

Dédicaces

On dédie ce modeste travail

*A nos chers parents pour les encouragements, la tendresse,
l'affection et le soutien durant toute la période de nos études.*

On souhaite que vous trouviez ici le fruit de vos sacrifices.

*Que dieu vous bénisse et vous accorde une longue vie pleine
de sante et de bonheur.*

A nos frères et sœurs

A tous les membres de nos familles

A tous nos amis

A tous nos professeurs

*A toute la promotion 2018/209 de Biotechnologie et
valorisation des plantes*

A toute personne ayant contribué de près ou de loin à

L'élaboration de ce mémoire.

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.

Un remerciement spécial pour notre promotrice **Mme GHENAI R**, On tient vivement à lui exprimer nos profonde reconnaissance et nos gratitude pour sa disponibilité, sa patience, sa compréhension. Merci pour vos précieux conseils et votre soutien à tous les instants, et surtout merci pour vos qualités scientifiques et humaines.

Nos remerciements vont aussi à **Mme Allel L**, de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire.

On tiens aussi a remercier **Mme CHEBETA N**, pour l'intérêt qu'elle a porté à notre recherche, en acceptant de juger et critiquer notre travail et de l'enrichir avec ces propositions.

Nos remerciements les plus sincères s'adressent aux responsables du laboratoire d'hygiène de la wilaya de Tipaza : **Mme MERZOUGUI** et **Monsieur LETLOUT** et à tous les membres du laboratoire pour le bon accueil et de nous avoir fait bénéficier de leur expériences et de leur rigueurs scientifiques et professionnelles.

On remercie également les membres du laboratoire de recherche des plantes médicinales et aromatiques de l'université de Blida pour leur aide précieuse.

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

المخلص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم خصائص مضادات للبكتريا ومضادات الأكسدة من مستخلصات مختلفة: الزيوت النباتية ، المستخلص المائي ، المستخلص الميثانوي المسحوق من بذور حبة البركة. كشف التحليل الكيميائي النباتي عن وجود الأنتوسيانين والجلوكوسيدات والعفص الغالي والفلافونويد والكلودات وغياب التانسينات الصمغية والكاتشينيكية في بذور حبة البركة. أظهرت تراكيز البوليفينول والفلافونويدات في الزيت النباتي ، والمستخلص الميثانوي والمستخلص المائي أنه تم الحصول على أعلى محتوى في الزيت النباتي (81.91 ميكروغرام / EAG جم E و 5.71 ميكروغرام / EC / ملغم E) على التوالي تم اختبار النشاط المضاد للبكتيريا من خلال طريقة نشر الأقراص على وسط صلب (المخطط العطري) ، ضد أربعة سلالات بكتيرية مرجعية. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن الزيوت النباتية ومستخلص الميثاني أظهرتا تثبيطاً على سلالتين إيجابيتين من الجرام (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) ، وكان أفضل تثبيط هو استخراج الميثانويك في *Staphylococcus aureus* بقطر تثبيط كبير بترتيب (24 مم \pm 0.47) ، أظهرت السلالات سالبة الجرام (*E.coli* و *Pseudomonas aeruginosa*) مقاومة للمستخلصات. تم إجراء تقييم لمقاومة مضادات الأكسدة للزيوت النباتية باستخدام طريقة الاصطياد الجذرية الحرة (1،1-DPPH- ثنائي فينيل -2 بيكرهيدرازيل). أشارت النتائج التي تم الحصول عليها إلى أن الزيت النباتي الموجود في حبة البركة أظهر نشاطاً متوسطاً مضاداً للأكسدة بقيمة IC50 تبلغ حوالي (309 ميكروغرام / مل) ، وهو أعلى من ذلك الذي سجله حمض الأسكوربيك (272 ميكروغرام / مل).

كلمات المفتاح : الزيت النباتي، مضادات للبكتريا ومضادات الأكسدة، الفلافونويد البوليفينول حبة البركة.

Résumé

L'objectif de cette étude est l'évaluation des pouvoirs antibactériens et antioxydants de différents extraits : l'huile végétale, extrait aqueux, extrait méthanoïque et la poudre obtenus à partir des graines de *Nigella sativa*.

Le screening réalisé sur la poudre et l'infusé des graines nous a permis de révéler la présence des anthocyanes, des glucosides, des tanins, des tanins galliques, des flavonoïdes, des alcaloïdes et l'absence du mucilage et des tanins catechique dans les graines de la nigelle.

Les dosages des polyphénols et des flavonoïdes chez l'huile végétale, l'extrait méthanoïque et l'extrait aqueux ont montré que les teneurs les plus élevées ont été obtenues pour l'huile végétale (81.91 mg EAG/g E et 5.71 mg EC/g E respectivement) de la nigelle.

L'activité antibactérienne a été testée par la méthode de diffusion des disques sur un milieu solide (l'aromatogramme), vis-à-vis de quatre souches bactériennes de référence.

Les résultats obtenus ont montré que l'huile végétale et l'extrait méthanoïque présentent un effet inhibiteur sur deux souches à Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) dont la meilleure inhibition était celle de l'extrait méthanoïque exercée sur les *Staphylococcus aureus* avec un diamètre d'inhibition important de l'ordre de $24\text{mm}\pm 0.47$, les souches à Gram négatifs (*E.coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) ont montré une résistance vis-à-vis les différents extraits.

L'évaluation du pouvoir antioxydant de l'huile végétale a été réalisée en utilisant la méthode du piégeage du radical libre DPPH (1,1- Diphenyl-2-picrylhydrazyl). Les résultats obtenus ont indiqué que l'huile végétale de *Nigella sativa* possède une activité antioxydante importante dont la valeur d'IC₅₀ est de l'ordre de (309 µg/ml). Cette valeur est supérieure à celle enregistrée par l'acide ascorbique (272 µg/ml).

Mots clés : *Nigella sativa*, huile végétale, polyphénols, flavonoïdes, antimicrobien, antioxydant.

Abstract

The objective of this study is to evaluate the antibacterial and antioxidant properties of different extracts; vegetable oil, aqueous extract, methanoic extract and powder obtained from *Nigella sativa* seeds.

The phytochemical analysis made by the screening revealed the presence of anthocyanins, glucosides, gallic tannins, flavonoids, alkaloids and the absence of mucilage and catechinic tannins in the seeds of nigella.

Dosages of polyphenols and flavonoids in vegetable oil, methanoic extract and aqueous extract showed that the highest content was obtained in the vegetable oil (81.91 mg EAG/g E and 5.71 mg EC/g E respectively).

Antibacterial activity was tested by the method of spreading the discs on a solid medium (the aromatogram), against four reference bacterial strains. The results obtained revealed that vegetable oil and methanoic extract showed inhibition on two Gram-positive strains (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*), the best inhibition was that of the methanoic extract on *S. aureus* with a significant inhibition diameter of the order of $24\text{mm}\pm 0.47$, Gram-negative strains (*E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) showed resistance to the extracts.

The evaluation of the antioxidant power of vegetable oil was carried out using the free radical trapping method DPPH. The results obtained indicated that *Nigella sativa*'s vegetable oil showed moderate antioxidant activity with an IC₅₀ value of about (309 $\mu\text{g/ml}$), which is higher than that recorded by ascorbic acid (272 $\mu\text{g/ml}$).

Keywords: *Nigella sativa*, vegetable oil, polyphenols, flavonoids, antimicrobial, antioxidant.

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 01 : Tige de <i>Nigella sativa</i> | 5 |
| Figure 02 : Feuilles de <i>Nigella sativa</i> | 6 |
| Figure 03 : Feurs de <i>Nigella sativa</i> | 6 |
| Figure 04 : Capsule (a) et graines (b) de <i>Nigella sativa</i> | 7 |
| Figure 05 : Dosage des polyphenols des extraits de nigelle (Kim et al. 2003)..... | 22 |
| Figure 06 : Dosage des flavonoïdes des extraits de nigelle (Djeridane et al.,2006)..... | 23 |
| Figure 07 : Détermination in vitro du pouvoir antibactérien..... | 24 |
| Figure 08 : Réaction de test DPPH (1,1- Diphenyl-2-picrylhydrazyl)(congo , 2012)..... | 26 |
| Figure 09 : Action de l'huile végétale pure et de l'extrait méthanoïque sur la souche..... bactérienne (<i>Staphylococcus aureus</i>) | 35 |
| Figure 10: Résultat du test antioxydant de la Vit C et HV au DPPH..... | 37 |
| Figure 11 : Valeurs d'IC50 de HV et la Vit C..... | 39 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 01 : Classification de <i>Nigella sativa</i> . (Guignard, 2001)..... | 5 |
| Tableau 02 : Composition des graines de <i>Nigella sativa</i> , (Ansari, 1988 ; Aljassir, 1992)..... | 9 |
| Tableau 03 : Taux des lipides de l'huile fixe de <i>Nigella sativa</i> extraite par différentes Méthodes (Atta, 2003)..... | 12 |
| Tableau 04 : Espèces bactériennes testées..... | 16 |
| Tableau 05 : Degré de sensibilité des souches microbiennes selon le diamètre de la zone d'inhibition..... | 25 |
| Tableau 06 : Rendement des différents extraits..... | 29 |
| Tableau 07 : Propriétés organoleptiques des extraits..... | 30 |
| Tableau 08 : Résultats du screening phytochimique de graines de <i>Nigella sativa</i> | 31 |
| Tableau 09 : Taux de polyphénols et de flavonoïdes de l'huile végétale, l'extrait méthanoïque et l'extrait aqueux en (mg EAG/g E), et en (mg EC/g E)..... | 32 |
| Tableau 10 : Diamètres des zones d'inhibitions de l'huile végétale, l'extrait méthanoïque, l'extrait aqueux et la poudre..... | 33 |

Liste des abréviations

DPPH: 2,2-Diphényl-1-Picrylhydrazyl.

