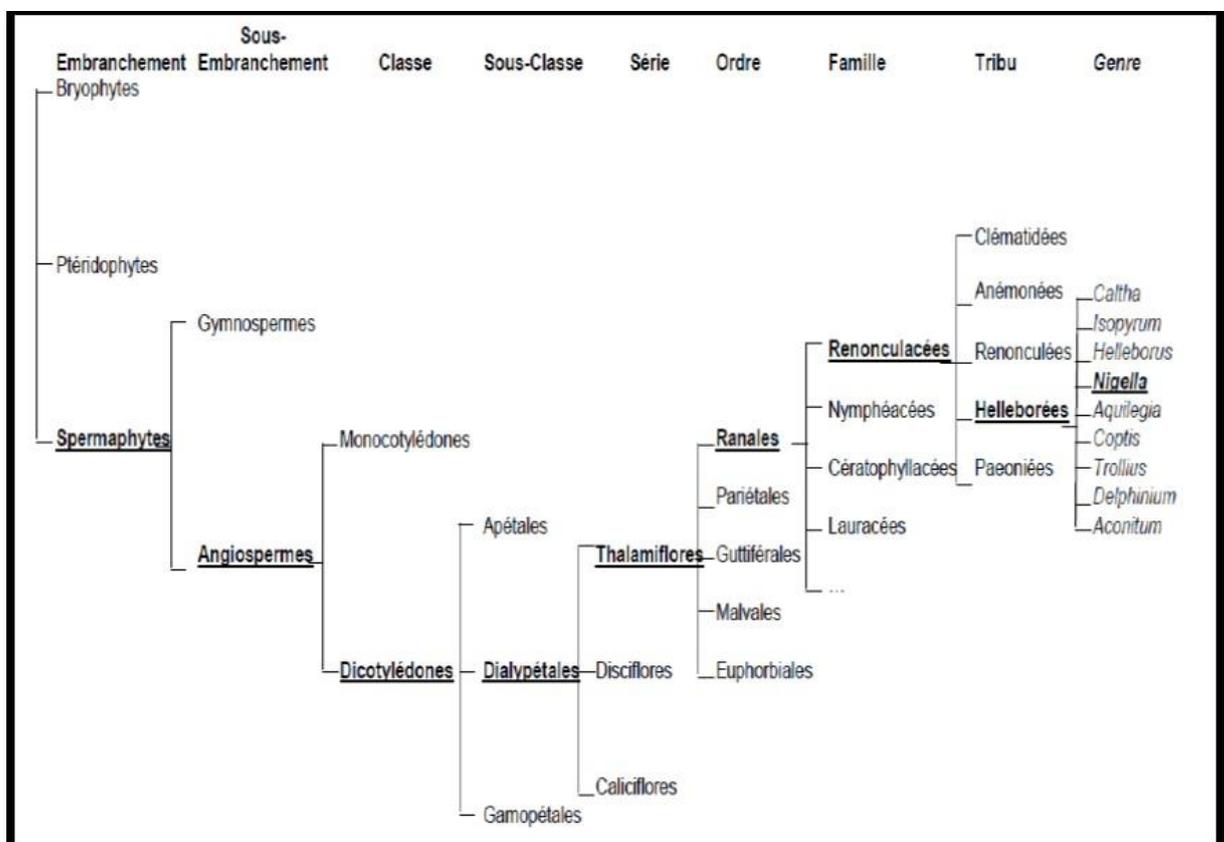


Figure 1 : Classification botanique selon Bentham et Hooker (1862-1883) (OZENDA, 2000) (SPICHIGER *et al*, 2002).

I.5.2. Autres espèces cultivées dans le monde

Le **tableau 2** : présente la répartition des autres espèces cultivées de *Nigella* dans le monde (TUTTIN, 1964) (FOURNIER, 2001).

Tableau 2 : présente la répartition des autres espèces cultivées de *Nigella* dans le monde (TUTTIN, 1964) (FOURNIER, 2001).

Espèce de <i>Nigella</i>	Répartition dans le monde
<i>Nigella cretica</i> Miller	Crète
<i>Nigella degenii</i> Vierth	Iles Cyclades, Carpates, Crète et Grèce
<i>Nigella segetalis</i> Bieb	Sud de l'Ukraine et Russie
<i>Nigella fumariifolia</i> Kotschy	Carpates, Crète et Chypre
<i>Nigella elata</i> Boiss	Asie mineure et Chypre
<i>Nigella doerfleri</i> Vierth	Crète
<i>Nigella nigellastrum</i>	Ensemble de la méditerranée à l'exception d Nord de l'Afrique
<i>Nigella ciliaris</i>	Chypre et Palestine

I.6. Description botanique de la plante

Nigella sativa L est une plante herbacée annuelle de la famille des Renonculacées. Atteignant 30 à 60 cm de haut avec des feuilles linéaires finement divisées (RAMADAN, 2012). Les fleurs sont délicates et généralement de couleur blanche, jaune, rose, bleu pâle ou pourpre pâle, avec 5 à 10 pétales. Les fruits murs constitués de follicules soudés s'ouvrant par une fente interne renferment de nombreuses graines de couleurs noir mat, ovoïdes, mesurant de 2 à 3 mm de long et présentant trois ou quatre angles. Il est généralement cultivé sur un sol sec entre Novembre à Avril et les graines prendre environ 10-15 jours pour germer (GHEDIRA, 2006 ; GHEDIRA et LE JEUNE, 2010).(Figure 2)

I.6.1. Exigences Ecologiques

La nigelle préfère des climats doux, une exposition ensoleillée et abritée. Elle demande des sols riches, meubles (MOKKEDEM, 2004).

I.6.2. Exigences culturales

- La place dans l'assolement :

Il faut éviter les terres infestées de mauvaises herbes ou ayant comme précédent cultural la nigelle de Damas (*Nigella damas*) (MOKKEDEM, 2004).

- Préparation du sol :

Un labour moyen d'une profondeur de 40 à 50 cm est nécessaire (MOKKEDEM, 2004).

- Densité de semis :

La densité de semis est 5 à 10 Kg à l'hectare (MOKKEDEM, 2004).

- Epoque de semis :

Le semis s'effectue d'octobre à décembre.

- Fumure :

On épand 20 Kg par hectare d'ammonitrate, soit 33.5% au premier binage, 20Kg par hectare d'engrais binaire 0-20-25 après le disquage croisé (MOKKEDEM, 2004).



Figure 2 : Aspect morphologique de la plante *Nigella sativa* L (GUIGNARD, 2001).

I.7. Culture de la *Nigella sativa* L en Algérie

La nigelle est très peu cultivée en Algérie, elle est limitée à l'échelle traditionnelle dans les régions de : Ouargla, Biskra, Timimoune, Adrar, Médéa et Skikda (MOKKEDEM, 2004).

I.8. Composition phytochimique de *Nigella sativa* L.

Les plantes de la famille des Renonculacées et notamment l'espèce *Nigella sativa* L. ont bénéficié de nombreuses études phytochimiques. Les parties de la plante utilisées en phytothérapie sont les graines. Le premier rapport sur la composition des graines de *N. sativa* L. fut publié en 1880 par GREENISH.

I.8.1. Composition générale

La composition générale des graines de *Nigella sativa* L. montre une teneur relativement importante en glucides (33-34 %), en lipides avec (30-35 %) et en protéines avec (16- 21%).

Une approximation de la composition chimique est donnée dans le **tableau 03** :

Tableau 03 : Composition des graines de *Nigella sativa* L (ANSARI, 1988 ; ALJASSIR, 1992).

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

1.8.1.1. Protéines

Les graines de *Nigella sativa* L. contiennent en moyenne 18% de protéines, sont composées de 18 acides aminés dont 8 sont des acides aminés essentiels et 10 acides aminés non essentiels. L'acide aminé majeur est l'acide glutamique, suivi par l'arginine, l'acide aspartique, la leucine et la glycine. (**Tableau 4**)

Tableau 4 : Répartition en acides aminés des protéines de graines de *Nigella sativa* L.
(NERGIZ et ÜNAL, 1991)

Acides Aminés	% de contribution à l'apport protéique
Acides aminés essentiels (AAE)	
Leucine	5,82
Valine	4,61
Lysine	4,04
Thréonine	3,65
Phénylalanine	3,61
Isoleucine	3,46
Histidine	3,35
Méthionine	1,65
Acides aminés non essentiels (AANE)	
acide glutamique	24,74
arginine	9,19
acide aspartique	8,94
glycine	5,61
proline	4,90
sérine	4,31
alanine	3,73
tyrosine	3,59
ammonium	2,84
cystine	1,96

1.8.1.2. Vitamines et Sels minéraux

La composition de *Nigella sativa* L. révèle la présence de teneurs intéressantes en vitamines B1, B2, B6, PP et en acide folique (NERGIZ et OTLES, 2003).

Les tocophérols (vitamine E) totaux constituent 0,05% de l'huile, et sont constitués majoritairement de l' α -tocophérol (48%) et du γ -tocophérol (28%). D'autres vitamines ont pu également être identifiées : les vitamines liposolubles, la vitamine A (0,05%) et la vitamine K (0,1%) (RAMDAN et MORSEL, 2002).

Des travaux sur la composition minérale de la graine de *N. 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 (**NERGIZ et OTLES, 1993**), la teneur des graines en sélénium a été également déterminée, elle représente 0,27-0,54 mg/kg des graines (**AL-SALEH et al 2006**).

1.8.2.. Composés du métabolite secondaire

Un métabolite secondaire est une molécule qui, par exclusion, n'appartient pas au métabolisme primaire classique (glucides, protides, lipides), Ce dernier représente une source importante de molécules utilisables par l'Homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire.

1.8.2.1.. Poly phénols et flavonoïdes

Les poly phénols de *Nigella sativa* sont les plus actifs pharmacologiquement. A partir de l'huile, constituants ont été isolés et identifiés structuralement par HPLC, la thymoquinone, le dithymoquinone, lethymohydroquinone et le thymol (**GHEDIRA, 2006**).

Parmi les polyphénols, les flavonoïdes représentent une très large gamme de composés naturels, et sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux, dont plusieurs sont responsables de couleur vive des fleurs, des fruits et des feuilles.

En 1997, Metfort a été le premier scientifique à isoler et déterminer la structure de trois nouveaux flavonoïdes à partir des graines de *N. sativa* (**MEREFORT et al, 1997**).

1.8.2.2. Saponosides

Les saponosides forment une classe particulière de terpénoïdes constituée d'hétérosides de triterpènes ou de stérols. Ils sont largement distribués dans les végétaux. Solubles dans l'eau, ils libèrent par hydrolyse un ou plusieurs oses et une génine (ou aglycone), en formant une solution moussante ce qui explique leur propriété tensioactive.

La première saponine de *Nigella sativa* fut isolée au XIX^{ème} siècle par Greenisch en 1882 et nommée mélanthine, dont l'aglycone est l'hédéragénine.

Depuis, plusieurs autres saponosides apparentées à l' α -hédérine ont été isolées. Les graines de Nigelle renferment plusieurs saponosides dont la génine est toujours l'hédéragénine, une génine triterpénique. Ces saponosides peuvent contenir 2, 3 ou 6 sucres.

1.8.2.3. Alcaloïdes

Les alcaloïdes, composés azotés basiques, sont des substances organiques d'origine naturelle, le plus souvent végétales. Ils ont une structure complexe, avec un atome d'azote inclus dans un hétérocycle. Ils existent sous la forme soluble, de sels ou sous celle de combinaison avec les tannins. A faibles doses, certains présentent des activités thérapeutiques mais à fortes doses, ils peuvent être très toxiques. Les principaux alcaloïdes extraits des graines de *N. sativa* sont **(RAHMAN et al, 1985)**.

- La nigellicine et la nigellidine, avec un noyau indazolique.
- L'isoquinone nigellimine et sa dérivée la nigellimineN-oxyde.
- Huit alcaloïdes diterpéniques type-dolabellane, mis en évidence sous le nom de nigellamine A1, A2, A3, A4, B1, B2, C **(ATTA-UR-RAHMAN et al, 1985)** **(MORIKAWA et al, 2004)**

I.8.3. L'huile

I.8.3. 1. Huile fixe

L'huile fixe représente 37,9-39,2% du poids de la graine. Elle est composée majoritairement de triacylglycérols (57,5 à 63,2%) et d'une grande proportion d'acides gras libres : 8,3 à 14,2% (ceci à cause de la présence de lipase). L'acide linoléique est le principal acide gras libre présent à hauteur de 49 à 59% suivi par l'acide oléique, alors que l'acide gras saturé majoritaire est l'acide palmitique **(ORSI-LINARES, 2005)**.

La présence d'autres acides gras ; myristoléique, palmitoléique, margarique, arachidique, eicosénoïque, behénique, lignocérique a également été détectée **(CHEIKH-ROUHOU, 2008)**.

Cette huile renferme également des phospholipides (Phosphatidyl choline, Phosphatidyl éthanolamine, Phosphatidyl sérine, Phosphatidyl inositol, Lysophosphatidyl choline, Phosphatidyl glycérol, Lysophosphatidyl éthanolamine), des glycolipides et des stérols.

L'huile de la Nigelle est riche en stérols (17,41-42,66% de la matière insaponifiable), dont le β -sitostérol est le plus abondant (44-54%), suivi par le stigmastérol (16.57–20.92%), Δ 7-stigmastérol, Δ 7-avenastérol et le cholestérol qui sont également détectés mais à des taux plus faibles **(CHEIKH-ROUHOU, 2008)**.

L'huile de Nigelle ne contient que peu de tocophérols (vitamine E), comparée à d'autres huiles végétales. La particularité de l'huile de *Nigella sativa L.* est la présence de quinones : thymoquinone et thymohydroquinone ; et d'un composé phénolique : le thymol. Ces quinones sont les composés actifs de l'huile de Nigelle qui lui confèrent d'importantes propriétés pharmacologiques. Elles sont en

outre des marqueurs de l'huile essentielle, la thymoquinone étant parfois l'un des constituants majoritaires (**ORSI-LINARES, 2005**).