MH : Muller Hinton.

GN : Gélose nutritive.

EAG : Equivalent d'acide gallique.

EC50: Concentration effective à 50%.

EQ : Equivalents de quercitrine.

EC : Equivalent Catéchine.

IC50 : Concentration inhibitrice à 50%.

HV : Huile végétale.

HE : Huile essentielle.

EAq: Extrait aqueux.

EM : Extrait méthanoïque.

TQ : Thymoquinone.

NO : Oxyde Nitrique.

NOS : Oxyde Nitrique Synthase.

ARNm : Acide Ribonucléique Messenger.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

ZI : Zone d'inhibition.

D.O : Densité optique.

***E. coli* :** *Escherichia coli*.

Vit C : Vitamine C.

***N. sativa* :** *Nigella sativa*.

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction 1

Chapitre 1: synthèse bibliographique

| | |
|---|----|
| 1. Généralités..... | 4 |
| 2. Dénomination et classification de la nigelle | 5 |
| 3. Description botanique de la nigelle | 5 |
| 4. Utilisation de la nigelle | 7 |
| 5. La composition de la nigelle..... | 8 |
| 6. Toxicité de la nigelle | 10 |
| 7. Huile essentielle de <i>Nigella sativa</i> | 11 |
| 8. Huile végétale de <i>Nigella sativa</i> | 12 |
| 9. Activités biologiques et propriétés pharmacologiques de la nigelle | 12 |
| 9.1.Activité antimicrobienne | 13 |
| 9.2.Activité antioxydant | 13 |
| 9.3.Activité anti-inflammatoire..... | 14 |

Chapitre 2: Matériel et méthodes

| | |
|--|----|
| 1. Matériel | 16 |
| 2. Méthodes | 16 |
| 2.1. Extraction des huiles essentielles..... | 16 |
| 2.2. Extraction des huiles végétales..... | 17 |
| 2.3. Préparation de l'extrait méthanoïque..... | 18 |
| 2.4. Préparation de l'extrait aqueux..... | 18 |
| 2.5. Test du screening phytochimique..... | 19 |
| 2.6. Dosage des polyphénols..... | 20 |
| 2.7. Dosage des flavonoïdes..... | 22 |
| 2.8. Etude de l'activité antibactérienne..... | 22 |
| 2.9.Etude de l'activité antioxydant..... | 24 |

Chapitre 3: Résultats et discussions

| | |
|---|----|
| 1. Rendement des différents extraits..... | 28 |
| 2. Le screening phytochimique..... | 30 |
| 3. Teneurs des polyphénols et flavonoïdes..... | 31 |
| 4. Activité antibactérienne des extraits | 33 |
| 5. Activité antioxydant de l'huile totale | 37 |
| Conclusion..... | 42 |
| Références bibliographiques..... | 45 |
| Annexes | |

Introduction

La recherche de nouveaux agents pharmacologiques actifs via le screening de sources naturelles a conduit à la découverte d'un grand nombre de médicaments utiles qui commencent à jouer un rôle majeur dans le traitement de nombreuses maladies humaines (**Dumaset al, 2002**).

A cet égard, les extraits de plantes sont généralement considérés comme une source riche en composés naturels antimicrobiens qui ont été largement étudiés, et sur lesquels sont basées les médecines traditionnelles. De même, selon l'OMS (2008), plus de 80% de la population mondiale utilisent les plantes médicinales pour traiter plusieurs maladies (**Pierangeli et al., 2009**).

Le pouvoir de guérison des plantes provient des effets de leurs métabolites secondaires. Ces métabolites interviennent dans la défense contre les parasites pathogènes. On distingue plusieurs groupes métabolites notamment les phénols (simples phénols, acides phénoliques, quinones, flavonoïdes, flavones, flavonols, tannins et les coumarines), les alcaloïdes, les terpénoïdes et polypeptides (**Cowan, 1999**).

Des techniques chimiques (extraction, distillation,...etc), peuvent permettre l'isolation du principe actif pour l'utiliser en pharmacie. Ces remèdes naturels sont bien souvent très efficaces avec moins d'effets secondaires reconnus que beaucoup de médicaments de synthèse, mais peuvent néanmoins être mortels ou toxiques pour l'organisme lorsqu'ils sont mal utilisés (**Duraffourd et al, 1997**).

L'Algérie par sa position biogéographique offre une très grande diversité écologique et floristique, estimé à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques (**Hanifi, 1991**).

Parmi les plantes médicinales les plus utilisées on trouve *Nigella sativa* et particulièrement ses graines. De nombreux composés naturels isolés à partir de cette plante ont démontré un large spectre d'activité biologique. Parmi ces différents extraits les huiles végétales se sont avérées avoir divers effets pharmacologiques: comme antispasmodique, carminative, hépato protecteur, antiviraux, anticancéreux, antibactérien (**Bowles, 2004; Lahlou, 2004**) et antioxydants (**Viuda-Martos et al, 2011**).

Les propriétés thérapeutiques des graines de la nigelle peuvent être dues, soit à l'effet de son huile végétale ou bien de ses huiles essentielles ou encore des autres principes actifs (tanins,

flavonoïdes ...etc.). Ces différents extraits peuvent aussi agir en synergie lorsque la graine est utilisée en totalité sous forme de poudre.

Dans ce contexte et dans le but de prouver et mettre en évidence l'efficacité des différents extraits des graines de *Nigella sativa*, nous nous sommes intéressés à évaluer les activités antibactériennes et antioxydant de différents extraits : huile végétale, huile essentielle, extraits méthanoïque, extrait aqueux et de la poudre des graines de nigelle. Nous avons fixé comme objectifs :

- Extraction de l'huile végétale et de l'huile essentielle.
- Préparation de l'extrait méthanoïque et l'extrait aqueux.
- Analyse phytochimique qualitative des graines de nigelle par un screening phytochimique.
- Dosage des polyphénols et des flavonoïdes des différents extraits : l'huile végétale, l'extrait méthanoïque et l'extrait aqueux.
- Evaluation de l'activité antibactérienne des différents extraits et de la poudre de graines de nigelle.
- Etude de l'activité antioxydant de l'huile végétale

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Nigella sativa L

1. Généralités

La nigelle a été trouvée sur la tombe de Toutankhamon, elle était considérée par les Egyptiens de l'antiquité comme une panacée. Chez les Grecs anciens, la nigelle était considérée comme un remède précieux dans le traitement des affections hépatiques et digestives. Pour Dioscoride (médecin Grec du premier siècle et auteur de *De Materia Medica*), les graines de nigelle étaient utilisées pour traiter les maux de tête, les algies dentaires, la congestion nasale et comme diurétique. Ces graines ont été aussi utilisées pour favoriser les menstruations, combattre les vers intestinaux et comme galactagogues (**Ghedira et Le Jeune, 2010**).

Nigella sativa est connue depuis l'antiquité par ses propriétés curatives, c'est une herbe annuelle originaire de la région méditerranéenne, notamment la Syrie, la Turquie et les pays d'Afrique du nord, elle est maintenant cultivée dans plusieurs régions du monde notamment en Moyen Orient, et Asie Occidentale, en Inde, en Iraq (**Hawssawi et al, 2001**). Elle est cultivée dans les régions tropicales et semi arides (**Raj Kapoor et al, 2002**). Les pays producteurs de la nigelle sont principalement la Syrie, l'Égypte, l'Arabie Saoudite, la Turquie, l'Iran, le Pakistan et l'Inde (**Kokdil et al, 2005**).

En Algérie, la nigelle est cultivée uniquement de manière traditionnelle principalement dans les oasis. La culture de cette espèce est peu développée (**Anonyme, 2000**).

2. Dénomination et classification:

Le nom de *Nigella* provient du latin *nigellus* "noirâtre", la nigelle a des petites graines aromatiques menées d'un noir intense communément connues sous le nom de cuminnoire, black seed en anglais, Habbat el baraka ou encore El habbahsauda dans les pays arabes, Sinoudj en Algérie (**Ghedira, 2006**)

La famille des renonculacées comprend une trentaine de genres et environ 1200 espèces (**Negre, 1962**). Le genre *Nigella* L. (Ranunculaceae) inclut environ 20 espèces diffusées dans les régions méditerranéennes et en Asie occidentale (**Kökdil, 2005**).

Selon la classification botanique des Angiospermes de **Cronquist (1988)** basée sur les critères morphologiques, anatomiques et chimiques, *Nigella arvensis* est une plante à graines, donc elle fait partie de l'embranchement des Spermaphytes.

La classification botanique de la nigelle donnée par **Guignard (2001)** est montrée dans le tableau suivant :

Tableau 01 : Classification de *Nigella arvensis* (**Guignard 2001**).

| | |
|---------------------------|--------------------------------|
| Règne | Plantae |
| Embranchement | Spermaphytes |
| Sous embranchement | Angiospermes |
| Classe | Dicotylédones |
| Ordre | Renonculales |
| Famille | Renonculaceae |
| Genre | Nigella |
| Espèce | <i>Nigella arvensis</i> |

3. Description botanique :

Nigella arvensis est une plante annuelle herbacée à tige dressée, côtelée, anguleuse et rameuse (**fig 1**) d'une soixantaine de centimètres de hauteur (**Bonnier, 1990 ; Ghedira, 2006**)



Figure 01 : Tige de *Nigella arvensis*.

Les feuilles pennatiséquées, divisées en lobes étroits, sont lancéolées à linéaires et présentent des onglets nectarifères (**fig 2**). Elles ressemblent à des pattes d'araignée ou bien s'apparentent au fenouil, d'où son surnom « fleur de fenouil ». Les feuilles inférieures sont

petites et pétaloïdes et les supérieures sont longues. Elles sont disposées en face à face (Moussaoui, 2013).



Figure 02 : Feuilles de *Nigella sativa*.

Les fleurs sont solitaires (**fig 3**), axillaires et terminales, bisexuées, radiales, très riches en Nectar (Bonnier, 1990). Elles sont petites à pétales blanchâtres et sépales pétaloïdes et présentent de nombreuses étamines insérées sur le réceptacle (**Ghedira, 2006**).



Figure 03 : Fleurs de *Nigella sativa*.

La plante est hermaphrodite à reproduction autonome dont le fruit est une capsule formée de 3 à 6 carpelles soudés entre eux jusqu'à la base des styles persistants (Bonnier, 1990). Chaque capsule (**fig4.a**) contient plusieurs graines triangulaires blanchâtres et à maturité, elles s'ouvrent et l'exposition des graines à l'air les rend noire, ses graines sont ovoïdes (**fig4.b**) de 2 à 3.5 mm présentent 3 à 4 angles avec une face supérieure finement granuleuse et réticulée

(Ghedira, 2006). Au broyage elles dégagent une odeur fortement aromatique, tenant du poivre et de l'anis et aussi de la noix de muscade (Wichtl, 2003).



3Figure 04 : capsule (a) et graines (b) de *Nigella sativa*.

4. Utilisation :

4.1. Usages traditionnels et thérapeutiques :

Cette plante occupe une place spéciale pour son grand spectre d'application médicale dans la civilisation islamique, dû au hadith du **Prophète Mohammed (salut et miséricorde de Dieu soit sur lui)** : « Soignez-vous en utilisant la graine noire, car elle contient un remède pour toutes les maladies à l'exception de celle qui est toxique, donc équivaut la mort ». (Al-Bukhari n°5687). Ces paroles sont restées pour longtemps un mystère pour la science jusqu'à l'arrivée de techniques modernes qui ont réussi à prouver les vertus thérapeutiques des graines de cette plante miraculeuse (Meziti, 2009).

Les investigations pharmacologiques sur les extraits de graines de nigelle indiquent un large éventail d'activités allant d'une amélioration de la réponse immunitaire (Medinica et al., 1994) jusqu'à un effet antihistaminique (Kanter et al., 2006), antidiabétique (Al-Hader et al., 1993), anti-hypertensif (El Tahir et al., 1993), antioxydant (Ramadan et Mørsel, 2003), anti-tumoral (Ait Mbarek et al., 2001) et anti-inflammatoire (Houghton et al., 1995). Cette activité peut englober un effet anti-ulcéreux (Raj Kapoor et al., 2002) et même une action antimicrobienne (El-Alfyet et al., 1975).

Ibn al-Qayyim affirme aussi dans le chapitre « La médecine prophétique » de son ouvrage « Le bagage pour l'au-delà » que L'application de l'huile de nigelle avec d'autres éléments (l'huile d'olive, du miel d'abeille, de la graines de girofle et d'orge pilées, ainsi que le vinaigre) peuvent soigner plusieurs maladies telles que le rhume, la migraine hémicéphalique, le mal de dent, le traitement de l'insomnie et de l'insuffisance respiratoire, l'asthme, les maux de l'estomac et des intestins. **(Blumenthal et al., 2002).**

4.2. Usages comme épice :

Les graines de nigelle entières ou moulues sont utilisées comme épice. Elles servent à saupoudrer le pain, le Nan (pain de régions d'Asie centrale et du sud) et les pâtisseries, les plats sucrés, les fromages, les sauces et les soupes pour les rendre plus appétissants. Elles sont également utilisées en accompagnement des graines de sésame dans la cuisine traditionnelle d'Asie, et sont ajoutées à différents plats selon les envies **(Vonarburg, 1998).**

Dans la région du Bengale, entre l'Inde et le Bangladesh, le cumin noir entre dans les recettes de légumes secs et dans la composition de certains mélanges d'épices comme le panchphoron, composé de cinq épices : le cumin, le fenouil, la moutarde, le fenugrec et la nigelle **(Panchphoron, 2012).**

En Afrique du nord, la graine de nigelle moulue entre dans la composition du ras el hanout, un mélange de 24 à 27 épices. En Égypte, les graines pulvérisées aromatisent le café à raison de 6 cuillères à café pour une cuillère de nigelle. En France, on l'utilise comme le poivre. En Algérie, les graines de nigelle sont utilisées beaucoup plus dans la boulangerie. Du point de vue artisanal, ces graines sont aussi utilisées pour garnir le pain traditionnel (khobz el dar) **(Vonarburg, 1998).**

Les graines de *Nigella sativa* étant très utilisées dans l'alimentation, ces données permettent déjà de les qualifier comme ayant une bonne valeur nutritive **(Nergiz, 1991).**

5. Composition :

5.1. La composition chimique :

La composition générale des graines de *Nigella sativa* 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 02 :

Tableau 02 : Composition des graines de *Nigella sativa*, (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 |

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).

Les graines de *N. sativa* renferment environ 0,4-2,5% d'huile essentielle, une forte teneur en huiles grasses (plus de 30%) constituée des esters du glycérol, des acides linoléique, oléique et palmitique ; mais aussi de phospholipides, glycolipides, tocophérols, stérols particuliers et surtout de dérivés phénoliques actifs : thymoquinone, thymohydroquinone et thymol (Dominiczak, 1991 ; Hashim, 1982).

5.2. Les composés phénoliques :

Les polyphénols de *Nigella sativa* (Figure 4) sont les plus actifs pharmacologiquement. A partir de l'huile, 04 constituants ont été isolés et identifiés structuralement par HPLC et RMN ; la thymoquinone, le dithymoquinone, le thymohydroquinone et le thymol (Gilani et al., 2004 ; 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 I et al, 1997).

Une étude menée en 2008 sur des extraits méthanoliques obtenus à partir des parties aériennes

et des racines de *Nigella sativa* a permis d'isoler de nombreux flavonoïdes et acides phénols. L'analyse du contenu phénolique par RP-HPLC a révélé que l'acide vanillique est le composé majeur dans les parties aériennes et les racines, présentant des teneurs de 143,21 et 89,94 mg par 100 g de matière sèche (**Bourgou S et al, 2008**).

5.2.1. Les 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 M et al, 1985**) :

- La nigellicine et la nigellidine, avec un noyau indazoléique.
- 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.

5.2.2. Les 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 (**Greenish H, 1880**).

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 éninetriterpénique. Ces saponosides peuvent contenir 2, 3 ou 6 sucres.

6. Toxicité :

Les graines de nigelle sont largement consommées comme épice et comme plante médicinale, il est important donc de savoir que la toxicité de la nigelle est pratiquement nulle en ce qui concerne la consommation des graines, de l'huile ou de l'extrait aqueux. Seules la

thymoquinone et l'huile essentielle possèdent une toxicité chez la souris en injection intra péritonéale. Cependant, il manque encore des études sur la tolérance cutanée de l'huile, la mutagénicité et la toxicité de l'huile essentielle par voie orale (**Fabienne Orsi, 2005**).

7. Huile essentielle :

L'huile essentielle de la nigelle s'obtient 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 et les conditions environnementales. On obtient entre 1,4 à 1,9 % du poids de l'huile fixe et 0,18 à 0,50 % du poids des graines (**Benkaci-Ali Fet al, 2006**). L'analyse de cette huile par GC-MS réalisée par l'équipe de Bucar (2000) a permis d'identifier 32 composants, dont la majorité d'entre eux sont ;lathymoquinone (27,8%-57 %), p-cymène (7,07-15,83 %), carvacrol (5,8-11,6 %), longifolène (1,2-8 %), 4-terpinol (1,98-6,59 %), et le tanethol (0,25- 4,28 %) (**Burits M et al, 2000**).

L'huile essentielle de *Nigella sativa L* cultivée au Sahara algérien (Timimoune et Adrar), extraite par deux méthodes différentes; l'hydro distillation et distillation par micro-onde a été analysée par CPG et GC-MS, 112 composés ont été identifiés et caractérisés, le p-cymène représente toujours le composé le plus abondant suivi de la thymoquinone (**Benkaci-Ali et al 2007**).

8. Huile végétale :

Généralement les huiles végétales *Nigella Sativa* extrait à froid sont majoritairement composées de triglycérides (57,50%) et contiennent une faible fraction de lipides polaires (3,70%), des monoacyl-glycérol et diacyl-glycérol avec des proportions respectives de 4,80% et 5,10%. On y trouve aussi des stérols libres et estérifiés (**Tableau 3**)(**Ramadan M. F et al 2002**). L'huile obtenue par pression à froid est de couleur jaune doré, alors que celle extraite par solvant est jaune brunâtre ; ceci serait dû à la capacité du solvant à extraire les pigments liposolubles et les oléorésines présentes dans les graines de Nigelle.

Tableau 03 : Taux des lipides de l'huile fixe de *Nigella sativa* extraite par différentes Méthodes (Atta, 2003).

| Composants | Extraction par pression à froid (%) | Extraction à chaud par solvant apolaire (%) |
|--------------------|-------------------------------------|---|
| Lipides polaires | 03.70 | 04.80 |
| Monoacyl-glycerol | 04.80 | 05.70 |
| Diacyl-glycerol | 05.10 | 04.10 |
| Stérols libres | 03 | 05 |
| Inconnu | 05.40 | 04.50 |
| Acides gras libres | 14.20 | 08.30 |
| Triacyl-glycerol | 57.50 | 63..20 |
| Stérols esters | 02.50 | 04.40 |

9. Activités biologiques et propriétés pharmacologiques de *Nigella sativa* :

9.1. Activité antimicrobienne :

Les différents extraits des graines de *Nigella sativa* présentent un large spectre d'inhibition vis-à-vis de nombreuses souches bactériennes. tels que; *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* (Hanafy et Hatem, 1999 ; Morsi, 2000 ; Khan et al., 2003).