I.8.3. 2. Huile essentielle

L'huile essentielle de Nigelle s'obtient entre autre par distillation à la vapeur d'eau de l'huile végétale obtenue par première pression à froid. Sa composition peut varier énormément suivant les pratiques culturelles de la plante, les conditions environnementales et les différents procédés d'obtentions. Il existe donc plusieurs « chimiotypes » selon la localisation géographique.

L'huile essentielle de *N. sativa L.* représente entre 1,4-1,9% du poids de l'huile fixe et 0,18 à 0,50% du poids des graines (**BENKACI et al 2007**).

L'analyse de cette huile par CPG-SM réalisée par l'équipe de **BUCAR (2000)** a permis d'identifier 32 composants, dont la majorité d'entre eux sont ; la thymoquinone (27,8%-57 %), p-cymène (7,07-15,83 %), carvacrol (5,8-11,6 %), longifolène (1,2-8 %), 4-terpinol (1,98-6,59 %), et le tanéthol (0,25- 4,28 %) (**BURITS et al, 2000**).

L'huile essentielle de *N. sativa L.* cultivée au Sahara algérien (Timimoune et Adrar), et extraite selon deux méthodes différentes ; l'hydro distillation et distillation par micro-onde a été analysée par CPG et CPG-SM (**Chromatographie en phase gazeuse - Spectrométrie de Masse** par **BENKACIE et al (2006)**). Ils ont identifié et caractérisé 112 composés ont été identifié. Le p-cymène représente le composé le plus abondant, suivi de la thymoquinone.

I.9. Toxicité

La toxicité est évaluée par la mesure de la dose létale 50 (DL50). Elle mesure la dose de substance causant la mort de 50% d'une population animale donnée (souvent des souris ou des rats) dans des conditions d'expérimentation précises. Elle s'exprime en mg de matière active par kg d'animal. Plus ce chiffre est petit, plus la substance est toxique.

Des travaux entrepris par une équipe iranienne ont été publiés en 2005. Ils ont évalué les effets aigus et subaigus de la toxicité éventuelle des graines de *Nigella sativa L.* des extraits aqueux, méthanoliques et chloroformiques de la plante.

Dans cette étude, les extraits ont été administrés par voie orale, à 4 doses différentes : 6, 9, 14 et 21 g/kg. Le taux de mortalité et la variation du poids ont été mesurés durant 3 et 7 jours respectivement. Aucune mortalité n'a été enregistrée, quelle que soit la dose considérée dans les conditions du protocole évoqué. Les extraits méthanoliques (toutes doses) et

chloroformiques (21 g/kg) ont réduit de manière significative le poids des animaux. La toxicité hépatique a également été examinée par une étude histologique notamment.

Elle a révélé des phénomènes dégénératifs au niveau des cellules hépatiques uniquement pour les extraits aqueux. Les auteurs de cette étude ont conclu que les extraits ci-dessus mentionnés sont relativement dépourvus de toxicité dans le cadre d'une épreuve de toxicité aiguë, mais qu'il faut prendre en considération les lésions hépatiques générées par les extraits aqueux (VAHDATI-MASHHADIAN, 2005)

I.10. L'utilisation de *Nigella sativa* L. dans le domaine d'alimentation diététique.

I.10.1. Définition de diététique

On peut définir la diététique comme une science consacrée à la connaissance des aliments et leur devenir dans l'organisme. Sa finalité est de maintenir l'« équilibre » et d'assurer la meilleure santé et la meilleure qualité de vie le plus longtemps possible. C'est une mise en page de l'alimentation au service de la santé. Elle peut aussi être définie comme un art de vivre heureux et longtemps grâce à ce que l'on mange. Elle a inspiré la diététique médicale et a été déclinée en « diète » qui correspond à l'emploi raisonné de l'alimentation au service d'un régime de nourriture. « Diète » et « régime » sont utilisés indifféremment selon les périodes de l'histoire, de la vie et de l'état de santé. (SCHLIENGER, 2014)

I.10.2. Valeur nutritionnelle de *Nigella sativa* L.

De par ses teneurs en vitamines B, minéraux, lipides et par la qualité de ses protéines, la graine de Nigelle constitue une bonne source complémentaire de nutriments essentiels. Son incorporation dans les aliments pour améliorer leur valeur nutritionnelle est tout à fait intéressante.

En 1997 des travaux réalisés en Jordanie évaluaient l'intérêt nutritionnel des graines de Nigelle provenant de différents pays (Inde, Syrie, Turquie, Jordanie) :

- **En vitamines :**

Dans l'étude de la composition chimique nous faisons remarquer la richesse des graines en vitamines du groupe B : B2, B3, B6 et particulièrement B1. ·

- **En minéraux :**

Comparée à d'autres graines oléagineuses telles que noisettes, amandes, pistaches...la graine de Nigelle à une teneur particulièrement intéressante en fer, zinc et phosphore. ·

- **En protéines :**

la graine de Nigelle représente une bonne source qualitative et quantitative de protéines. (TAKRURI H et DAMEH, 1998)

I.10.2.1. Comparaison par rapport à d'autres graines oléagineuses :

Les graines de Nigelle sont plus riches en fibres et en glucides, par contre elles possèdent la moindre teneur en lipides et un faible apport calorique. (Tableau 5) .

Tableau 5 : Comparaison de la composition des graines de Nigelle avec celle d'autres graines oléagineuses, calculée sur 1kg de matière sèche. (TAKRURI H et DAMEH , 1998)

Graines	protéine en g	lipides en g	glucides en g	fibres en g	cendres en g	Energie en kcal
Amandes	195	567	177	28	32	6750
Pistaches	213	572	165	20	29	6770
Sésames	212	545	147	53	43	6590
tournesol	266	479	154	59	43	6260
Nigelle	216	406	249	84	45	5510

I.11. Propriétés

I.11.1. Propriétés spasmolytiques

L'huile essentielle à une concentration efficace médiane de 46 à 74 mg /L, provoque *in vitro* la relaxation de la trachée et de l'iléon isolés de cobaye (REITER ET BRANDT, 1985).

I.11.2. Propriétés hépato protectrices

Des études ont démontré l'effet antioxydant de la thymoquinone. Les dommages hépatiques produits par le tétrachlorure de carbone sur des souris ont été inhibés par une dose unique de thymoquinone à 100 mg/kg. Le ralentissement de la peroxydation lipidique explique l'effet antioxydant de la thymoquinone (**EL-DAKHAKHNY, M. et al, 2000**).

I.11.3. Propriétés anticholestérolémiantes

Une diminution significative des taux sanguins de cholestérol, LDL et triglycérides, et une augmentation des HDL sanguins ont été observées chez des rats dont l'alimentation a été enrichie en huile de nigelle à hauteur de 800 mg/kg pendant 4 semaines (**EL-DAKHAKHNY et al, 2000**).

I.11.4. Propriétés analgésiques et anti-inflammatoires

Des recherches sur l'activité anti-inflammatoire de la thymoquinone et de l'huile de nigelle sur des lymphocytes isolés du péritoine de rat, ont montré l'activité inhibitrice des cyclooxygénases et de la 5-hydroxylipoxycgénase (**HOUGHTON et al, 1995**). Des propriétés antihistaminiques ont été observées avec la nigelle (**CHAKRAVARTY, 1993**). Une activité analgésique a été observée chez des souris absorbant des graines, de l'huile ou de la thymoquinone (**KHANNA, 1993**).

I.11.5. Propriétés anthelminthiques

Les graines et la fraction hétérosidique sont de très puissants anti-cestodes, contrairement aux saponosides qui sont inactifs (**AKHTAR et ASLAM, 1997**), (**AGGARWAL, 1979**). Il a été démontré chez l'enfant qu'une dose unique de graines à 40 mg/kg, ou bien la quantité équivalente en extrait éthanolique, paralyse le ver solitaire (**AKHTAR et RIFFAT, 1991**).

I.11.6. propriétés gastro protectrices

L'huile de nigelle réduit la formation d'ulcères gastriques induits par l'éthanol chez le rat (**EL-DAKHAKHNY, M. et al, 2000**).

I.11.7. Propriétés antimicrobiennes

L'huile végétale, l'huile essentielle et la thymoquinone ont des activités antimicrobiennes vis-à-vis de nombreuses bactéries résistantes aux antibiotiques et vis-à-vis

de *Staphylococcus aureus*, *Shigella* spp, *Vibrio cholerae* et *Escherichia coli*. (**ABOUL et al, 1996**).

I.11.8. Propriétés antitumorales

La thymoquinone potentialise les fonctions détoxifiantes du foie, de ce fait elle augmente le taux de glutathion et réduit les tumeurs (**BADARY, 1999**). De plus, avec la dithymoquinone et des extraits éthanoliques de la graine, elle est cytotoxique pour les cellules tumorales résistantes aux cytostatiques. Des extraits de graines de nigelle réduisent le développement et la croissance des cellules tumorales (**SALOMI, 1991**).

I.11.9. Autres propriétés

Des études ont montré l'effet diurétique et l'effet antihypertenseur de l'huile essentielle et de la thymoquinone (**ZAOUI, 2000**).

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

II.1 Lieu du stage

Dans le cadre de la valorisation et de la recherche d'éventuelles activités biologique de la plante *Nigelle sativa L* .provenant de la région La zone Jiddah (ville de la région du Hejaz en Arabie Saoudite), nous avons mené une étude expérimentale au sein :

- Du laboratoire privé (situé dans la région Ouled Yaïch (ville Blida)): Extraction des huiles essentielles
- Des laboratoires de pharmacotoxicologie et de microbiologie du CRD (SAIDAL) : Screening phytochimique, dosage des poly phénols et des flavonoïdes et évaluation deux activités biologiques (activité antioxydante et activité antimicrobienne)

Durant une période s'étalant du mois d'Avril jusqu'au mois de Juin 2021

Remarque : Durant notre stage ont pas pu accomplir la dernière partie car on a trouvé beaucoup de problèmes pour la réaliser.

II-2. Choix, localisation et climatologie de la station d'étude

A- Choix et localisation

Le choix de la station est basé sur des critères écologiques (climat, sol, précipitations et altitude). Ces derniers ont une influence sur le développement de la plante, sur les métabolites secondaires surtout sur les polyphénols et les flavonoïdes et sur les activités biologiques des graines.

Nous avons acheté la graines d'un herboriste localisé dans la commune d'Ouled Yaïch située au centre de la wilaya de Blida, à environ 4 km au nord-est de Blida et à environ 42 km au sud-ouest d'Alger. et à environ 29 km au nord-est de Médéa. Selon l'herboriste la récolte des graines a été réalisée au sein de la ville de Jiddah

La zone Jiddah est une ville de la région du Hejaz en Arabie Saoudite et le centre commercial du pays, située à seulement 65 kilomètres à l'est, tandis que Medina, la deuxième ville la plus sainte, est située à 360 kilomètres au nord.

La localisation géographique avec la texture du sol des deux stations d'étude est donnée dans **le tableau 6**

Tableau 6 : Localisation et texture du sol de la station d'étude.

Station	Texteur de sol	Latitude	longitude	Altitude(m)
Jiddah	sols secs, sableux, labour moyen	21°15'00'' et 21°55'00'' Nord	39°00'00'' et 39°30'00'' E	12

B- Climatologie de la zone d'étude

La station de Jiddah se caractérise par un Climat sec est plutôt chaud, aride et désertique et t les pluies sont très rares.

C- Précipitations et températures

La précipitation est la quantité d'eau météorique totale, liquide (Pluie, brouillard, rosée) ou solide (neige, grêle...) qui tombe sur une surface horizontale. L'étude des précipitations est très importante, elle permet de déterminer la part d'eau qui parvient pour l'alimentation des ressources souterraines.

La température est un facteur important, elle régit l'évaporation et influence ainsi la variation des réserves d'eau souterraine.

D- Indice d'aridité de DERMARTONNE

En se basant sur le régime des précipitations et des températures, DEMARTONNE (1923) a défini un indice d'aridité (A) $A = P/T + 10$

P : Précipitation moyennes annuelles (mm).

T : Températures moyennes annuelles (°C).

La station d'Arabie Saoudite (Jeddah), les températures et les précipitations moyennes annuelles sont respectivement : $T = 31.16^{\circ}\text{C}$ et $P = 0.25$ mm. Il en résulte un indice d'aridité de DERMARTONNE est de 10.

En conséquence On conclue que le climat de la région de Jeddah est de type hyper-aride.

II.3. Matériel

II.3.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude correspond à des graines de l'espèce *Nigella sativa* L récoltée durant le mois de mai dans la région de Jeddah (**Figure 4**)

Figure 4: *Nigella sativa* L (fleurs, graines).