L'huile essentielle même diluée à 1%, la dithymoquinone ainsi que l'extrait méthanolique exercent une importante activité antibactérienne sur des germes Gram positif et Gram négatif, (Agrawal et al., 1979 ; Aljabreet al., 2005).

L'huile de la Nigelle possède également un pouvoir inhibiteur supérieur à celui de la gentamicine sur une vingtaine de souches de *Listeria monocytogenes* (Nair et al., 2005). Différents extraits bruts issus de la graine ont été testés vis-à-vis de germes antibiorésistant (16 Gram négatifs et 6 Gram positifs), les alcaloïdes totaux et le décocté se sont révélés être les extraits les plus actifs, notamment à l'égard des bactéries à gramme positif (Morsi, 2000).

L'huile fixe présente également une excellente activité antifongique, notamment sur *Aspergillus niger* (Aggarwal et al., 1979). Par ailleurs, l'extrait à l'éther et la thymoquinone exercent une activité inhibitrice sur huit espèces de dermatophytes (Aljabre et al., 2005). En plus des activités antibactériennes et antifongiques, l'huile de *Nigella sativa* possède aussi un effet antiviral *vis-à-vis* le virus de l'herpès : *cytomégalo virus murin* (MCMV) (Salem, 2005).

9.2. Activité antioxydante in vitro :

L'huile fixe de *Nigella sativa* ainsi que la thymoquinone (composé majoritaire dans l'huile essentielle) inhibe la lipoperoxydation lipidique non enzymatique dans les liposomes (Houghton et al., 1995). La thymoquinone, le carvacrol, le trans-anéthole et les 4 terpinéols (composés majoritaires de l'huile essentielle) exercent un important effet piègeur de radicaux libres (Burits et Bucar, 2000). Ces mêmes constituants sont responsables de propriétés antioxydants variables sans présenter d'effet pro-oxydant (Swamy et Huat, 2003 ; Ilhan et al., 2005) . L'huile fixe et ses fractions, lipides neutres, glycolipides et phospholipide, montrent une activité antioxydante *vis-à-vis* des deux radicaux libres stables (DPPH et le radical glavinoyl). Cette activité antioxydant est corrélée avec la teneur en acides gras polyinsaturés, en composés insaponifiables et en phospholipides, de même que la valeur peroxyde initiale de l'huile (Ramadan et Morsel, 2003).

A coté de l'huile, qui a été largement étudiée pour ses propriétés antioxydantes, les extraits méthanoïque et aqueux des graines de *Nigella sativa* délipidées ont présenté une activité anti-oxydante importante, comparable à celle du TBHQ (tert-butyl hydroquinone) (Atta et Imaizumi, 1998).

9.3. Activité anti-inflammatoire :

La propriété anti-inflammatoire des graines de *Nigella sativa* est bien reconnue depuis des siècles, elle est recommandée pour le traitement des maladies inflammatoires. Plusieurs travaux rapportent que la thymoquinone (TQ) est le principe actif essentiel responsable de l'effet anti-inflammatoire des extraits de *Nigella sativa*; la TQ s'est avérée être un puissant inhibiteur de la thromboxane B2 et des leucotriènes B4 par l'inhibition respective des cyclooxygénase et lipooxygénase (El-Dakhkhny et al., 2002 ; Hajhashemi et al., 2004). C'est un inhibiteur efficace de la production des leucotriènes par l'inhibition de la Leucotriène-C4-synthase (LT4 synthase) (Mansour et Tornhamre, 2004). Plusieurs

auteurs ont étudié l'éventuelle activité anti inflammatoire d'extraits ou de composés purs issus de *Nigella sativa*, En 2002, **El-Mahmoudy et al** démontrent que la TQ inhibe la production de NO par la réduction de l'expression de l'ARNm du NOS. Cependant, l'activité de l'huile fixe sur les cyclooxygénases et lipooxygénases est plus importante que la TQ elle-même; l'activité anti-inflammatoire n'est pas donc entièrement due à la présence de la TQ. Des acides gras insaturés de type C20: 2 semblent être impliqués. Donc les composants des huiles de *Nigella sativa* agissent avec trois types de mécanismes anti-inflammatoires ; l'inhibition de la production d'eicosanoïdes, l'inhibition de la synthèse de prostaglandines et la diminution de la production de monoxyde d'azote (**Houghton et al., 1995 ; Gilani et al., 2004**).

Chapitre II: Matériel et méthodes

Notre travail s'est étalé sur une période de 6 mois (janvier-juin 2019), au niveau des laboratoires suivants :

- Laboratoire de recherche des plantes aromatiques et médicinales du département de biotechnologie, université de Blida 1, où a été réalisée l'extraction de l'huile végétale.
- Laboratoire d'hygiène de la wilaya de Tipasa où ont été réalisées d'autres extractions (extraits aqueux et méthanoïque), et les tests de l'activité antibactérienne et de l'activité antioxydant.

1. Matériel

1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal consiste à des graines de la plante médicinale : la nigelle (*Nigella sativa*). Les graines ont été achetées durant le mois de janvier 2019, au niveau d'une herboristerie située à El Affroun (wilaya de Blida).

1.2. Matériel microbiologique

Les tests antibactériens ont été effectués sur des souches de références (**Tableau 04**) qui ont été fournis par le laboratoire d'hygiène de la wilaya de Tipasa.

Ces espèces bactériennes ont été choisi parce qu'elles représentent les espèces à Gram positif et à Gram négatif les plus communes, responsables d'infections nosocomiales et résistantes aux antibiotiques (**Levy, 2001**).

Tableau 04 : Espèces bactériennes testées

| Espèces Gram positif | Espèces Gram négatif |
|---|--|
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 |
| <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 |

2. Méthodes

2.1. Extraction des huiles essentielles

Principe

Les huiles essentielles ont été extraits par hydrodistillation. Cette méthode consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou éventuellement broyé) dans un

alambic rempli d'eau distillée qui est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différentes densité (BRUNETON, 1999).

Mode d'opérateur

Mettre 90g des graines sec dans un ballon rond de 1000 ml et introduire 750 ml d'eau dans le même ballon.

Chauffer le contenu avec une chauffe ballon. La vapeur se change de substance volatils, puis condensé grâce un réfrigérant, Poursuivre la distillation jusqu'à obtention de maximum des HE, La récupération des HE est faite après la lecture du rendement à l'aide de la burette graduée attaché à l'appareil.

2.2.1. Détermination du rendement en huiles essentielles

Le rendement est obtenu par rapport à la matière végétale sèche et exprimé selon la formule ci-dessous :

$$R_H = (V/M_{MV}) \cdot 100$$

Où :

R_H : Rendement des huiles essentielles en (ml) par apport à 100g de matière sèche (%).

V : volume d'huile essentielle en (g).

M_{MV} : masse de la matière végétale sèche (g).

2.2. Extraction des huiles fixes végétales

L'extraction de l'huile végétale est réalisée selon le protocole de Ramadan et Mörsel (2002). Au préalable, les graines sont débarrassées des débris terreux et végétaux puis broyées à l'aide d'un broyeur électrique. Un poids donné (20 g) de ce broyat est disposé dans une cartouche cellulosique, puis la cartouche est introduite dans l'extracteur «Soxhlet» équipé à sa base d'un ballon contenant 300 ml d'éther de pétrole. Le solvant est porté à ébullition à l'aide d'une chauffe ballon pendant 3 heures.

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

$$MG \% = \frac{P1-P2}{ME} \times 100$$

Où :

P1 : poids du ballon après évaporation

P2 : poids du ballon vide

MG : taux de la matière grasse

2.3. Préparation des extraits méthanoïques

Une prise d'essai de 5g de poudre des gaines de *Nigella sativa* a été mise à macérer dans 50 ml de méthanol absolu sous agitation magnétique pendant 30min. L'extrait a ensuite été stocké à 4°C durant 24 h, filtré et le solvant évaporé à sec sous pression réduite à 50°C à l'aide d'un évaporateur rotatif (Falleh et al. 2008).

La fraction retenue à partir du produit filtré subira la même opération qui sera répétée encore une deuxième fois. Les deux extraits obtenus vont être séchés à l'aide de l'évaporateur rotatif et récupérer par du méthanol.

Le tout est conservé dans des tubes recouverts par du papier aluminium afin d'éviter la photo-oxydation, à 4°C jusqu'à l'utilisation. Le rendement de l'extrait est calculé par la formule suivante :

$$R\% = M/Mo \times 100$$

R%: Rendement exprimé en pourcentage.

M : Masse en gramme de l'extrait résultant.

Mo : Masse en gramme du matériel végétal traité.

2.4. Préparation des extraits aqueux

10g de poudre des graines de *Nigella sativa* dissous dans 150ml d'eau distillée ont été chauffés à reflux pendant 2h, Après filtration; le filtrat a ensuite été évaporé à sec sous pression réduite à 65°C à l'aide d'un évaporateur rotatif et récupérer par de l'eau physiologique (Majhenic et al., 2007).

Le tout est conservé dans des tubes recouverts par du papier aluminium afin d'éviter la photo-oxydation, à 4°C jusqu'à l'utilisation. Le rendement de l'extrait est calculé par la formule suivante :

$$R\% = M/Mo \times 100$$

R%: Rendement exprimé en pourcentage.

M : Masse en gramme de l'extrait résultant.

Mo : Masse en gramme du matériel végétal traité.

2.5. Test du screening phytochimique

Ce test consiste à détecter les différentes familles chimiques existantes dans la partie étudiée de la plante soit sur la poudre de broyat, soit sur un infusé par les réactions qualitatives de caractérisation. ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composé (**bouyer, 1996**).

2.5.1. Préparation de l'infusé

A 10 g de poudre végétale, sont ajoutés 100 ml d'eau distillée bouillante, laissé infuser pendant 15 min avec agitation de temps en temps, après filtrer récupère le surnageant a l'aide d'une pipette.

2.5.2. Identification de quelques métabolites secondaires

▪ Les anthocyanes

A 5 ml d'infusé, sont ajoutés quelques gouttes d'ammoniaque ½. L'apparition d'une couleur rouge, indique la présence des anthocyanes.

▪ Les tanins

A 5 ml d'infusé, sont ajoutés quelques gouttes d'une solution de FeCl₃ à 5%. la réactions donne une coloration bleue noir en présence des tanins.

✓ Les tanins catéchiques

15 ml d'infusé, sont additionnés à 7 ml de réactif de Stiasny (10 ml de formol a 40 % et 5ml d' HCL concentré. La réaction donne une coloration rouge en présence des tanins catéchique.

✓ Les tanins galliques

A 5 ml d'infusé, sont ajoutés 2 g d'acétate de sodium et quelques gouttes de FeCl_3 . La réaction donne une coloration bleue foncée en présence des tanins galliques.

- **Les flavonoïdes**

A 5 ml d'infusé, sont additionnés 5 ml d'HCL, un copeau de Mg et 1 ml d'alcool isomylique. La réaction donne une coloration rouge en présence des flavonoïdes.

- **Les alcaloïdes**

Introduire 1 g de poudre végétale dans un tube à essai, ajouter 10 ml d'acide sulfurique 10 %. Agiter énergiquement pendant 2 min et filtrer, ajouter 2 gouttes du réactif de Dragendorff.

Résultats : apparition d'un précipité rouge orangé.

- **Les glucosides**

A 2 g de poudre végétale, sont ajoutées quelques gouttes d'acide sulfurique. La formation d'une coloration rouge brique ensuite violette indique la présence des glucosides.

- **Les mucilages**

On Introduit 1 ml de l'infusé dans un tube et on lui ajoute 5 ml d'éthanol absolu, l'obtention d'un précipité floconneux indique la présence des mucilages.

2.6. Dosage des composés phénoliques

2.6.1. Dosage des polyphénols

- ✓ **Principe**

Le contenu en polyphénols est mesuré par la méthode de Folinciocalteu dont le principe repose sur la réduction du réactif de Follin par les composés phénoliques. Cette réaction d'oxydation des phénols s'accompagne par l'apparition d'un complexe bleu et qui est stabilisé par l'adition de carbonate de sodium (NaCO_3) (Dif et al., 2015).

- ✓ **Mode opératoire**

Les différentes étapes de La méthode adoptée pour le dosage des polyphénols, décrite par Kim et al (2003) sont montrées dans la figure 05 :

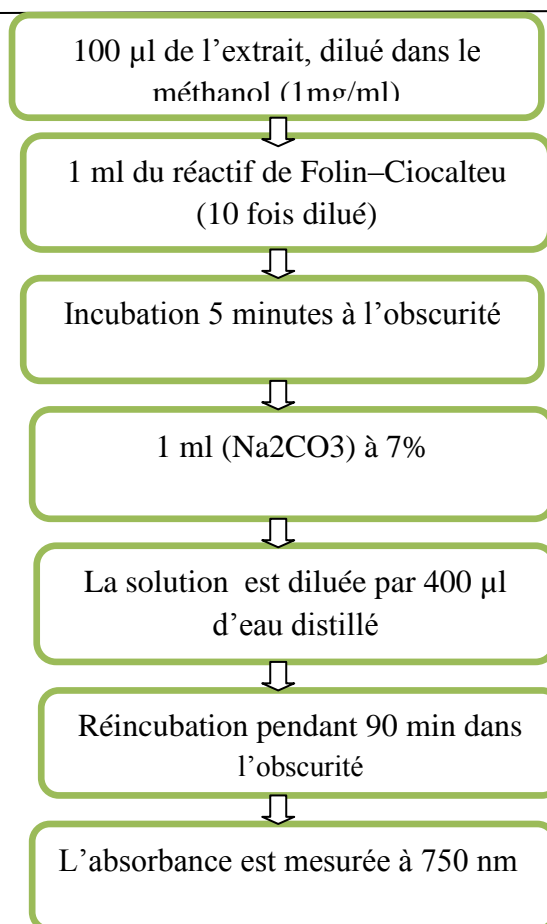


Figure 05: Dosage des polyphénols des extraits de nigelle.

NB : un blanc a été préparé en mélangeant le réactif de Folin-Ciocalteu (1ml) avec Na₂CO₃ (7 %) à volume égale.

✓ Expression des résultats

Les concentrations des phénols totaux ont été exprimées en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mgEqAG/g E), calculées en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions réactionnelles avec l'acide gallique comme phénol standard par la formule suivante :

$$\text{TCP} = \text{C} \cdot \text{V} / \text{m}$$

Où :

C: Concentration de l'extrait.
V: Volume de solvant utilisé pour l'extraction.
m: Masse en grammes de la prise d'essai.

TCP : teneur en composé phénolique.

2.7. Dosage des flavonoïdes

✓ Principe

Le dosage des flavonoïdes totaux est estimé selon la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) dont le principe est basé sur l'oxydation des flavonoïdes par le AlCl_3 entraînant ainsi la formation d'un complexe brunâtre qui absorbe à 510nm (Dif et al., 2015).

✓ Mode opératoire

Les différentes étapes de La méthode adoptée pour le dosage des flavonoïdes, décrite par Djeridane et al (2000) sont montrées dans la figure 06 :

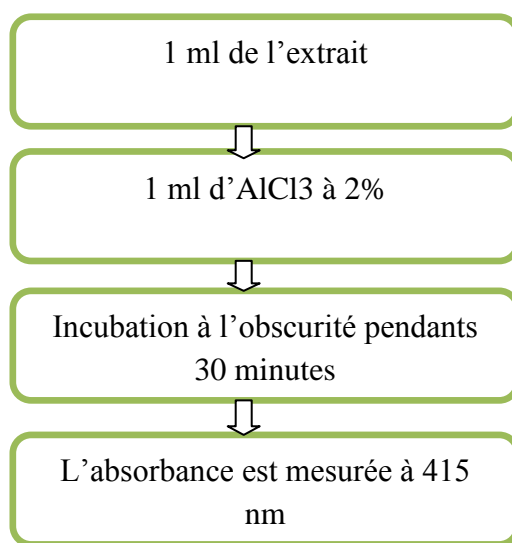


Figure 06 : Dosage des flavonoïdes des extraits de nigelle.

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

✓ Expression des résultats

La concentration des flavonoïdes contenus dans l'extrait de nigelle est exprimée en milligramme équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EqQ/g E) à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions réactionnelles avec la quercétine comme standard.

2.8. Etude de l'activité antimicrobienne

2.8.1. Méthode de diffusion des disques sur milieu solide (aromatogramme)

Cette technique a été décrite par plusieurs auteurs (**Zaika, 1989 ; Tyagi et al., 2013**). C'est la méthode que nous avons adoptée pour évaluer le pouvoir antimicrobien des extraits de la nigelle. Elle est basée sur une technique utilisée en bactériologie, l'antibiogramme. Le principe de cette méthode repose sur la diffusion du produit à tester (avec une concentration connue) en milieu solide, dans une boîte pétri préalablement ensemencée. L'agent antimicrobien diffuse dans le milieu, créant une zone claire d'inhibition de croissance du germe, autour du disque chargé d'agent antimicrobien (figure 07).

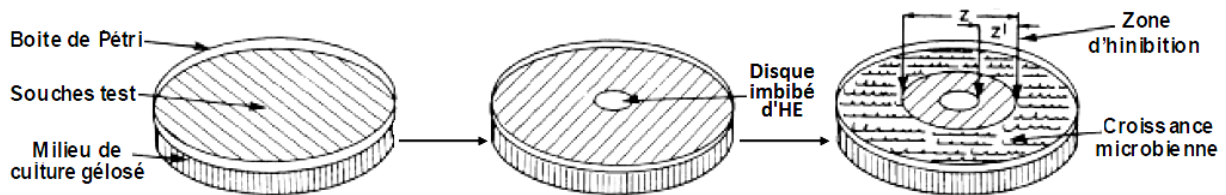


Figure 07 : Détermination in vitro du pouvoir antibactérien.

✓ Préparation de l'inoculum :

Chaque espèce est ensemencée au préalable sur une gélose nutritive, pour obtenir une culture de 18 à 24 h. Ensuite, 4 à 5 colonies bactériennes bien isolées sont mises en suspension dans des tubes contenant 5 ml de l'eau physiologique à 0,9 % NaCl.

✓ Préparation des milieux de culture :

- Liquefier le milieu de culture Muller Hinton pour les bactéries dans un bain marie.
- Sous hôte à flux laminaire, verser aseptiquement le milieu de culture gélosé sur les boîtes de Pétri à raison de 20 ml par boîte.
- Fermer et laisser refroidir et solidifier à température ambiante, et conserver dans des conditions évitant toute contamination ou modification de leur composition.

✓ Ensemencement :

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage à partir d'un inoculum. À l'aide d'un écouvillon stérile, introduit dans la suspension bactérienne et essoré contre la paroi interne du tube, réaliser des stries parallèles et aussi serrées que possible à la surface d'une boîte de Pétri

préalablement coulée avec la gélose de Mueller- Hinton. Répéter l'opération trois fois en tournant la boîte 60° et en tournant l'écouvillon sur lui-même.

✓ Préparation et dépôt du disque :

Des disques de papier filtre, de 6 mm de diamètre, sont préparés et stérilisés. Ils sont ensuite imprégnés de 10 et 30 µl de chaque extrait testée, et déposés à la surface de la boîte de Pétriensemencée. L'opération est répétée trois fois. Les boîtes de Pétri ainsi préparées sont incubées dans l'étuve à 37°C pendant 24h.