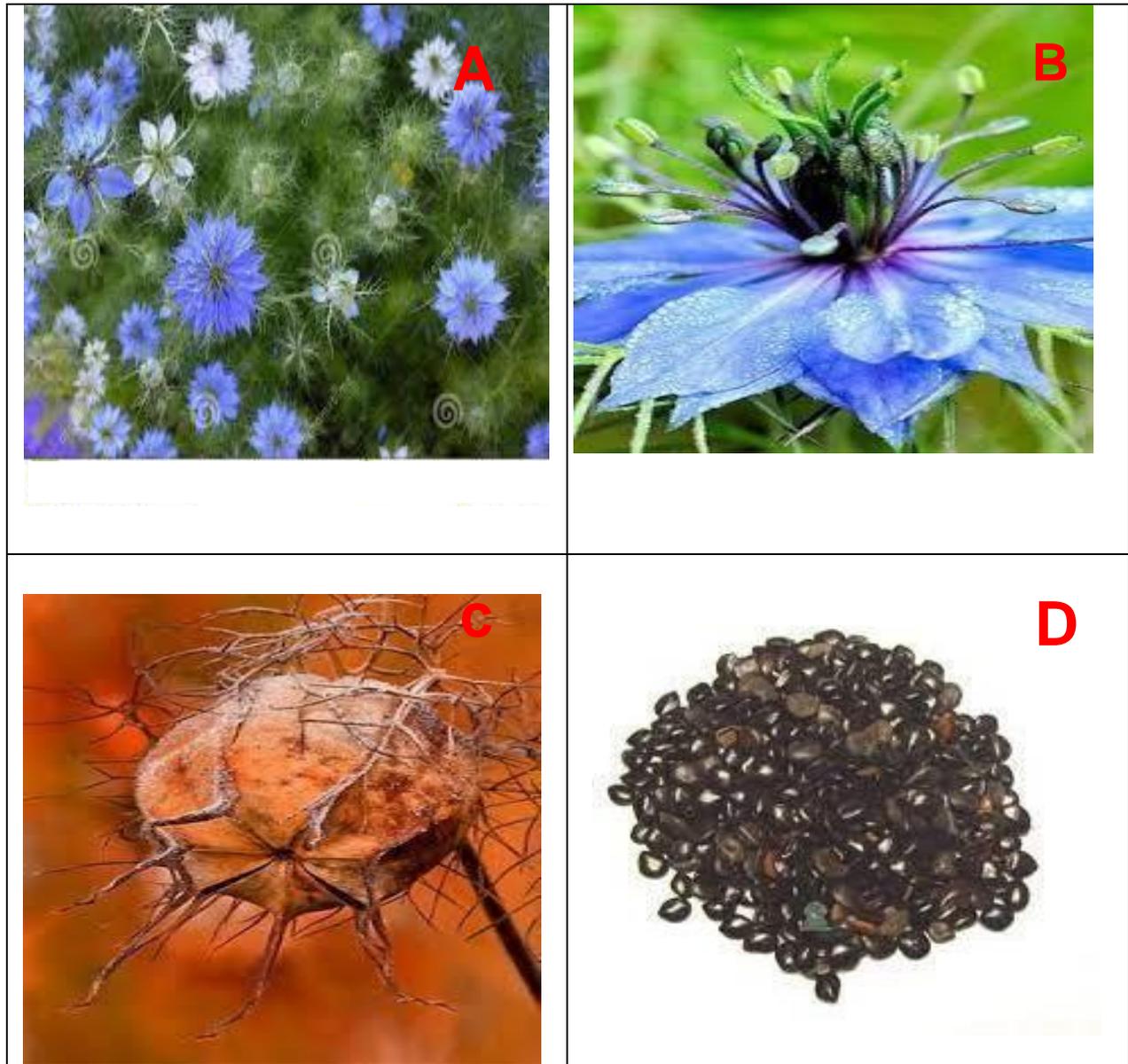




Figure 4: *Nigella sativa L* (fleurs : A, B et graines : C, D et E).

Photos A, B et C prises dans la région de Timimoun (Terres sélectionnés et cultivés par les plantes *Nigella sativa L*)

II.3.2. Matériel Microbien

Afin d'étudier le pouvoir antimicrobien des extraits des essentielle de *Nigella sativa L*. nous avons utilisé 04 souches bactériennes et deux souches fongiques. Toutes les souches proviennent de la collection Américaine de type ATCC et elles proviennent du laboratoire de Microbiologie du centre de recherche et développement CRD / SAIDAL. (**Tableau 7**)

Tableau 7: Microorganismes-cible utilisés et les principales maladies qu'ils peuvent causées

	Microorganismes	Collection ATCC*	Principales maladies pouvant être causées par ces germes
Gram+	<i>Bacillus subtilis</i>	6633	- Intoxications alimentaires, vomissements et diarrhées, septicémie (rare)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	- Septicémie, toxi-infections alimentaires et entérocolites aiguës, inflammations locales et formation du pus et furoncles (infections cutaneo-muqueuses), entérites, vulvites (inflammation de l'épithélium vulvo-vaginal)
Gram-	<i>Pseudomonas aerogenosa</i>	9027	Septicémie, infections urinaires, respiratoires, digestives, de la peau, de l'œil, de l'oreille et du système nerveux, abcès, endocardites
	<i>Escherichia coli</i>	8739	Septicémie, infections urinaires, génitales, hépatobiliaires ou digestives,

			éningites, cholécystites et appendicites entérites, toxi-infections alimentaires, diarrhées et vomissements
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		- Septicémie, infections broncho-pulmonaires secondaires à grippe, différentes infections (bronchite, pleurales, otites et angines), abcès
Champignons	<i>Saccaromyces cerevisiae</i>	10231	aggravait l'inflammation intestinale la maladie de Crohn
	<i>Aspergillus niger</i>	9763	L'aspergillose bronchopulmonaire allergique, l'aspergillome et l'aspergillose invasive. L'aspergillose se développe principalement chez les personnes immunodéprimées.

ATCC*: American Type Collection Culture.

II.4. Méthodes

II.4.1. Extraction des huiles essentielles

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par la méthode d'hydrodistillation.

A. Principe de la méthode

La plante contenant l'huile essentielle recherchée est immergée dans un volume d'eau, le tout, contenu dans un ballon, est porté à ébullition. En s'évaporant, l'eau entraîne les composés volatils de l'huile essentielle recherchée, les vapeurs se condensent ensuite dans le réfrigérant et s'écoulent à l'état liquide dans un récipient où elles forment le distillant.

En général, le distillant fait apparaître deux phases non mixibles : les huiles essentielles et l'eau (BRUNETON, 1999).

B. Mode opératoire de l'hydro distillation

Nous avons pris 50g de matière végétale sèche que nous avons ciselée afin de faciliter son introduction dans un ballon de 1000mL remplie de 500mL d'eau distillée. Le ballon est chauffé à l'aide d'une chauffe ballon, pendant 3 heures, ceci engendre la formation de vapeurs. Ces vapeurs s'élèvent et passent dans un réfrigérant qui est constamment refroidi.

Au contact des parois refroidies du réfrigérant, les vapeurs chaudes se condensent et s'écoulent à l'état liquide, goutte à goutte, dans le tube gradué de clevenger, ou elles forment de distillat. Ce dernier est un mélange de deux phases non mixible qui sont séparées l'une de l'autre par le robinet de clevenger .(FIGURE 5)



- 1 Réfrigérant à balle
- 2 Matière végétale sèche + eau distille
- 3 Chauffe ballon

Figure 5 Dispositif de l'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation (clevenger).

B. Conservation des huiles essentielles :

Ce sont des produits très altérables (changements de couleur), qui s'oxydent rapidement (produit devenant acide, donc irritants hors de prise) (**Charpentiretal, 2004**), ce qui modifie leurs propriétés si elles ne sont pas enfermées dans des flacons appropriés en acier inoxydable, en verre teinté ou aluminium à l'abri de la lumière et de la chaleur. Ces flacons doivent être sèches et propres pour éviter les contaminations (**Valnet, 1983**), donc les huiles essentielles obtenus ont été récupérées dans de petits flacons, puis conservées au réfrigérateur à 4°C.

D. Détermination du rendement en huile essentielle

Le rendement en huile essentielle est déterminé par le rapport entre la masse d'huile essentielle extraite et la matière végétale traitée. Il est exprimé en pourcentage et calculé selon la formule suivante :

$$R = V/M \times 100$$

R : Rendement en huile essentielle (%).

V : Volume obtenu d'huile essentielle (ml).

M : poids de la matière sèche (g).

II.4.2 Préparation des extraits

A-Extrait aqueux

Nous avons mélangé 20g de poudre dans 100ml d'eau distillée bouillie puis laissée 20 min pour infusion avec agitation de temps en temps. L'extrait aqueux obtenu est ensuite centrifugé à 1000 tours/min pendant 10 minutes pour débarrasser des débris puis filtré sur papier filtre de type wattman de type wattman N=°3. Le filtrat est recueilli dans des petits flacons en verre. (PHARMACOPEE EUROPEENNE, 2001).



Figure 6 : graines entières et graines broyées par un mixeur électrique

B. Extrait méthanolique

Suivant le protocole d'extraction décrit par (OWEN et al, 2003) et légèrement modifié. Le matériel végétal broyé (20 g) est soumis à une extraction par macération dans le

mélange méthanol / eau (80/20 : v/v) pendant 72 heures avec renouvellement de solvant chaque 24 heures sous agitation à température ambiante. La solution est ensuite filtrée avec un papier filtre de type wattman n°3. Le marc résiduel a subi une deuxième et une troisième extraction avec le même solvant. Après filtration, les filtrats obtenus sont évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif pendant 60min à une température de 60°C.

L'extrait sec est pesé pour le calcul de rendement. Ce dernier est exprimé en pourcentage selon la formule suivante :

$$R \% = (PES / PE) \times 100$$

R % : rendement en pourcentage

PES : poids de l'extrait sec (g)

PE : poids de l'échantillon poudre (g)

II.4.3. Screening phytochimique

Il englobe une série de méthodes colorimétriques qui permettent d'établir la présence ou l'absence de métabolites secondaires dans la plante à partir de sa poudre ou de l'infusé. Le screening aide à chercher : les anthocyanes, les leuco-anthocyanes, les tannins totaux, les irridioïdes, les tannins galliques les tannins cathéchiques, les alcaloïdes, les flavonoïdes, les sénosides, les quinones, les coumarines et les mucilages. **Le tableau 8** montre la méthode appliquée à la recherche de chacun de ces métabolites secondaires.

Tableau 8 : Screening phytochimique (HARBORNE, 1998 ; RAAMAN *et al.* 2006).

Métabolites secondaires	Méthodes	Résultat
Anthocyanes	5ml d'infusé + quelques gouttes d'HCL.	Coloration rouge
Leuco-anthocyanes	2 g de poudre+ 20 ml de propanol / acide chlorhydrique (1/1). Porter à ébullition au bain marie	Coloration rouge
Tanins totaux	5ml d'infusé + quelques gouttes de FeCl ₃	Coloration bleue noire
Tanins galliques	1ml d'infusé + 2g d'acétate desodium+quelques gouttes de FeCl ₃ .	Coloration bleu foncé
Alcaloïdes	5g de poudre + 50 ml d'ether : chloroforme 3/1 Filtrer après 24h puis épuiser avec du HCL.	Précipité rouge
Flavonoïdes	À 5 ml d'infusé + 5 ml d'acide chlorhydrique + un coupon de Zinc +1 ml d'alcool iso-amylique.	Coloration rouge orangé
Sénosides	2,5 g de poudre + 50 ml d'eau distillée + 2 ml d'acide	Coloration violette

	chlorhydrique concentré. Chauffer Pendant 15 min+40 ml d'éther. La couche étherée est séparée, séchée avec le sulfate de sodium anhydre, évaporée+ 5 ml d'ammoniaque diluée (1/2) au résidu refroidi	rouge
Quinones	Humecter 2 g de poudre par 2 ml d'acide chlorhydrique+ 20 ml de chloroforme. Après 3 heures, le filtrat est agité avec 5 ml d'ammoniaque (1/2).	Coloration rouge
Coumarines	Faire bouillir à reflux 2 g de poudre dans 20 ml d'éthanol pendant 15 minutes. 5 ml du filtrat + 10 gouttes d'hydroxyde de potassium à 10 % + quelques gouttes d'acide chlorhydrique à 10 %.	Formation d'un trouble
Mucilages	5 ml d'éthanol absolu sont ajoutés à 1 ml d'infusé. Le mélange est incubé pendant 15 minutes.	Précipité floconneux
Saponines	Test de la mousse : l'extrait est repris dans 5ml d'eau distillée, puis introduit dans un tube à essai. Le tube est agité vigoureusement,	la formation d'une mousse (hauteur supérieur de 1cm) stable et persistante pendant 15min, indique la présence des saponines
Glycosides	On mélange 2g de poudre de la plante avec quelques gouttes d'acide sulfurique (H ₂ SO ₄) concentré (96%)	Apparition d'une couleur rouge-bleu.
Saponosides	A 2 ml d'infusé, on ajoute quelques gouttes d'acétate de plomb.	Formation d'un précipité blanc.
Stérols ou triterpènes	L'extrait de l'éther de pétrole est dilué dans 2ml d'anhydride acétique. L'ajout de quelques gouttes d'acide sulfurique concentré permet l'apparition d'une coloration violette qui indique	une coloration verte qui indique la présence de stérols.

II.4.4. Caractérisation quantitative des extraits

II.4.4.1. Dosage des Poly-phénols et flavonoïdes

A-Poly-phénols

But : La détermination de la teneur en poly-phénols totaux dans l'extrait des graines *Nigella sativa L.* par la méthode Spectrophotométrie UV- Vis selon la méthode au réactif de Folin Ciocalteu (SINGLETON *et al*, 1999).

-Principe

Ce dosage est décrit par (SKERGET *et al*, 2005). Basé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans l'extrait. Le réactif de Folin-Ciocalteu consiste en une solution jaune acide contenant un complexe polymérique d'ions (hétéro-polyacides). En milieu alcalin, le réactif de Folin-Ciocalteu, oxyde les phénols en ions phénolates et réduit partiellement ses hétéro- polyacides, d'où la formation d'un complexe bleu.

-Mode opératoire

A 0.2 ml d'EM (avec concentrations convenables : 200µg/ml, 20µg/ml et 2µg/ml) est ajouté 0.8 ml de la solution de Na₂CO₃ (75 mg/ml dans l'eau distillée), après agitation, 1ml de la solution de Folin Ciocalteu (dilué dix fois dans l'eau distillée) est ajouté à l'ensemble, après 2 h d'incubation à la température du laboratoire, l'absorbance est lue à 760 nm contre un blanc sans extrait.

Le taux de poly-phénols totaux dans l'extrait, a été calculé à partir d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y=a \cdot x$) (**figure 7**), établie avec des concentrations précises d'acide gallique (0-0,5 g/l) comme standard de référence, dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en gramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de poudre.