✓ Lecture des résultats :

La lecture des résultats se fait par la mesure, à l'aide d'une règle graduée, du diamètre de la zone d'inhibition formée autour du disque, en prenant la moyenne des trois essais effectués. (Gulluce et al., 2007). En fonction du diamètre d'inhibition on peut classer les souches étudiées en souches sensibles, intermédiaires ou résistantes (tableau 05) (Amana, 2007).

Tableau 05 : degré de sensibilité des souches microbienne selon le diamètre de la zone d'inhibition.

| Echelle de sensibilité des souches | Diamètre de la zone d'inhibition (mm) |
|------------------------------------|---------------------------------------|
| Non sensible / résistante (-) | Ø < 8 mm |
| Sensible (+) | 9 <Ø> 14 mm |
| Très sensible (++) | 15 <Ø> 19 mm |
| Extrêmement sensible (+++) | Ø > 20 mm |

2.9. Etude de pouvoir antioxydant de l'huile végétale

L'activité antioxydante in vitro a été évaluée par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH (1,1- Diphenyl-2-picrylhydrazyl) selon la méthode décrite par (Burits et Bucar, 2000).

2.9.1. Principe

Dans ce test les antioxydants : soit synthétiques ou naturels réduisent le diphénylpicrylhydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphénylpicrylhydrazine (**figure 08**) dont l'intensité de couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Sanchez-Moreno, 2002). La réduction du radical libre DPPH par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV- visible, en

mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants (**Molyneux, 2004**).

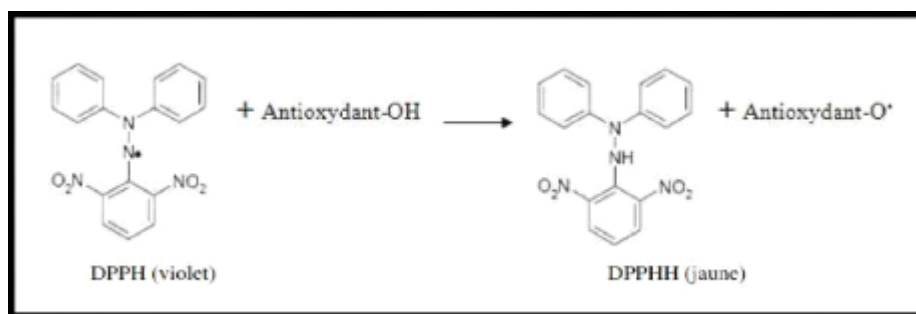


Figure 08 : réaction de test DPPH (1,1- Diphenyl-2-picrylhydrazyl) (**congo , 2012**).

2.9.2. Mode opératoire

La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2,4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol dont 50µl de chacune des solutions méthanoïques de l'huile végétale testée à différentes concentrations (200, 400, 600, 800 et 1000 µg/ml) après agitation sont mélangées avec 5 ml d'une solution méthanoïque de DPPH (0, 0024%).Après une période d'incubation de 30 minutes à la température ambiante, l'absorbance est lue à 517 nm. L'inhibition du radical libre DPPH par la vitamine C a été également analysée à la même concentration pour comparaison. On détermine la cinétique de la réaction et les paramètres de calcul de l'activité antioxydant pour la vitamine C et pour l'huile végétal. L'activité antioxydant a été estimée selon l'équation suivant :

$$\% \text{ d'activité antioxydant} = \frac{\text{Abscontrôle} - \text{Abséchantillon}}{\text{Abscontrôle}} \times 100$$

Où :

Abs contrôle : Absorbance contrôle négatif.

Abs échantillon : Absorbance du composé d'essai.

Les concentrations en huile végétale et en vitamine C, en fonction des pourcentages du DPPH inhibés, ont été tracées à la fin de la réaction afin d'obtenir l'index IC50. Ce paramètre est

défini comme la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du DPPH• initiale de 50 %.

Chapitre III : Résultats et discussion

1. Rendements des différents extraits

Les rendements en huile végétale, huile essentielle et en extrait méthanoïque des graines de *Nigella sativa* sont exprimés en pourcentage par rapport à la matière végétale sèche. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 06 :

Tableau 06: rendement des différents extraits.

| Extraits | Rendements (%) |
|---------------------|----------------|
| Huile végétale | 32.56 ± 3.21 |
| Extrait méthanoïque | 20 |
| Extrait aqueux | 30 |
| Huile essentielle | 0 |

L'extraction de l'huile végétale de la nigelle, réalisée par Soxhlet, a permis d'obtenir une huile de couleur brune jaunâtre avec un rendement de l'ordre de 32.56% ± 3.21. En comparaison avec d'autres travaux, cette teneur en huile fixe est comparable à celle obtenue pour la nigelle Egyptienne (34.78%) (**Atta, 2003**), elle est plus élevée par rapport à la nigelle Tunisienne (27.48%), et plus faible par rapport à la nigelle Iranienne (40.35%) (**Cheikh-Roubou et al, 2007**).

Le rendement de l'extrait méthanoïque est de 20%, ce résultat est comparable avec celle reporté par **Houcher et al (2007)** où ils ont montré que les graines de *Nigella sativa* ont un rendement de 21.5 % d'extrait méthanoïque.

L'extraction de l'huile essentielle des graines de nigelle a donné un rendement nul (0 %). Cela peut être expliqué par la longue durée et/ou le mode de conservation des graines.

L'huile essentielle de la nigelle s'obtient par distillation à la vapeur d'eau de l'huile végétale obtenue par première pression à froid (**Benkaci-Ali Fet al, 2006**).

Selon **Kacem et Mraïhi, (2006)** le rendement de l'huile essentielle dans les nouvelles graines séchées au bout de huit heures est plus élevé (0.4 ml par minute) et par 50 gramme.. Ce type de l'huile volatile peut être perdu en fonction de temps de stockage.

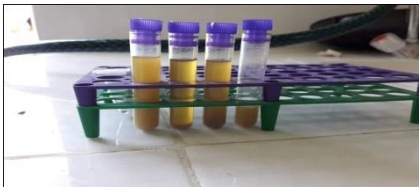


La composition chimique et le rendement en huiles essentielle varient suivant divers conditions, l'environnement, le bon matériel végétal, variété de la plante, l'origine géographique, le sol, la période de récolte, le séchage, la température et la durée de séchage, équipement de distillation, les parasites, les virus et les mauvaises herbes (**Svoboda et Deans, 1995**) et (**Smallfield, 2001**).


Toutefois, il est difficile de comparer les résultats des différent extraits, car le rendement n'est que relative et semble être lié aux propriétés génétiques des graines ainsi qu'à l'origine géographique, aux conditions et à la durée de stockage de la récolte et aussi aux méthodes d'extraction appliquées. (**Ribéreau-Gayon, 1968 ; Scchovic, 1990 ; Owen et Johns 1999**).

1.1. Propriétés

Les caractères de couleur, d'odeur et d'aspect des extraits des graines de la nigelle sont indiqués dans le tableau 07.

Tableau 07 : propriétés des extraits.

| Extrait | Aspect | Couleur |
|---------------------|--------------------------|--|
| Huile végétal | Huileux limpide (mobile) |  Brune jaunâtre |
| Extrait méthanoïque | Liquide (mobile) |  Jaune foncé |
| Extrait aqueux | Liquide (mobile) |  Jaune clair |

| | | |
|--------|--------|---|
| Poudre | Poudre |  <p style="text-align: center;">Noire</p> |
|--------|--------|---|

2. Le screening phytochimique

L'analyse qualitative de la poudre de la nigelle qui a pour but la mise en évidence la présence de certains types de métabolites secondaires, a été faite par les réactions qualitatives de caractérisations. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de coloration ou de précipitation par des réactifs spécifiques à chaque famille de composé.

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 08 : Résultats du screening phytochimique de graines de *Nigella sativa*

| Métabolites secondaires | Résultats |
|-------------------------|-----------|
| Anthocyane | + |
| Tanin | + |
| Tanin gallique | + |
| Tanin catéchique | - |
| Flavonoïde | + |
| Alcaloïde | + |
| Glucoside | + |
| Mucilage | - |

Présence +, absence-

Sur l'ensemble des résultats obtenus, nous remarquons que les graines de la plante étudiée sont plus ou moins riches en métabolites secondaires. Nous notons la présence des anthocyanes, des tanins galiques, des glucosides, des alcaloïdes et des flavonoïdes. Cependant nous notons l'absence des tanins catéchiques et du mucilage.

De plus, la graine de nigelle renferme plus d'une centaine de composés dont certains n'ont pas encore été étudiés ou identifiés, et la combinaison de ces constituants contribue aux différentes activités pharmacologiques (Toparsian, 2012).

3. Teneurs de polyphénols et de flavonoïdes

L'analyse quantitative de polyphénols et de flavonoïdes des différents extraits des graines de la Nigelle a été déterminée à partir des courbes d'étalonnages de l'acide gallique et de la catéchine voir annexe 6.

Le tableau 09 ci-dessous représente les taux de polyphénols et de flavonoïdes de l'huile végétale, de l'extrait méthanoïque et de l'extrait aqueux. Les résultats ont été exprimés respectivement en (mg EAG/g E), et en (mg EC/g E).