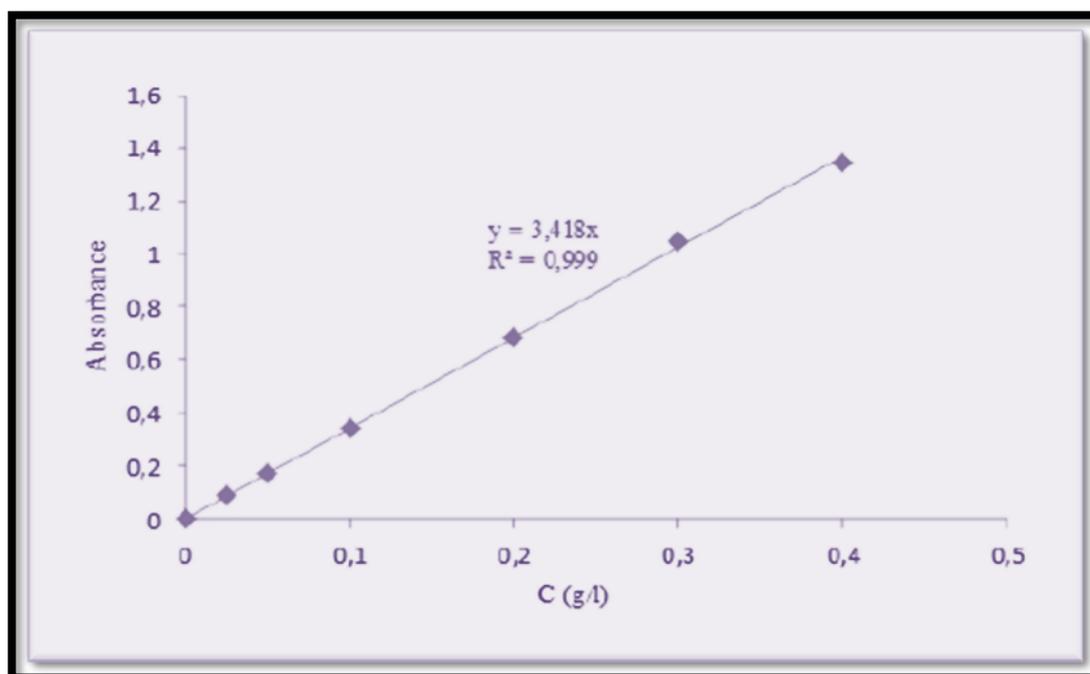


Figure 7 : courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

B. Flavonoïdes

But : Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux de l'extrait de graine de *Nigella sativa L* par La méthode du trichlorure d'aluminium $AlCl_3$ décrite par (YI *et al*, 2008).

-Mode opératoire

1 ml de chaque concentration obtenue par dilutions de l'Eaq de (10mg/mL, 8mg/mL, 6mg/mL, 4mg/mL, 2mg/mL) est ajouté à 1mL de la solution d' $AlCl_3$ (2% dans le méthanol), le mélange est vigoureusement agité. Après 10 min d'incubation, l'absorbance est lue à 430 nm.

Une courbe d'étalonnage ($y=a \cdot x$) (**figure 8**) établie par la quercétine (0-350 $\mu\text{g/ml}$), réalisée dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons, servira à la quantification des flavonoïdes. La teneur en flavonoïdes est exprimée en gramme d'équivalent de quercétine par gramme de poudre.

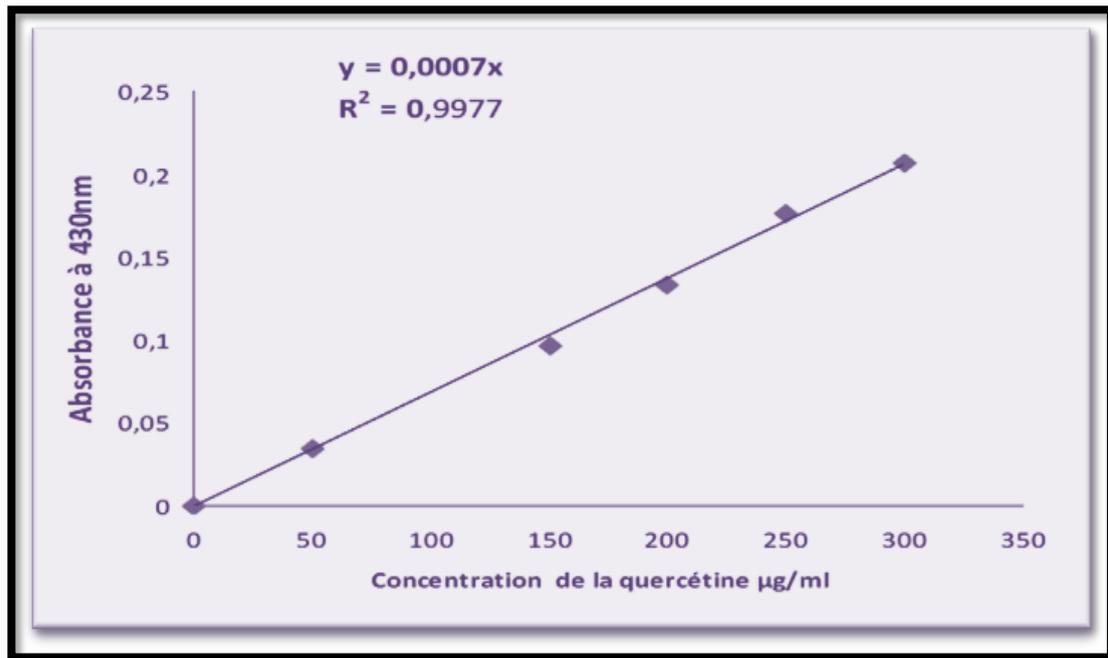


Figure 8 : courbe d'étalonnage de la quercétine

II.4.5. Activité anti-oxydante (in vitro)

Principe : selon (BRAND-WILLIAMS et al, 1995) ; La capacité anti-oxydante peut être aussi mesurée en utilisant des radicaux libres plus stables. Le radical 1, 1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical libre très stable à l'état cristallin et en solution, de coloration violette. Par cette méthode, on considère que l'activité anti-oxydante n'est autre que la capacité des antioxydants d'agir comme piègeur des radicaux libres. Ils agissent en transférant un atome d'hydrogène ce qui conduit à la disparition du DPPH au cours de la réaction et à un changement de coloration (jaune) dans la solution initiale (figure 9).

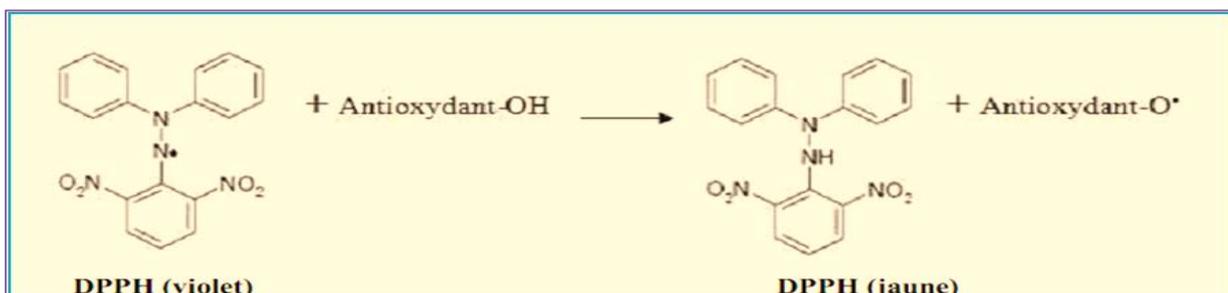


Figure 9 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.

-Mode opératoire :

50 microlitres d'Extrait aqueux de *nigella sativa*L à différentes concentrations (10mg/ml, 8mg/ml, 6 mg/ml, 4mg/ml, 2mg/ml) et d'Extrait méthanolique de concentration

(200µg/ml, 20 µg/ml, 2µg/ml, 0.2µ/ml, 0.02 µg/ml) est ajouté à 5 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,004%).

En parallèle, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 50µL de méthanol avec 5 ml de la solution méthanolique de DPPH.

Egalement le même test a été réalisé dans les mêmes conditions opératoires avec un antioxydant de référence : acide ascorbique.

-Lecture des résultats

La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 516 nm après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à une température ambiante. (GURSOY *et al*, 2012).

L'activité anti-oxydante est estimée selon l'équation suivante :

$$I\% = (AC_{\text{échantillon}} - AE_{\text{contrôle}}) / AC \times 100$$

I% : pourcentage d'inhibition ou d'activité anti radicalaire.

AC contrôle : Absorbance du contrôle.

AE échantillon : Absorbance de l'échantillon.

-IC50

Ce paramètre est défini selon (POKORNY *et al*, 2001) comme la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration initiale de 50%, il est inversement lié à la capacité anti-oxydante

Le paramètre IC50 a été calculé à partir de la courbe de régression linéaire tracée du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait aqueux.

II.4.6. Activité anti bactérienne

II.4.6.1. Préparation des échantillons

Les tests d'activité antimicrobienne : sont réalisés par la technique par contact direct (méthode de diffusion sur gélose en plaque). Nous avons utilisé la méthode harmonisée standard (PHARMACOPEE EUROPEENNE, 2014).

A-technique de diffusion en disques sur gélose en plaque

a-Principe :

Consiste en la mise en contact du microorganisme test dont la densité de l'inoculum est ajustée au spectrophotomètre à une valeur normalisée de 10^7 à 10^8 ufc/ml avec le disque d'antibiotique imprégné de l'huile de nigelle à tester. Dans le cas d'une inhibition positive, il se forme à l'équilibre de diffusion après incubation de 18h à 24h pour les bactéries et 48h à 72h pour les champignons, un halo d'inhibition tout autour du disque. La mesure du diamètre de la zone d'inhibition permet de déterminer l'intensité de cette activité antimicrobienne.

b-La souchothèque du laboratoire :

Nous avons d'abord commencé à établir notre souchothèque à partir de souches de référence de la collection ATCC commercialisées sous-forme de pastilles lyophilisées. Quatre pastilles bactériennes : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* et deux pastilles fongiques: *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans*. La pastille lyophilisée contenant le germe test est reconstituée dans 5 ml de tryptycase soja bouillon (TSB) incubé à 35°C pour les bactéries durant 24h et 25°C pour les champignons durant 48h (phase de reconstitution et d'enrichissement). A partir de cet enrichissement, on procède à un repiquage sur milieu solide (TSA pour les bactéries et SB pour les champignons) à raison d'une boîte de pétri par microorganisme. Puis incubation sous des conditions optimales de croissance comme décrites ci-dessus. A partir de ces cultures jeunes, on prélève une à deux colonies que l'on dépose au fond du tube incliné en faisant des stries tout le long de la gélose inclinée. Les tubes inclinés ainsi obtenus (à raison de cinq tubes inclinés par microorganisme), sont mis à incuber à des conditions optimales de croissance comme décrits précédemment. Notre souchothèque est conservée au laboratoire à +4°C et sera renouvelée et entretenue après chaque mois de conservation.

c-Préparation de l'inoculum :

A partir d'un tube de conservation décrit ci-dessus, une ou deux colonies sont mises à ensemençer sur milieu solide (TSA pour les bactéries et SB pour les levures) à raison d'une boîte de pétrie par microorganisme et mises à incuber à des conditions de croissances optimales (comme décrits ci-dessus). A partir de ces cultures jeunes de 18h pour les bactéries et 48h pour les levures, nous préparons les suspensions de germes en dissolvant une à deux colonies dans 5 ml d'eau physiologique que l'on ajuste au spectrophotomètre UV/VIS à 620 de façon à obtenir un inoculum de 10^7 à 10^8 correspondant à 0.5 Mac-Farland. Cet inoculum va servir à l'étude de l'activité antimicrobienne.

d- Evaluation qualitative par la méthode de diffusion sur gélose

Cette partie du travail consiste à rechercher une activité antibactérienne au sein de l'huile de *Nigella sativa*. En cas de présence d'une activité, la réponse de cette huile vis-à-vis des microorganismes étudiés est-elle quantifiable ? en d'autres termes, l'étude quantitative pour l'évaluation de la concentration minimale inhibitrice aura-t-elle une incidence sur l'application pratique de cette huile de Nigelle ? enfin plusieurs questions que l'on se peut se poser quant aux applications pratiques de cette huile de nigelle aux propriétés thérapeutiques diverses !

B- Evaluation quantitative de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Cette étude est préalable à l'étape précédente (étude qualitative) pour mesurer et quantifier l'importance et l'intensité de la réponse de l'huile de nigelle aux différents agents infectieux étudiés.

Le Protocole expérimental relatif à l'activité antibactérienne (activités qualitative et quantitative), est donné en annexe...

C- Lecture des antibiogrammes

La lecture des antibiogrammes a été faite par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions au tour des disques à l'aide d'un pied à coulisse. Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des extraits (**MOREIRA et al, 2005**). La sensibilité aux différents extraits est classée selon le diamètre des zones d'inhibition (**Tableau 9**).

Tableau 9: estimation de la sensibilité des souches

Diamètre (mm)	Activité antimicrobienne	Souche
D < 7	Nulle	Résistante
D [7-14]	Faible	Sensible
D [15-19]	Moyenne	Très sensible
D > 20	Forte	Extrêmement sensible

Chapitre III : Résultats et discussions

III.1. Rendement des Huiles essentielles des deux régions :

Les huiles essentielles sont extraites par la méthode d'hydro distillation (Type Clevenger). La moyenne des 03 extractions réalisées a révélé un rendement en huiles essentielle trouvé égale à 0.025% (**Figure 10**)

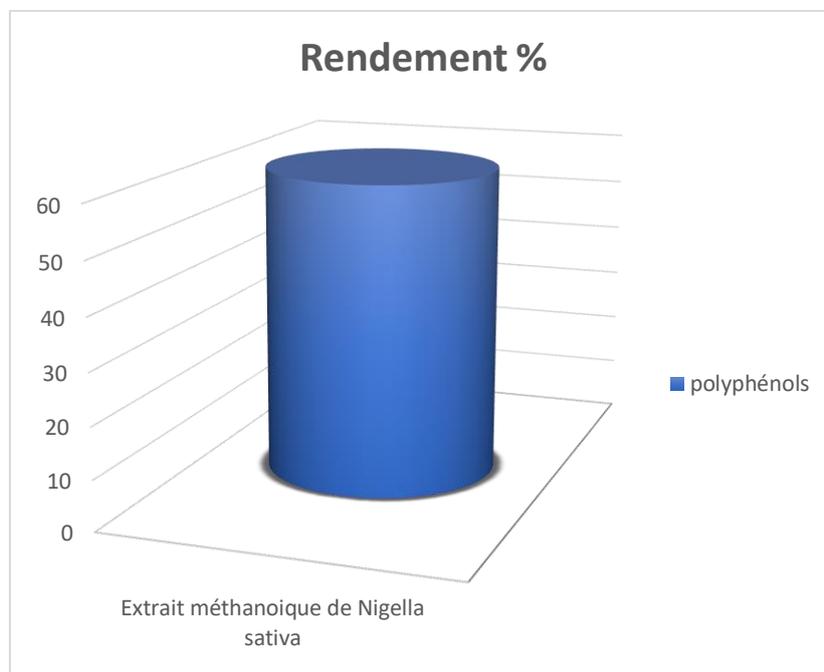


Figure 10 : Rendements de la masse des extraits secs des échantillons *Nigella sativa L* récoltée dans la région de Jiddah

Nos rendements trouvés sont inférieurs à ceux des huiles essentielles extraites à partir des graines de la région de Syrie (0.6% -3% d'huile essentielle) réalisés par **HOSSEINZADEH et PARVARDEH (2004)**.

Les rendements des huiles essentielles sont probablement dus aux facteurs suivants

- Aux conditions pédoclimatiques des deux régions.
- Au degré d'aridité : hyper aride dans la région de Jiddah.
- Aux facteurs génétiques, le stade végétatif et la méthode d'extraction. (**FELLAH et ROMDHAN, 2006**)

- Et aux conditions environnementales (la lumière, la disponibilité des nutriments, et la longueur du jour). (**FELLAH et ROMDHANE, 2006**)

III.2. Screening Phytochimique :

Le screening phytochimique a permis de mettre en évidence la présence des métabolites secondaires au niveau des graines de *Nigella sativa L.* de la région de Jiddah . La découverte

de ses composés est basée sur des essais des solubilités des constituants, des réactions des précipitations et de turbidité et un changement de couleur spécifique.

Un test phytochimique permet l'identification des différentes familles de métabolites secondaires existants dans la partie étudiée de la plante (les alcaloïdes, les flavonoïdes, ...etc.) Par des réactions de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille ainsi que de l'examen en lumière Ultraviolette.

Les résultats sont présentés dans le **Tableau 10**

La mise en évidence la présence des stérols est confirmée par l'apparition d'un anneau avec anhydride acétique, chloroforme et H₂SO₄. Ces stérols sont fortement présents dans les graines de la région de Jiddah.

Le test des tannins révéla la richesse des graines de la région

Les flavonoïdes sont présents dans les graines de *Nigella sativa* L. récoltée dans la région mais avec des quantités élevées. Cette constatation est témoignée par l'apparition d'une coloration jaune plus ou moins intense dans le milieu réactionnelle.

Tableau 10 : Résultats du screening phytochimique de *Nigella sativa* L. récoltée dans la région de Jiddah

Métabolites secondaires	Région de Jiddah
Flavonoïdes	+++
Tannins totaux	+++
Les Stérols	+++
Saponines :	++
Anthocyanes	++
Coumarines	++
Glucosides	-
Terpènes	-
Alcaloïdes	++
Quinones	-

Les alcaloïdes sont confirmés par la présence d'un précipité blanc jaune avec le réactive de Wagner. Ces alcaloïdes se présentent avec une quantité importante dans les graines de la région de Jiddah..

Les saponines, les quinones et les coumarines sont présents avec une quantité importante dans la région de Jiddah. Les terpènes, les anthocyanes et les glycosides sont absents dans les graines de la région

les résultats montrent que cette plante est d'une grande importance, elle est riche en composés phénoliques tel que les tanins et les flavonoïdes qui sont des substances reconnues pour leur propriété anti oxydantes (**HERTOGET *et al*, 1993**).

Cette étude a également montré l'existence d'une réelle biodiversité moléculaire, qui confère à la plante des vertus médicinales importantes à valoriser. Parmi les métabolites secondaires mis en évidence, les flavonoïdes ont un important champ d'action possédant de nombreuses vertus médicinales : antioxydantes (**GRANTO *et al*, 2018**), anti-inflammatoires, inhibiteurs d'enzymes, antiallergiques, anti ulcérogènes, et effets protecteurs vasculaires (**UMESHET *et al*, 2018**), antimicrobiens (**USMAN *et al*, 2018**), antitumoraux, antisécréteurs et antidiarrhéiques (**de SOUZA *et al*, 2018**), hypotenseurs et aphrodisiaques (**RAI *et al*, 2018**). Les tanins avec leurs propriétés de former des complexes avec les protéines, présentant des propriétés antidiarrhéiques, antibactériennes et antifongiques (**DAINGET *et al*, 2017**; **USMAN *et al*, 2018**), et renforcent les vaisseaux sanguins contribuant à l'accumulation de la vitamine C dans l'organisme (**EL-GUENDOZ *et al*, 2017**). Les anthocyanes sont des puissants antioxydants. Les coumarines ont des propriétés antipyrétiques, analgésiques, sédatives, antioœdémateuses et anti-convulsivantes, ainsi qu'une capacité à favoriser l'expulsion des gaz intestinaux entraînant une diminution des ballonnements et des flatulences (**MPONDO *et al*, 2015**). Plusieurs effets biologiques ont été attribués aux saponines. Elles ont des propriétés antioxydantes, antifongiques, antivirales, immunostimulantes, hypocholestérolémiantes et anticancérigènes. Les saponines ont également une incidence importante sur la croissance, la consommation alimentaire et la reproduction chez les animaux (**FRANCIS *et al*, 2002**). De plus, ces métabolites montrent une activité cicatrisante des plaies par activation du processus de cicatrisation (**RAZIKA *et al.*, 2017**). Les coumarines quant à elles, possèdent des propriétés anticoagulantes et antimicrobiennes (**SALVADOR *et al.*, 2018**).

III-3. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes

III-3-1- Dosage des polyphénols

Le dosage des phénols totaux a été effectué par la méthode spectrophotométrique adaptée avec le réactif de Folin-Ciocalteu (**BOUDIAF, 2006**). Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/gES), en

utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique (voir Matériel et Méthodes).

Les résultats des taux des polyphénols de la région sont présentés par le **la figure 10**. La concentration des polyphénols de l'extrait méthanolique de *Nigella sativa L* récoltée dans la région de Jiddah renferme $60 \pm 0,15$ mg EAG/ g d'extrait.

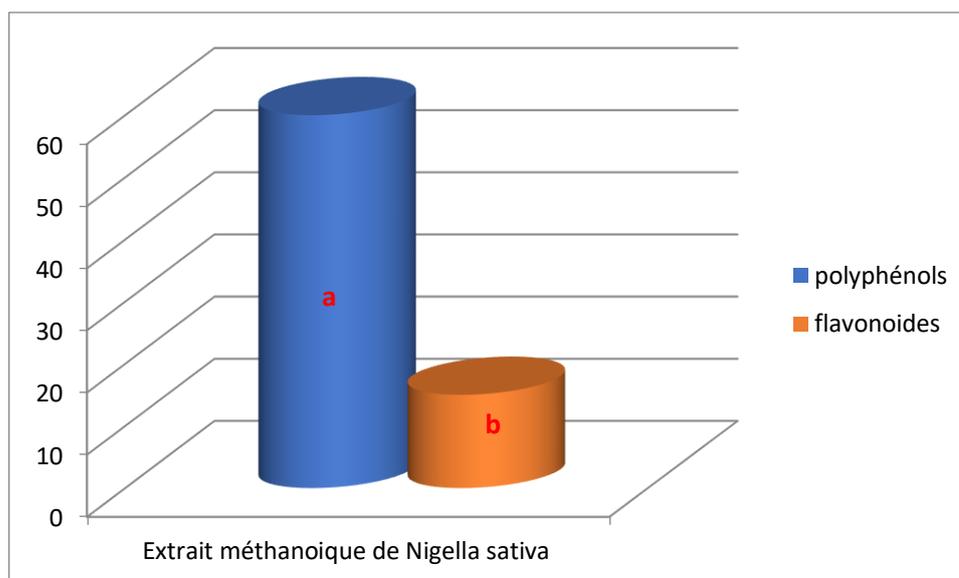
II-5-2-Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par la méthode colorimétrique décrite par (DJERIDAN *et al.*,2006) et (Boudiaf, 2006).La quercétine, considérée comme contrôle positif, a permis de réaliser une courbe d'étalonnage, qui nous a permis de déduire la teneur en flavonoïdes des différentes extrait, exprimée en mg équivalent de quercétine (EQ) par gramme de matière d'extrait sec.

Les résultats des taux des flavonoïdes dans les extraits des deux stations étudiées, sont mentionnés dans **la figure 11**. Nos résultats révèlent une quantité élevée e en flavonoïdes dans la région de Jiddah soit $15 \pm 0,45$ mg EQ / g d'extrait) .

Les valeurs des teneurs en polyphénols et flavonoïdes de la plante *Nigella sativa L*, récoltée dans la station de Jiddah sont élevées à ceux de la littérature. Notamment les travaux de MEZITI *et al* (2012), ont rapportaient une forte teneur en polyphénols (33.64 ± 0.34 mg EAG/g d'extrait Méthanolique) et une teneur faible en flavonoïdes (3.80 ± 0.07 mg EQ / g d'extrait Méthanolique).

MECHRAOUI *et al.* (2018) ont signalé des teneurs faibles en polyphénols et en flavonoïdes dans les extraits méthanoïques des graines récoltées dans d'autres régions de l'Arabie saoudite avec des teneurs respectives de 1.3714 ± 0.0315 mg EAG/g d'extrait Méthanoïque et 0.4418 ± 0.0157 mg EQ / g d'extrait Méthanolique.



(a) mg EAG/g d'extrait Méthanolique

(b) mg EQ/g d'extrait Méthanolique

Figure 11 : Les résultats du dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes condensés dans les extraits méthanoïques de *Nigella sativa L* récoltée dans la région de Jiddah

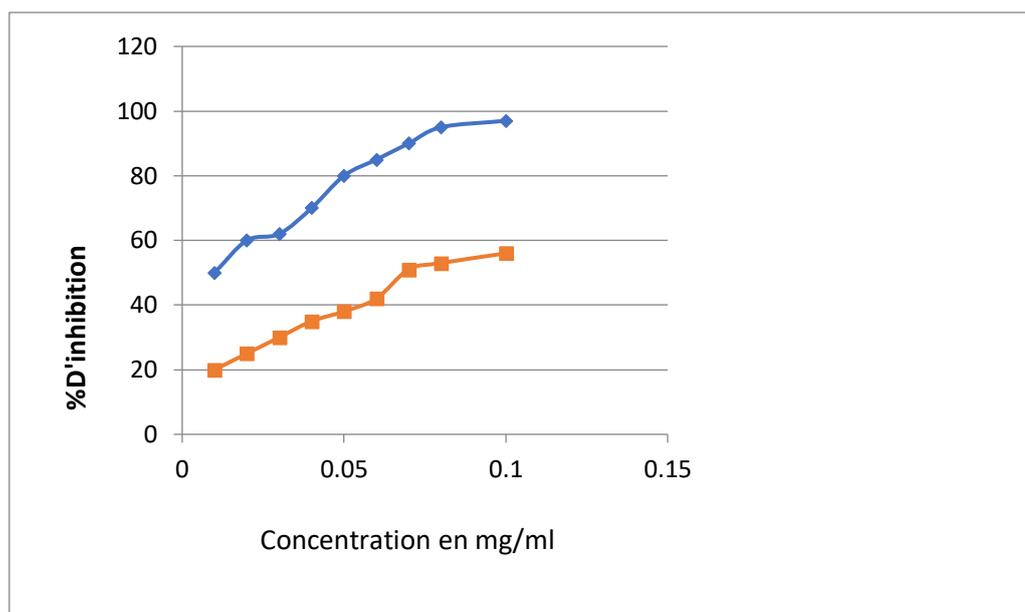
D'autres études réalisées sur les différents extraits de cette plante, ont toujours montré que les extraits par le chloroforme et le méthanol présentent les niveaux les plus élevés en composés phénoliques et flavonoïdes par rapport aux extraits aqueux et héliques (BOUDIAF *et al*, 2010 ; MEZITI *et al*, 2012).

II-3-Activité antioxydante de l'extrait Méthanolique de *Nigella sativa L*.

-Détermination du pourcentage d'inhibition du radical DPPH

Les résultats obtenus lors du test de mesure de pourcentage d'inhibition du radical DPPH (1,1- Diphenyl-2-picrylhydrazyl) sont enregistrés dans les figures 11. Nous constatons que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration pour le BHA (Hydroxyanisole butylé) et pour les extraits Méthanoliques des graines de *Nigella sativa L* récoltée dans la région de Jiddah.