Tableau 09 : Taux de polyphénols et de flavonoïdes de l'huile végétale, l'extrait méthanoïque et l'extrait aqueux en (mg EAG/g E), et en (mg EC/g E).

| Extraits | Teneurs en polyphénols (mg EAG/g E) | Teneurs en flavonoïde (mg EC/g E) |
|----------------------------|--|--------------------------------------|
| Huile fixe | 81.91 | 5.71 |
| Extrait méthanoïque | 44.29 | 3.48 |
| Extrait aqueux | 22.75 | 2.57 |

D'après les résultats montrés dans le tableau 09, nous distinguons que la teneur la plus élevée en polyphénols a été noté pour l'huile végétale avec une valeur de (**81.91 mg EAG/g E**), ce même extrait renferme le taux le plus élevé en flavonoïdes (**5.71 mg EC/g E**) suivi par l'extrait méthanoïque (**44.29 mg EAG/g E**) en polyphenols et (**3.48 mg EC/g E**) en flavonoïdes. L'extrait aqueux présente le taux le plus faible en polyphénols de (**22.75 mg EAG/g E**) et en flavonoïdes (**2.57 mg EC/g E**).

Les valeurs des polyphénols des deux extraits ; méthanoïque et aqueux (**44.29 et 22.75 mg EAG/g E** respectivement) sont supérieurs avec les teneurs trouvées par (Meziti. A, 2009) ($33,64 \pm 0,34$ mg EAG/g), ($27,07 \pm 0,58$ mgEAG /g) pour l'extrait méthanoïque et aqueux de la nigelle respectivement. Cependant les valeurs notées dans la présente étude pour les polyphénols sont inférieures par rapport aux teneurs enregistrées par Boudiaf. (2006) ($191,06 \pm 23,34$ mg EAG/g) qui lui, a réalisé une extraction en utilisant le chloroforme

comme solvant Pour le taux des flavonoïdes dans l'extrait méthanoïque (**3.48** mg EC/g E), ce résultat est similaire à celui obtenu par **Fico et al., (2001)** dont le taux est de 3,8mg/g E.

Le résultats des teneurs en polyphénols dans notre huile végétale est de **81.91 mg EAG/g**, il est supérieur à celui déterminé par **Ramadan et al.,(2003)** qui ont montré que l'Huile végétale contient $24 \pm 0,11$ mg EAG/g d'extrait.

Perez et al, (2007) ont montré l'effet du traitement de pré-extraction (irradiation ionisante) et du solvant d'extraction, sur la concentration des composés phénoliques totaux dans les extraits de nigelle.

Ceci peut être lié aux conditions climatiques dures (la température élevée, exposition solaire, sécheresse, salinité), qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires tels que les polyphénols (**Falleh et al., 2008**). Nous rappelons que nos graines ont été ramenées d'une région désertique (Bechar) qui est caractérisé par un climat aride. Les conditions environnementales dures de cette région peuvent expliquer les résultats obtenus.

En effet, la teneur en polyphénols d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétique) et extrinsèques (conditions climatiques, les pratiques culturelles, la maturité à la récolte et les conditions de stockage) (**Falleh et al., 2008 ; Podsedek, 2007**).

A partir de ces données, nous pouvons déduire que les polyphénols représentent la fraction majoritaire par rapport aux flavonoïdes dans les deux extraits méthanoïque et aqueux. Ceci est confirmé par certains auteurs (**Meziti, 2009** et **Boudiaf, 2006**) qui ont montré que les teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes sont plus élevées dans l'extrait méthanoïque que dans l'extrait aqueux.

Au fait, dans cette partie d'étude nous nous intéressons beaucoup plus à la qualité des extraits en termes d'activité biologique comme l'activité antioxydant et l'activité antibactérienne. Cependant, la quantification des métabolites secondaires impliqués dans une activité biologique est utile dans la mesure de servir d'appui pour expliquer les résultats de cette activité.

Selon **Hodek et al, (2002)**, Ces composés phénoliques sont des antioxydants puissants susceptibles d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules. En effet, les polyphénols sont des composés avec une activité anti-oxydante prononcée. Ils ont la capacité de piéger directement les radicaux libres comme le super oxyde,

le radical peroxy, le radical alkoxy et le OH• par transfert d'hydrogène (McCord, J.M, 1995).

4. activité antibactérienne

Le degré de sensibilité des souches aux différents extraits de la nigelle été évalués par la mesure des diamètres des zones d'inhibition (ZI). Les résultats obtenus sont montrés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Diamètres des zones d'inhibitions de l'huile végétale pure, l'extrait méthanoïque et l'extrait aqueux

| Extrait Souches | Huile végétale pure | | Extrait méthanoïque | | Extrait aqueux | |
|---------------------------------------|---------------------|------------|---------------------|---------|----------------|-----|
| | V1 | V2 | V1 | V2 | V1 | V2 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (gram+) | 12.66±0.47 | 14±0.81 | 14.33±0.47 | 24±0.47 | < 8 | < 8 |
| <i>Bacillus subtilis</i> (gram+) | 11±0.81 | 13,33±0.47 | 12±0.81 | 14±0.81 | < 8 | < 8 |
| <i>E.coli</i> (gram-) | < 8 | < 8 | < 8 | < 8 | < 8 | < 8 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (gram-) | < 8 | < 8 | < 8 | < 8 | < 8 | < 8 |

Non sensible : Ø < 8 mm ; Sensible (+) : 9 <Ø> 14 mm ; Très sensible (++) : 15 <Ø> 19 mm ; Extrêmement sensible (+++) : Ø > 20 mm ; V1= 10 ul et V2= 20 ul

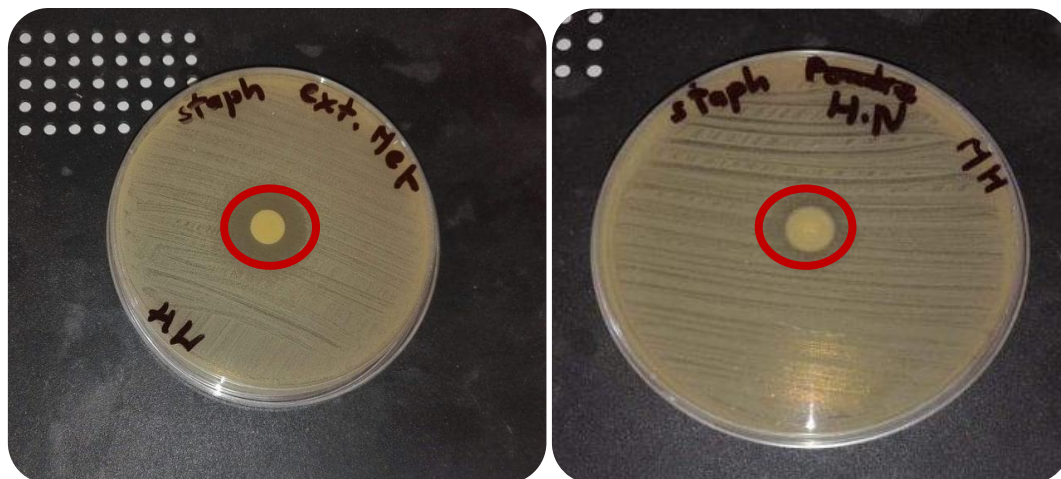


Figure 09: Action de l'huile végétale pure et de l'extrait méthanoïque sur la souche bactérienne (*Staphylococcus aureus*).

D'après les résultats montrés dans le tableau 10 et les figures ci-dessus, nous constatons que :

- La souche *Staphylococcus aureus* est extrêmement sensible à l'effet de l'extrait méthanoïque avec un diamètre d'inhibition de l'ordre de 24 ± 0.47 .
- La souche *Bacillus subtilis* est sensible à l'effet de l'huile végétale et l'extrait méthanoïque.
- Les souches *E.coli* et *Pseudomonas aeruginosa* sont des souches non sensibles (résistantes) vis-à-vis les différents extraits ($D < 8$).

On déduit que :

- L'huile végétale pure et l'extrait méthanoïque ont montré un effet inhibiteur sur les deux souches bactériennes *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*.
- l'activité antibactérienne est plus importante à V2 (20ul d'extrait) par rapport à V1 (10ul d'extrait) pour l'huile végétale et l'extrait méthanoïque.
- L'action de l'huile végétale pure et de l'extrait méthanoïque sur la souche *S. aureus* est plus importante (de 12 ± 0.47 à 24 ± 0.47). Elle est suivie par celle notée sur *B.subtilis* (de 11 ± 0.81 à 13.33 ± 0.47). Cette différence s'est traduite par des zones d'inhibition de diamètres nettement variables.
- l'extrait aqueux et la poudre n'ont présenté aucune activité antibactérienne sur les souches étudiées ($D < 8$), se sont des souches résistantes.

L'activité antibactérienne des extraits de plantes est due aux différents agents chimiques présents dans ces extraits. La variation de la composition chimique observée dans l'activité

antimicrobienne des extraits d'une même plantes ou de plantes différentes (**Marjorie M, 1999**).

Ce résultat correspond bien aux travaux de **Harzallah et al, (2012)** qui ont noté, que la souche de référence *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 était la plus sensible parmi l'ensemble des souches testées dont le diamètre de la zone d'inhibition était de l'ordre de 16.66 mm.

La grande sensibilité des *S. aureus* à l'huile végétale de nigelle a été confirmée aussi par la méthode des puits étudiée (**Abu-Al-basal et al, 2009**).

Nos résultats sont identiques à ceux obtenus par **Belabid et Lazzouni, (2014)** où l'huile de *Nigella sativa* était active sur les souches *Staphylococcus aureus*, et *Bacillus subtilis* et inactive vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*.

Nos résultats montrent que parmi les bactéries à Gram positif l'espèce *bacillus subtilis* était la moins sensible vis-à-vis d'huile de nigelle et de l'extrait méthanoïque, ce qui concorde avec les résultats de **Harzallah et al, (2012)**, qui ont noté, avec la méthode de diffusion des disques, un diamètre d'inhibition ne dépassant pas les 9.33 mm.

Dans le cas des bactéries à Gram négatif (*E. coli*, *P. aeruginosa*) les différents extraits des graines de *N. sativa* n'ont exercé aucune activité antimicrobienne, ce qui est prouvé par les travaux de **Kökdil et al, (2005)** et **Abu-Al-basal et al, (2009)**.