On note que l'efficacité antioxydante augmente avec la concentration des extraits Méthanoliques des graines de *Nigella sativa L* récoltée dans la région. Cependant, le pourcentage d'inhibition du radical libre de l'extrait Méthanolique des graines de *Nigella sativa L* est inférieur à celui de BHA pour toutes les concentrations utilisées. (Figures 12)



BHA : Hydroxyanisole butylé

Figure 12 Pourcentage d'inhibition d'extrait Méthanoliques de *Nigella sativa L* récoltée dans la région de Jiddah (EMG) et de BHA (Hydroxyanisole butylé)

-Détermination d'IC50

L'IC50 est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé. Elle exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50 %. Plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande

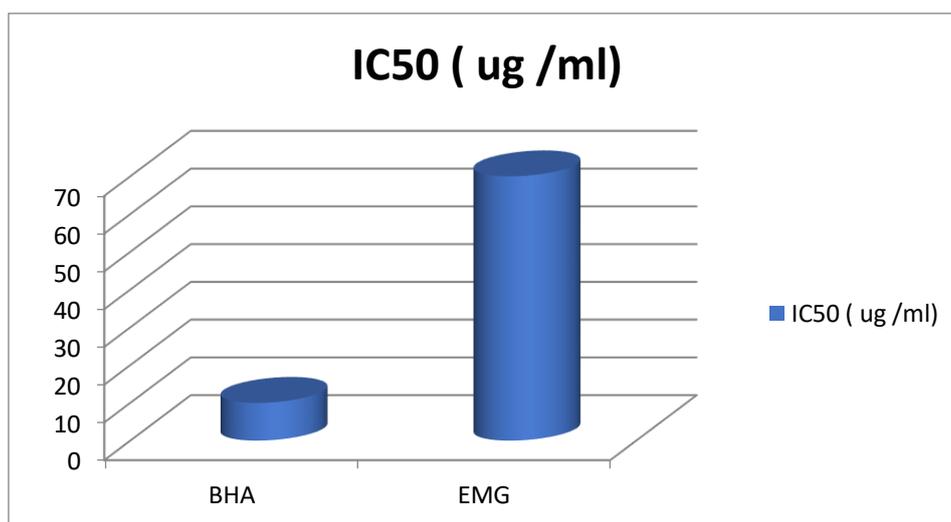
Les valeurs d'IC50 de BHA (Hydroxyanisole butylé) et d'extrait Méthanolique de *Nigella sativa L* récoltée dans la région de Jiddah sont indiquées dans **la figure 13**.

L'extrait Méthanolique des graines de *Nigella sativa L* récoltée dans la région de Jiddah pouvait ramener le radical libre stable 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) au diphenylpicrylhydrazine jaune-coloré avec IC50 0,07 mg/ml (70 ug/ml). Cette dernière est inférieure à celle de BHA (0,01mg/ml (10 ug/ml)).

Les résultats sur l'extrait Méthanolique des graines de *Nigella sativa L* récoltée la région de Jiddah sont inférieurs à ceux trouvés par **BOURGUE et al (2008)**. Ils ont dévoilé que l'extrait méthanolique de *Nigella Sativa L* est doté d'un pouvoir antioxydant modéré, leur IC50 est de 450 mg/ml ce qui est largement supérieure à celle de l'acide ascorbique dont la valeur est de l'ordre de 16 mg/ml.

Par ailleurs, Il a été démontré que les molécules antioxydants telles que l'acide ascorbique, les tocophérols, les flavonoïdes et les tanins réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à céder l'hydrogène (**BOURGUE et al, 2008**). Les polyphénols

contenus dans les extraits de *Nigella Sativa L.* sont probablement responsables de l'activité antioxydante de ces extraits d'autant plus que l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique trouvé est toujours supérieure que celle de l'extrait aqueux (BOURGUE *et al*, 2008). Ceci est en accord avec les travaux menés sur les extraits de *Nigella Sativa L.* qui ont mis en évidence une forte activité antioxydant de l'extrait alcoolique, de l'huile, de l'huile essentielle et de la Thym quinone TQ extraits des graines de la Nigelle. Les même études montrent que la *Nigella Sativa L.*, est une espèce riche en composés phénoliques qui sont responsables de nombreuses activités biologiques notamment l'activité antioxydant, anticancéreux et antimicrobienne



EMG : d'extrait Méthanoliques de *Nigella sativa L* récoltée dans la région de Jiddah

Figure 13: IC50 en ug/ml de BHA (Hydroxyanisole butylé) et d'extrait Méthanolique de *Nigella sativa L* récoltée dans la région de Jiddah

Nos résultats trouvés montre que l'activité antiradicalaire des extraits du *Nigella sativa L* est probablement liée à sont contenu en polyphénols et en flavonoïdes. Nos résultats sont en accord avec les travaux de SENGUL et COLL., 2009; RIAHI et COLL., 2013, qui ont montré que la teneur en polyphénols et en flavonoïdes la plus élevée est responsable de l'activité antioxydante.

En effet, *Nigella sativa L* de la région de Jiddah représente un extrait actif. Les composés phénoliques semblent être de bons candidats pour leurs activités antioxydantes du

fait de la présence de nombreux hydroxyles, pouvant réagir avec les radicaux libres (VERZELLONI *et al.*, 2007; SENGUL et COLL., 2009; ZHANG *et al.*, 2011).

De nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des flavonoïdes et leur capacités antioxydantes, l'activité de ces molécules à piéger les radicaux libres dépend essentiellement de leur structures ; les flavonoïdes les plus actifs sont ceux qui renferment des groupements 3'- 4' dihydroxy sur le cycle B et/ou un groupement 3 OH sur le cycle C (MARFAK, 2003 ; SOKOL-LETOWSKA, 2007).

II.5. Activité antimicrobienne

A- Méthode d'antibiogramme

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Nigella sativa L.* vis-à-vis de quatre souches bactériennes et deux levures hautement pathogènes a été évaluée par la méthode de diffusion par disque.

Les résultats relatifs à l'activité des huiles essentielles envers les bactéries sont rapportés dans le **tableau 11**. Les diamètres des zones d'inhibitions nous ont permis d'évaluer la sensibilité ou la résistance des germes-cibles vis-à-vis d'antibiotique (ATB) de référence et de l'huile essentielle *Nigella sativa L.*

La Gentamycine (10ug) ($\varnothing = 18.88 \text{ mm}$) est utilisée comme antibiotique de contrôle des bactéries. La classification des souches bactériennes en catégories « Sensible, (S) » ou « Résistante, (R) » aux antibiotiques est définie par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2014).

Tableau 11: les résultats de l'étude qualitative : détermination des diamètres des zones d'inhibition

Souches bactériennes	Diamètre des zones d'inhibition en mm de l'huile essentielle de Jiddah
Souches bactériennes	
<i>Staphylococcus aureus</i>	15
<i>Bacillus subtilis</i>	13
<i>Escherichia coli</i>	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11

Souches fongiques :	Diamètre des zones d'inhibition en mm de l'huile essentielle de Jiddah
<i>Candida albicans</i>	12
<i>Saccharomyce cerevisiae</i>	13

NB : * = résistant ($\emptyset < 9$ mm) non sensible

Selon l'échelle de sensibilité de l'activité antimicrobienne (**RODRIGUEZ VAQUERO et al, 2007**), l'huile essentielle de *Nigella sativa L.* a montré une activité moyenne vis à vis des souches Gr +. Les bactéries se sont montrées sensibles à l'encontre de l'huile essentielle. Les bactéries *staphylococcus aureus* et les *Bacillus subtilis.* sont inhibées avec des diamètres d'inhibition respectifs 15 mm et 13 mm (**voir tableau 12**).

Concernant l'étude de l'action inhibitrice des huiles, nous notons une faible activité vis-à-vis des bactéries Gr- : *Escherichia coli* ($\emptyset=12$ mm) et *Pseudomonas aeruginosa* ($\emptyset= 11$ mm) (**voir tableau 11**).

L'étude de l'activité antifongique des huiles vis à vis des deux champignons a montré une sensibilité des levures *Candida albicans* et des *Saccharomyce cerevisiae* vis-à-vis de notre huile essentielle. (**Tableau 12**).

Nos résultats trouvés concordent avec les données de **MARIAM et Abu Al Basal (2009)**. Ils ont trouvé par la même méthode de diffusion sur disques, que la souche de référence *staphylococcus aureus* était la plus sensible parmi l'ensemble des souches testées ($\emptyset = 16.66$ mm). Cette grande sensibilité de *Staphylococcus aureus* à l'huile de nigelle, a été confirmée par la méthode des puits utilisé par **MARIAM et ABU-AL-BASAL (2009)**.

D'autres chercheurs ont confirmé l'absence d'activité prouvée par les travaux de **KOKDIL et al, (2005)** et **MARIAM et ABU-AL-BASAL (2009)**. Les travaux de **HARZELLAH** et son équipe (**2012**), ont prouvé que l'huile de nigelle a un très faible pouvoir d'inhibition sur *Escherichia coli* traduit par un $\emptyset = 7$ mm et reste modéré sur *Pseudomonas aeruginosa* avec un $\emptyset = 12.33$ mm. Nos résultats (**voir tableau 12**) confirment ces données avec un $\emptyset = 11$ mm pour *Pseudomonas aeruginosa* et reste modéré de 12 mm pour *Escherichia coli*. Nous venons de montrer que l'huile essentielle est plus efficace sur les Gr+ que sur les Gr- et ceci peut être attribué à la présence et la richesse en composés phénoliques qui constituent les graines de *Nigella sativa*. Citons le thymol et carvacrol isolés

dans les herbes comme le thym qui sont de la famille de menthane. Les huiles contenant ces terpènes phénoliques se sont avérés particulièrement efficaces en tant qu'agents antibactériens (CROZIER et al, 2006). Ces données confirment que la thymoquinone et le thymol d'huiles des graines de *Nigella sativa* ont des effets antibactériens sur les souches à Gr+ étudiées.

B-Méthode CMI

Des tests de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) ont été réalisés afin de préciser le caractère bactériostatique ou bactéricide de l'huile essentielle *Nigella sativa* L.

Les résultats des CMI d'huile essentielle sur les bactéries sont rapportés dans le **tableau 12**

Les valeurs de CMI obtenus, ont montré que l'huile essentielle possède un pouvoir inhibiteur important sur les *Staphylococcus aureus* et les *Bacillus subtilis* avec des CMI de 0.06.

Tableau 12: les résultats de l'étude quantitative : détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).

Dilution	2%	1%	0.5%	0.25%	0.125%	0.06%	0.03%
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	+
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	+

Ces valeurs très faibles de la CMI démontrent que l'huile de Nigelle peut être utilisée comme antiseptique et remède naturel aux infections à *Staphylococcus aureus* et aux bactéries Gr+ en général et comme conservateur en agroalimentaire

Concernant la sensibilité des bactéries Gram négatif et des bactéries Gram positif vis-à-vis de l'extrait méthanolique et des huiles essentielles est déjà signalée par DAHMANI (2019). Cette différence de sensibilité des souches microbiennes aux huiles essentielles peut être expliquée par une adaptation évolutive liée étroitement aux conditions biotiques (l'espèce elle-même) et abiotique (milieu). En général, selon la littérature une grande variabilité de l'activité antimicrobienne des extraits vis-à-vis des différentes souches est observée. Selon GUILLEN et MANZANOS (1998), l'activité antibactérienne des extraits doit être attribuable à la présence de plusieurs types de composés appartenant à différentes classes, tels

que les polyphénols et les flavonoïdes et d'après **ÇOLAK et al, (2009)**, la sensibilité d'un microorganisme à un extrait dépend des polyphénols et du microorganisme lui-même.

Dans notre étude, les bactéries à Gram positive testées sont plus sensibles que les souches à Gram négative. Cette différence dans la sensibilité aux extraits peut être attribuée à la différence de la structure entre les bactéries Gram positive et les bactéries Gram négative (**SHTAYEH et al, 1998**). Selon **YAKHLEF et al, (2011)**, la résistance de la bactérie à Gram négative n'est pas surprenante du fait que ces bactéries possèdent une résistance intrinsèque aux agents biocides qui est en relation avec la nature de leurs membranes externes composées de lipopolysaccharides qui forment une barrière imperméable aux composés hydrophobes. De plus, **TROMBETTA et al, (2005)** ont conclu, l'effet antimicrobien des composés polyphénoliques est partiellement dû à une perturbation des fractions lipidiques de la membrane plasmique des bactéries. Selon toujours ces auteurs, ces composés phénoliques altèrent la perméabilité de la membrane et causent ainsi la perte de ses organites intracellulaires. D'autres auteurs, **DHAOUADI et al, (2010)** suggèrent que l'effet antimicrobien des polyphénols induit l'inhibition de la croissance bactérienne suite à leur adsorption sur la membrane cellulaire et leur interaction avec les enzymes et les effecteurs ou la privation en substrats et ions métalliques.

Conclusion

Dans le cadre de la valorisation des caractéristiques Thérapeutiques et pharmacologiques différentes de la plante aromatique *Nigelle nativa L.*, nous avons menée une étude sur des graines de *Nigella sativa L.* provenant de la région de Jiddah (Arabie saoudite). L'objectif de notre recherche se base sur une étude phytochimique des extraits et des huiles essentielles de l'espèce et évaluer ses potentiels antioxydants et antimicrobiens.

Le criblage phytochimique a révélé la présence d'une quantité importante des flavonoïdes, des tannins et des stérols dans la région.

Les extraits de *Nigella sativa L.* étendue dans la station de Jiddah vue leur richesse en poly phénols et en flavonoides sont pourvus d'un pouvoir antioxydant élevé.

Concernant l'effet antimicrobien, l'analyse a fait ressortir d'une part une activité inhibitrice importante des huiles essentielles de la région sur les germes multi résistants responsables des maladies infectieuses (*Staphylocoques*, et *B.cereus*) et d'autre part une action moyenne à l'encontre des levures *Candida albicans* et *Saccharomyce cerevisiae*.

Les résultats intéressants générés par notre travail et par d'autres travaux thérapeutiques et pharmacologiques cités dans plusieurs travaux devraient inciter à envisager un programme de recherche sur cette plante touchant les volets agronomiques, zootechnique et économique. L'utilisation de faibles doses de graines de Nigelle pour la manipulation de la qualité nutritionnelle pour répondre aux préférences du consommateur mérite une profonde exploration dans les laboratoires de recherche. Les pistes de recherche sur la Nigelle évaluent le potentiel d'utilisation de cette plante en alimentation humaine et même animale et les résultats attendus seront décisifs quant à l'intérêt de développement de cette plante en Algérie.

Références Bibliographiques

A

- Aftab A., Asif H., Mohd M., Shah Alam Kh., Abul K. N., Nasir Ali S, Zoheir A. Damanhour, Firoz A., (2013).** A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herbae Asian. Pac J Trop Biomed; 3(5): 337-352.
- Ahmed MS, Honda G, Miki W (1979)** Herbs and herbalists in the Middle East. Institute for the study of languages and cultures of Asia and Africa, Tokyo.
- Al Jassir M (1992).** Chemical composition and microflora of Black cumin (*Nigella sativa*) seed growing in Saudi Arabia, Food chemistry, 45 :239-242.
- ANSARI A., HASSAN S., KENNE L., ATTA U.R., & WEHLER J. (1988).** Structural studies on a saponin isolated from *Nigella sativa*. Photochemistry (27), pp. 3977-3979.
- Al-Gaby AM:(1998)** Amino acid composition and biological effects of supplement in broad bean and corn proteins with *Nigella sativa* (black cumin) cake protein. Nahrung ;42 :290-294.
- AL-SALEH I.A., BILLEDO G., EL-DOUSH I.I. (2006).** Levels of selenium, DL- α -tocopherol, DL- γ -tocopherol, all-trans-retinol, thymoquinone and thymol indifferent brands of *Nigella sativa* seeds. Journal of Food Composition and Analysis. 19: 167-175.
- Ali, M.A., M.A. Sayeed, M.S. Alam, M.S. Yeasmin, A.M. Khan, I.I. Muhamad., (2012).** Characteristics of oils and nutrient contents of *Nigella sativa* Linn. and *Trigonella foenum-graecum* seeds. Bull. Chem. Soc. Ethiop., 26(1): 55-64.
- Alireza T., Vahid M., Bibi Marjan R and Hossein H., (2017).** Review on Clinical Trials of Black Seed (*Nigella sativa*) and Its Active Constituent, Thymoquinone. Journal of Pharmacopuncture ;20[2] :107-111.
- Anton r., Teuscher E., Lobstein-Guth A., Bauermann U., Werner M., Rohrner C., (2005)** et al. Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Paris: Médicales internationales.
- Atta M. B., (2003).** Some characteristics of *Nigella sativa* L. seed cultivated in Egypt and its lipid profile. Food Chemistry, vol. 83, n. 1, pp. 63-68.
- Atta U.R., Malik S., Cun-Heng H., Clardy J. (1985a).** Isolation and structure determination of nigellidine, a novel alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. Tetrahedron letters. 26: 2759-2762.
- Atta U.R., Malik S., Zaman K. (1992).** Nigellimine, a new isoquinoline from the seeds of *Nigella sativa*. Journal of natural products. 55: 676-678.
- Atta, M.B., Imaizumi, K. (1998)** Antioxidant activity of *Nigella sativa* L. seeds extracts. JAPAN Oil Chemists' Society. 47: 49-54.

B

- Badiaga, M. (2011).** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea Latifolia* Smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali, thèse de doctorat, université de Bamako.
- Baser Khc, Honda G, Miki W (1986)** Herb drugs and herbalists in Turkey. Institute for the study of languages and cultures of Asia and Africa, Tokyo.
- Benkaci-Ali F, (2007).** Etude de la composition chimique de la nigelle *Nigella sativa* originaire d'Algérie. Thèse de doctorat d'état en chimie organique appliquée, USTHB, 216 p.

- Boros, B., Jakabova, S., Dornyei, A., Horvath, G., Pluhar, Z., Kilar, F., Felinger, A. (2010).** Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in Thymus species. *Journal of Chromatography A*.
- Boudiaf K., (2006).** Etude des effets anti-xanthine oxydoréductase et anti-radicalaires des extraits des graines de *Nigella sativa*. Thèse de magistère. Département de biologie. Université Ferhat abbas. (Sétif) Algérie.
- Bourgou S; Ksouri, R; Bellila, A; Skandrani, I; Fallah H. Marzouk. B. (2005).** Phenolic composition and biological activities of tunisian *Nigella sativa* L. shoot and roots. *C.R. Biol* 2008.331.48-55.
- Bousbia, N., (2004).** Extraction et identification de quelques huiles essentielles (*Nigelle*, *Coriandre*, *Origan*, *Thym*, *Romarin*) : étude de leurs activités antimicrobiennes. Thèse de magister en sciences alimentaires, (INA), El Harrach, 130 p.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C, (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. U. Technol*, 28: 25-30.
- Burtej. N. (1992).** Le bon jardinier, encyclopédie horticole volume 3, La maison rustique, Paris : P 12.
- Bourgou, S., Ksouri, R., Bellila, A., Skandrani, I., Falleh, H., Marzouk, B. (2008)** Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *Comptes Rendus Biologies* 331 : 48-55.

C

- Canonica L., Jommi G., Scolastico C., & Bonati A. (1963).** The pharmacologically active principle in *Nigella sativa*. *Gazzetta chimica italiana* 93 :1404-1407.
- Cheers., (1997). Botanica**, encyclopédie de Botanique et d'horticulture Könemann, Köngswinter, Allmagne .p12.
- Chopra S.L. (1956).** Nayar.I.C. chopra. Glossary of indian Médicinal plants. New Delhi.175.

D

- Daing MI, Pathak A, Bhat MA, Sharma R, Zargar MA (2017).** In vitro Antioxidant and Antibacterial Efficacy of Condensed Tannins Containing Tree Leaves Extract of Jammu Province. *Journal of Animal Research* 7, 165.
- Davis PH, (1965).** *Nigella L.* In: Davis PH (ed.). *The Flora of Turkey and East Aegean Islands*, Edinburgh University Press. Edinburgh. Vol. 1, pp. 98-105.
- De Souza PO, Bianchi SE, Figueiró F, Heimfarth L, Moresco KS, Gonçalves RM, Hoppe JB, Klein CP, Salbego CG, Gelain DP (2018).** Anticancer activity of flavonoids isolated from *Achyrocline satureioides* in gliomas cell lines. *Toxicology in Vitro* 51, 23-33.
- Djeridane A., Yousfi M., Najemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N. (2006).** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food chemistry* 97: 654-660.
- Ducros AH, (1930).** Essai sur le droguier populaire arabe de l'Inspectorat des pharmacies du Caire. *M6m Inst d'Egypte* 15 :166.

E

- El-Guendouz S, Al-Waili N, Aazza S, Elamine Y, Zizi S, Al-Waili T, Al-Waili A, Lyoussi B (2017).** Antioxidant and diuretic activity of co-administration of *Capparis spinosa* honey and propolis in comparison to furosemide. *Asian Pacific journal of tropical medicine* 10, 974-980.
- El-Saleh, S.C., Al-Sagair, O.A., Al-Khalaf, M.I. (2004)** Thymoquinone and *Nigella sativa* oil protection against methionine-induced hyperhomocysteinemia in rats. *International journal of cardiology*. 93: 19-23.
- Eric Yarnell, ND, and Kathy Abascal, BS, JD, RH (AHG).(2011).** *Nigella sativa*. MARY ANN LIEBERT, VOL. 17 NO.

F

- Fleuri et, A. (1982).** Thèse Doc. Etat, Montpellier.
- Francis G, Kerem Z, Makkar HP, Becker K (2002).** The biological action of saponins in animal systems: a review. *British journal of Nutrition* 88, 587-605.

G

- Gali –Muhtasib H, Roessner A and Schneider –Stock R. (2006).:** thymoquinone: à promissing anti –canser drug from natural sources. *Int J bochem cell Biol* :38 :1249-1253.

Gardés –Albert M., Bennefont-Rousselot D., AbedinzadenZ., et Jore D. (2003). Espèces réactives de l'oxygéné : comment l'oxygène peut –il devenir toxique ? Actualité chimique, pp91-95.

Gareeballa O. Adam, Md. Mahbubur R., Sei-Jin Lee, Gi-Beum Kim, Hyung-Sub Kang, Jin-Shang Kim, Shang-Jin Kim. (2015). Hepatoprotective effects of *Nigella sativa* seed extract against acetaminophen-induced oxidative .9(3) :221-227.

Ghedira K. et Le Jeune R. (2010). Huile de nigelle cultivée, *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae). *Phytothérapie* 8 :124-128.

Ghedira K. (2006). La nigelle cultivée : *Nigella sativa* L.(Ranunculaceae). *phytothérapie*.4 :1-7.

Gilani A, Jabeen Q, Ullahkhan M (2004) A review of medicinal use and pharmacological activities of *Nigella sativa* .*Pak J Biol Sci* 7 :441-451.

Goreja WG. (2003). Black Seed: Nature's Miracle Remedy. New York, NY 7 Amazing Herbs Press; .

Granato D, Shahidi F, Wrolstad R, Kilmartin P, Melton LD, Hidalgo FJ, Miyashita K, van Camp J, Alasalvar C, Ismail AB (2018). Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods? *Food chemistry* 264, 471-475.

Greenich, H (1880). Contribution to the chemistry of *Nigella sativa* (vol.10) *pharmac J Trans.*

Gürsoy F, Mursaleen M, Karakaya V, Ertürk M (2012). Incidence of listeriosis and related mortality among groups at risk of acquiring listeriosis. *Clin Infect Dis* ;54(5) :652-60.

H

Harborne J. B., Tomás-Barberán F. A., Williams C. A. et Gil M. I. (1986). A chemotaxonomic study of flavonoids from European *Teucrium* species. *Phytochem.*, 25: 2811-2816.

Hertog MGL, Hollman PCH, Van de putte B (1993). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1242

Hosseinzadeh, H., S. Parvardeh., (2004). Anticonvulsant effects of thymoquinone,

Houghton, P.J., Zarka, R., de las Heras, B., Hoult, J.R. S. (1995). Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leucocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Med.* 61: 33-36.

J

Jadhav, A.N, Bhutani K(2005). k, Ayurveda and ayneecological disorders.J. *Ethnopharmacol* .97 .1561-159.

Jansen P. C. M. (1981). Spices, Condiments and Medicinal Plants in Ethiopia, their Taxonomy and Agricultural Significance. Center for Agricultural Publishing and Documentation, Addis Ababa, pp. 76-85

Jansen PCM. (1999). Minor essential-oil plants. In: Oyen LPA, Nguyen Xuan Dung (Eds.), plant resources of south-east Asia, No. 19, essential-oil plants, Bakhuis Publishers, Leiden, pp.173-184.

K

KARRANDOU A, 2016, La Nigelle, une panacée peu connue en Occident

THÈSE, Présentée à la Faculté de Pharmacie de Dijon

Pour l'obtention du Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie

Kehili · S. Saka · O. Aouacheri .(2017).L'effet phytoprotecteur de la nigelle (*Nigella sativa*) contre la toxicité induite par le cadmium chez les rats.

Khanna T, Zaidi FA, Dandiya PC. (1993). CNS and analgesic studies on *Nigella sativa*. *Fitoterapia* 64: 407-410.

Khar CP (2004) Encyclopedia of indian medicinal plants .Spinger,New york.

Kökdil G., Delialioğlu N., Özbilgin B., EmekdaşG. (2005). Antilisterial activity of ballota species growing in turkey antibacteria activity screening of nigella l. species growing in turkey. Mersin University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, Yenişehir Campus, 33169 Mersin, TURKEY. *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 34 (3) 183 - 190 .

Kokoska L. (2011). Chemistry and Biological Activity of *Nigella* Genus : The antimicrobial and anti-inflammatory effects of seed extracts, essential oils and compounds of six *Nigella* spicies. Edition: LAP LAMBERT Academic publishing GmbH & Co.KG. U.S.A. pp 1.

L

Laura B., Donatella F., Cinzia N., Filippo M., Fabrizio P., Martin W., Raffaele De Caterina and Rosita Gabbianelli (2019). Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of *Nigella sativa* Oil in Human Pre-Adipocytes. *Antioxidants* ;2019, 8, 51.

Lautenbacher LM. (1997). Schwarz kummelöl. *Dtsch Apoth Ztg* 137 :68-69.

Lim. (2013). *Nigellasetiva*: T.K Lim(ed). Edible medicinal and Non-medicinal plants. Springer Dordrecht Heidelberg New York London.springer.Vol.5, fruit, pp.506-555.

M

MOKKEDEM A, (2004), Guide pratique des cultures en secs de quelques plantes médicinales, condimentaires et aromatiques I.N.R.A.A. El Harrach, 10p.

Maire A, Savelli A (1955) In Salah et le Tidikelt oriental, Etude historique, géographiques et médicale. *Arch Insta Pasteur Alger* 33(4) : 367-432.

Marfak A, (2003). Radiolyse Gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides. Thèse de doctorat, 220p.

Mariam A., Abu-Al-Basal. (2009). In vitro and in vivo anti-microbial effects of *nigella sativa* linn. seed extracts against clinical isolates from skin wound infection . *American Journal of Applied Sciences* 6(8): 1440-1447.

Meral, I., Yener, Z., Kahraman, T., Mert, N. (2001) Effect of *Nigella sativa* on glucose concentration, lipid peroxidation, anti-oxidant defence system and liver damage in experimentally- induced diabetic rabbits. *The Journal of Veterinary Medical Science.* 48: 539-599.

Merfort I., Wray V., Barakat H.H., Hussein S.A.M., Nawwar M.A.A. et Willuhn G.
(1997). Flavonol triglycosides from seeds of *Nigella sativa*. *phytochemistry*. 46(2): 359-363.

Mokkedem A., (2004). Guide pratique des cultures en secs de quelques plantes médicinales.

N

NERGIZ C, ÜNAL K, (1991), Effect of the method of extraction on the total polyphenol and 1,2 diphenol content and stability of virgin olive oil. *J. Sci. Food Agric.*

Nergiz C., Otles S, (2003), Some characteristics of *Nigella sativa* L. seed cultivated in Egypt and its lipid profile. *Food Chemistry*, 83: 63-68.

O

Omar A,Ghosheh S,Abdulghani A,Houdi Aand crookscor PA.(1999). High Performance Liquide Chromatographic analysis of the pharmacologically active quinones and related compounds in the oil of the Black Seed (*Nigella Stiva* L.) *phrma Biomed Anal* ;19 :757-762.

Owen, RW, R Haubner, WE Hull, G Erben, B Spiegelhalder, H Bartsch, B Haber. (2003). “Isolation and Structure Elucidation of the Major Individual Polyphenols in Carob Fibre.” *Food and Chemical Toxicology* 41 (12) : 1727–38.

Ozenda P. (2000) Les végétaux : organisation et diversité biologique. Paris : 2ème édition Dunod.

P

Pak. J. (2011). *Nigella sativa* : the miraculous herb. *Biochem* ;44 : 44-48.

Passager P, Brabançon S (1956) Taghit (Sahara oranais) : ~étude historique, géographique et médicale. *Arch Inst Pasteur Alger* 34(3): 404-475.

Pellegrini N., SerafiniM., Colombi B., Rio D.D., SalvatoreS., Bianchi M.et Bringhenti F. (2003) Total antioxydant capacity of plant food, beverage and oils consumed in italy assessed by three different in vitro assays.*J,Nutr*,133 :2812-2819.

Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M., (2001). Antioxydants in food, Practical applications.

Panch phoron.(2012) Consulté le 29 Février, sur Wikipedia, The Free Encyclopedia:
http://en.wikipedia.org/wiki/Panch_phoron.

R

Ramadan MF, Asker MMS, Tadros A (2012). Antiradical and antimicrobial properties of coldpressed black cumin and cumin oils. *European Food Research and Technology* :234: 833–844.

Ramadan M.F, (2021) Black cumin (*Nigella sativa*) seeds: Chemistry, Technology, Functionality, And Applications, Springer Nature Switzerland AG,

Ramadan, M. F., &Mörsel, J. T. (2002).Characterization of phospholipid composition of black cumin (*Nigella sativa* L.) seed oil. *Food/Nahrung*, 46(4), 240-244.

Rai A, Das S, Chamallamudi MR, Nandakumar K, Shetty R, Gill M, Sumalatha S, Devkar R, Gourishetti K, Kumar N (2018). Evaluation of the aphrodisiac potential of a chemically characterized aqueous extract of Tamarindus Indica pulp. Journal of ethnopharmacology 210, 118-124.

Rakotonanahary, M. (2012). Thèse présentée pour l'obtention du titre de docteur en pharmacie diplôme d'état, université Joseph Fourier.

Razika L, Thanina AC, Nadjiba CM, Narimen B, Mahdi DM, Karim A (2017). Antioxidant and wound healing potential of saponins extracted from the leaves of Algerian Urtica dioica L. Pakistan journal of pharmaceutical sciences 30.

Reylli A. ; OsterM., (2003). Guide des annuelles et vivaces.Modus Vivendi,Paris.p12.

- Riahia L, Chogranib H, Elferchich M, Zaouali Y, Zoghlamia N, Mlika A, (2013).** Variations in Tunisian wormwood essential oil profiles and phenolic contents between leaves and flowers and their effects on antioxidant activities Ind. Crops. Prod. 46, 290– 296.
- Riaz M, Syed M, Chaudhary FM, (1996).** Chemistry of the medicinal plants of the genus *Nigella*. Hamdard Medicus, 39: 40-45.
- Roginsky V.et Lissi E.A. (2005).** Review of Methode to determine chain –breaking antioxidant activity in food. Food chemistry .92 :235-254.

S

- Salvador JP, Tassies D, Reverter JC, Marco MP (2018).** Enzyme-linked immunosorbent assays for therapeutic drug monitoring coumarin oral anticoagulants in plasma. *Analytica chimica acta* 1028, 59-65.
- Seher Nancy Bakal, Stefan Bereswill, Markus M. Heimesaat. (2017).** finding novel antibiotic substances from medicinal plants – antimicrobial properties of *nigella sativa* directed against multidrug-resistant bacteria; *European Journal of Microbiology and Immunology* 7 1, pp. 92–98
- Sengul M, Yildiz H, Gungor N, Cetin B, Eser Z, Ercisli S, (2009).** Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. *Pak. J. Pharm. Sci.* 22, 102-106.
- Sijelmassi A (1991)** Les plantes médicinales du Maroc. Le Fennec, Casablanca.
- Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventós R.M., (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu.
- Skerget M., Kotnik P., Hadolin.M., Hras A.R., and SimonicM., Knez Z. (2005).** Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food chem.* 89 : 191-198.
- Spichiger R.E. ; Savolainen V.V. ; Figeat M. ; Jeanmonod D. (2002).** Botanique systématique des plantes à fleurs. Lausanne : 2ème édition Presses polytechniques et universitaires romandes ;.
- Sultan MT, Butt MS, Anjumi FM, Jamil A, Akhtar S, Nasir M (2009).** Nutritional profile of indigenous cultivar of black cumin seeds and antioxidant potential of its fixed and essential oil. *Pak. J. Bot* 2009; 41(3): 1321-1330.
- Sunita Singh,1 S. S. Das,1 G. Singh,1 Carola Schuff.,(2014).** Marina P. de Lampasona,2 and César A. N. Catalán2 Composition, In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oil and Oleoresins Obtained from Black Cumin Seeds (*Nigella sativa* L.); Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International Volume 2014, , 10 pages.
- SLIMANE S, (2001)** *Nigella sativa* L., *Nigella damascena* L. ; études botaniques, chimique et pharmacologique. Propriétés des huiles essentielles. Thèse de pharmacie. Université de Besançon; 2001.

T

Tuttin T. G, Heywood V.H, Burges N. A, Valentine D.H, Walters S.M, and Webb D. A,(1964) –Flora europeae. *Cambridge University Press*, 1:365 – 372.

Tariq M., Muhammad I., Muhammad A., H. S. Rehman¹, Hafiz M. Akram¹, Abdus Sattar¹, S. Abbas¹ and *Malik F. H. Ferdosi. (2012). Growth and yield attributes of black cumin (*Nigella sativa* L.) as affected by sowing dates and methods,. *Mycopath* 10: 83-86.

Taskin M.k., Alankus Caliskan O., Anil H., Abou-gazar H., Khan A.I., Bedir E. (2005). Triterpène saponins from *Nigella sativa* L. *Turkish Journal of Chemistry*.29: 561-569.

Teuscher E., Anton R., Lobstein A., (2005).Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed. Lavoisier, Paris, 522 p.

Thippeswamy, N.B., Akhilender, N.K. (2005) Antioxidant potency of cumin varieties- cumin, black cumin and bitter cumin-on antioxidant systems. *European food research and technology*. 220: 472- 476.

V

Verzelloni E, Tagliacruzchi D, Conte A, (2007). Relationship between the antioxidant properties and the phenolic and flavonoid content in traditional balsam vinegar. *Food. Chem.*105, 564-571.

VonarburgB. (1998). *Natürlich*. (18), pp. 65-68.

U

Usman H, Kaigama AU, Ibisagba OO, Fulata AM, Ahmed IA (2018). Phytoconstituents evaluation and antimicrobial efficacy of the crude flavonoids and saponins rootbark extracts of *Terminalia avicennioides* wxand *Ficus polita*. *Journal of Herbmmed Pharmacology* 7, 106-111.

Ulasli M, Serdar A, Recep B, Onder Y, Serdar O, Mehri I, Yusuf Z. I, Ecir A.C, Ahmet A, (2014), The effects of *Nigella sativa* (Ns), *Anthemis hyalina* (Ah) and *Citrus sinensis* (Cs) extracts on the replication of coronavirus and the expression of TRP genes family, *Springer*, 41:1703–1711.

Y

Yi Z., Yan Y., Liang Y., and Zeng B. (2008). In vitro antioxidant and antimicrobial activities of *PericarpiumCitriReticulatae* of a new *Citrus* Cultivar and its main flavonoid. *LWT*, 41:597 603.

Z

Zhang L, Ravipati AS, Koyyalamudi SR, Jeong SC, Reddy N, Smith PT, Bartlett J, Shanmugam K, Münch G, Wu MJ, (2011). Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants containing phenolic and flavonoid compounds. *J. Agric. Food. Chem.* 59, 12361–12367.

Zineb M., K. Mammad, T. Aqeil, A. Kribii4, and K. Ounine1. (2017). Antibacterial and Antioxidant activity of Nigella Sativa. International Journal of Innovation and Scientific Research.

Annexe

Préparation des solutions :

- **Préparation de solution tampon phosphate à 0,2M et pH= 6,6 :**

a. Solution 1 : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \rightarrow 28,4\text{g} + \text{H}_2\text{O}$ pour compléter 1L.

Donc : 28,4g \rightarrow 1000ml

X= 7,1g \rightarrow 250ml

b. Solution 2 : $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 31,21\text{g} + \text{H}_2\text{O}$ pour compléter 1L.

Donc : 31,21g \rightarrow 1000ml

X= 7,8g \rightarrow 250ml

En fin, Phosphate buffer à 0,2M et pH= 6,6 est un mélange de solution 1 et solution 2 dont le volume 37,5ml et 62,5ml respectivement.

- **Préparation Solution de FeCl_3 à 0,1% :**

Mélanger 0,1ml de FeCl_3 dans 100ml de l'eau distillée.

Donc : 0,4g 400 ml H_2O .

Annexe 3 :

Verreries et autres matériels :

- ✓ Boit de pétrie.
- ✓ Bécher gradué.
- ✓ Lacons en verre stériles.
- ✓ Tube à essai.
- ✓ Pipette Pasteur.
- ✓ Râteau.
- ✓ Pince stérile

Appareillage:

- ✓ Broyeur électrique.
- ✓ Plaque chauffante agitatrice.
- ✓ Papier filtre.
- ✓ Spectrophotométrie.
- ✓ Les disques stériles en cellulose.
- ✓ Auto-claver.
- ✓ Papier Wattman.

- ✓ Papier aluminium.
- ✓ L'autoclave.
- ✓ Diméthyle sulfoxyde (DMSO).
- ✓ Bouillant nutritif.
- ✓ L'eau physiologique stérile.
- ✓ Pied à coulisse.

➤ **Réactifs et solutions**

- ✓ Eau distillée
- ✓ NaOH 1/10
- ✓ Copeaux de Mg⁺²
- ✓ HCl concentré
- ✓ L'extrait de l'éther de pétrole
- ✓ Anhydride acétique
- ✓ Acide sulfurique concentré
- ✓ la liqueur de Fehling
- ✓ Propanol / acide chlorhydrique
- ✓ d'ether / chloroforme
- ✓ Sulfate de sodium anhydre
- ✓ Ammoniaque diluée
- ✓ Hydroxyde de potassium
- ✓ Acide sulfurique (H₂SO₄).
- ✓ Acétate de plomb.
- ✓ Acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀).
- ✓ Acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀).
- ✓ Folin-Ciocalteu.
- ✓ Acide gallique.
- ✓ Trichlorure d'aluminium (AlCl₃).
- ✓ Quercétine.
- ✓ Solution tampon phosphate.
- ✓ Solution de ferricyanure de potassium K₃Fe(CN)₆ à 1%.
- ✓ Acide trichloracétique à 10%.
- ✓ Solution de chlorure de fer (FeCl₃, 6H₂O) à 0.1%.
- ✓ solution éthanolique du DPPH (60μM).
- ✓ Ac Ascorbique

Tableau : Identification et détermination des caractères biochimiques des Bactéries Gram- (Krieg *et al.*, 1984 et Holt *et al.*, 1994).

Bactéries Gram-	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>
Caractères cultureux	Colonies ; bombées, moyennes, lisses et transparentes,	Colonies moyennes, légèrement bombées opaques, brillantes et
Sur gélose nutritive	2 à 3 mm de diamètre	pigmentées en vert de 1.5 à 3 um de long et de 0.5 à 0.8 um de large
Examen microscopique	- Cocobacilles droits isolés ou en amas - Gram-	- Bacilles droits - Gram-
Respiration	- Aerobie-anaérobie facultatif	- Aérobie strict
Oxydase	-	+
Catalase	+	+
ONPG	+	-
ADH	-	+
LDC	+	-
ODC	+	-
Indole	+	-
Citrate	-	+
Urée	-	-
H2S	-	-
TDA	-	-
VP	-	-
Nitrates	+	+
Glucose	+	-
Saccharose	+	-
Lactose	+	-
MEVAG	Aérobie	+
	Anaérobie	+
Mannitol	+	+
Mobilité	+	+
Gaz	+	-
King A et King B		+
Croissance à -4°C		-
Croissance à 41°C		+

Tableau : Identification et détermination des caractères biochimiques des Bactéries Gram+

(Krieg *et al.*,1984 et Holt *et al* ; 1994).

Bactéries Gram+	<i>B.subtilis</i>	<i>S.aureus</i>
Caractères cultureux sur gélose nutritive	Colonies rondes à contour irrégulier plat opaque,	Colonies opaques arrondies bombées brillantes et à teinte blanche en jaune doré de 1 à 2 um de diamètre
Caractérisation de la spore	Ovale centrale et non déformante	
Examen microscopique	- Bâtonnet droit (gros bacilles isolés ou en groupes sous forme de chaînettes) - Gram+	- Coccis regroupés en diplocoques ou en amas (grappes de raisins) - Gram+
Respiration	- Aérobie strict	- Aéro-anaérobie facultatif
Oxydase	-	-
Catalase	+	+
ONPG	NF	NF
ADH	NF	NF
LDC	NF	NF
ODC	NF	NF
Indole	-	-
Citrate	-	NF
Urée	-	+
H2S	NF	NF
TDA	NF	NF
VP	+	NF
Nitrates	+	NF
Glucose	+	+
Saccharose		+
Lactose	NF	+
coagulase	NF	+

MEVAG	Aérobie	+	+
	Anaérobie	-	+
Mannitol		+	+
Mobilité		+	-
Xylose		+	-
Hydrolysed'amidon		+	
Lécitinase		+	
Gélatinase		+	
Hémolyse sur gélose nutritive		NF	Bêta

Matériel utilisé

Etuve	
Autoclave	
Balance	
Centrifugeuse	

Microscope optique



Bec bunsen.



Spectrophotométrie



Agitateur



Evaporateur rotative



Haute.