Selon **Abu-Al-basal (2009)** l'activité antimicrobienne de l'huile végétale de *N. sativa* peut être expliquée par la présence des constituants ayant un grand pouvoir antimicrobien avec des concentrations élevées. Le mode spécifique de l'action de ces constituants actifs est attribué à leur composition chimique et leur morphologie (**Enwuru et al, 2008**).

Les travaux de **McCutcheon et al., (1995)** et **Harzallah et al., (2012)** soulignent fortement que l'origine de l'activité antimicrobienne de cette huile végétale et de l'extrait méthanoïque pourrait être attribuée à la présence de certains acides gras tels que l'acide linoléique et l'acide oléique qui demeurent des composés majoritaires.

Nos résultats ont montré l'absence de l'activité antibactérienne envers les bactéries à Gram négatif, de même, **Gulluce et al., (2003)** et **Mariam et Abu-Al-basal (2009)** ont noté une activité antibactérienne non significative vis-à-vis de certaines bactérie à Gram négatif.

5. Activité antioxydante

Les résultats obtenus lors du test de mesure de pourcentage d'inhibition du radical DPPH sont montrés dans le tableau de l'annexe 4.

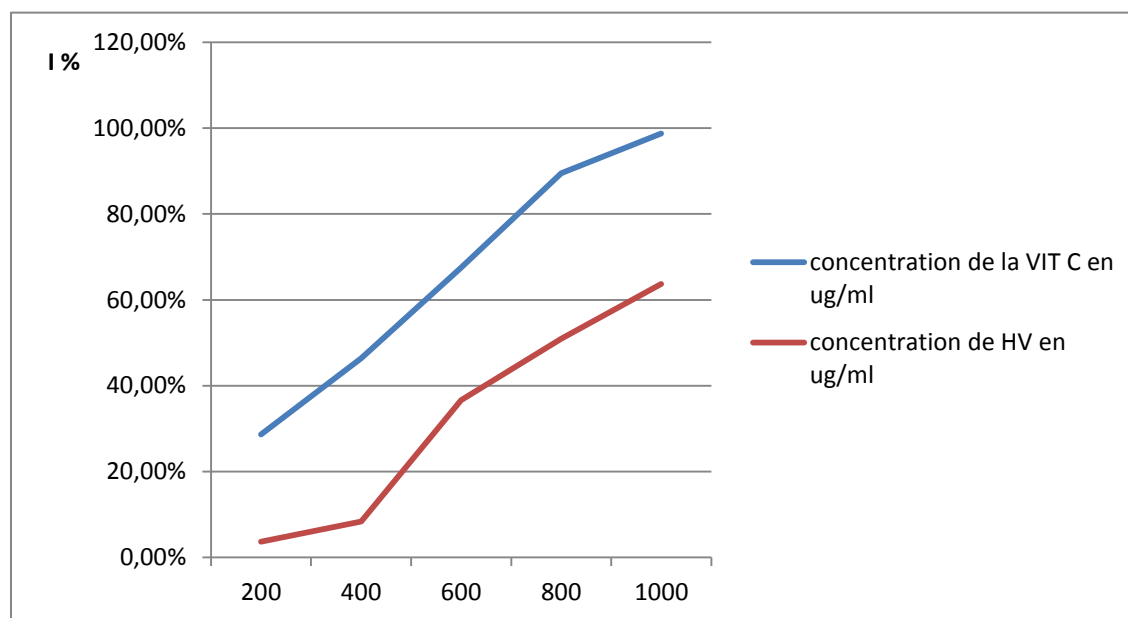


Figure 10 : Résultat du test antioxydant de la Vit C et HV au DPPH.

D'après la figure 09, nous distinguons que :

- Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH (I%) augmente avec la concentration en huile végétale et en acide ascorbique.
- Les pourcentages d'inhibition du radical DPPH du vit C en fonction des concentrations sont de l'ordre de (3.68% à 63.66%).
- Les pourcentages d'inhibition du radical DPPH de HV en fonction des concentrations sont de l'ordre de (28.63% à 98.69%).

On peut déduire que l'inhibition du radical DPPH par l'antioxydant standard (Vit C) est plus importante.

Détermination d'IC50 :

Les valeurs d'IC50 ont été déterminée à partir des équations de la régression linéaire des courbes des concentrations de la vitamine C et de l'huile végétale en µg/ml ($y = 0,183x + 0,111$ $R^2 = 0,986$; $y = 0,162x - 0,161$ $R^2 = 0,963$) exprimant la concentration efficace de l'extrait antioxydant nécessaire pour le piégeage et la réduction de 50% de moles de DPPH en dissolution dans du méthanol.

Plus la valeur d'IC₅₀ est basse, plus l'activité antioxydant d'un extrait est grande. Les résultats d'IC₅₀ de l'huile totale de *Nigella sativa* et d'un antioxydant standard (vitamine C) sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des extraits et présentés dans la figure 12.

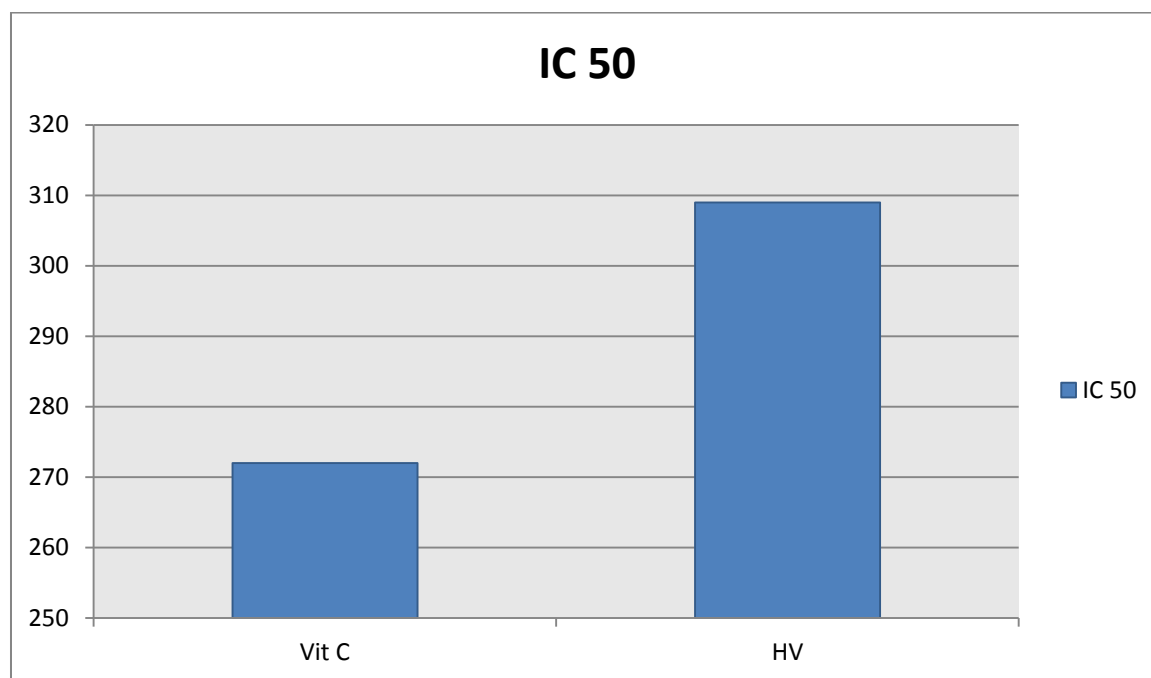


Figure 11 : valeurs d'IC₅₀ de HV et la Vit C.

Selon les résultats trouvés, nous constatons que l'huile végétale de *Nigella sativa* est dotée d'un pouvoir antioxydant important dont la valeur d'IC₅₀ est de 309 µg/ml ce qui est supérieure à celle de l'acide ascorbique dont la valeur est de l'ordre de 272 µg/ml.

Les résultats obtenus nous permettent d'avoir une observation globale qui peut être retenue : l'acide ascorbique (vit C) semble avoir un pouvoir antioxydant légèrement plus élevé par rapport à l'huile végétale de la nigelle. Il a été démontré que les molécules antioxydantes telles que l'acide ascorbique, la tocophérol, les flavonoïdes et les tanins réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à céder l'hydrogène (**Pooter H.L. et Schamp N, 1986**).

Les polyphénols et les flavonoïdes contenus dans les extraits de *Nigella sativa L.* sont probablement responsables de l'activité antioxydante de ces extraits (**Fabienne, 2013**).

Nous rappelons que nos huiles végétales sont caractérisées par une forte teneur de polyphénols et flavonoïdes.

Ainsi, les résultats indiquent que l'HV possède une bonne activité antioxydant. Cette activité pourrait être expliqué par la richesse naturelle de l'huile végétale en lipides bioactifs tels que les phétolestérols, les vitamines liposolubles notamment, les α tocophérols et les β -carotènes, les acides gras insaturés notamment les ω -3 et ω -6 (**Ramadan et Morsel 2002a, 2003**).

Conclusion

Le travail que nous avons entrepris a pour objectif principal la valorisation et la contribution à une meilleure connaissance d'une plante largement utilisée dans la médecine traditionnelle et comme condiment alimentaire (*Nigella sativa*) dans plusieurs pays du monde et particulièrement en Algérie.

Différents extraits ont été préparés à partir des graines de cette plante : Extrait méthanoïque, extrait aqueux et l'huile végétale selon différentes méthodes d'extraction.

Un screening phytochimique, en tant qu'analyse qualitative, a permis de mettre en évidence la présence des anthocyanes, des glucosides, des tanins galliques, des flavonoïdes et des alcaloïdes dans les graines de la nigelle.

L'estimation du contenu des phénols et des flavonoïdes totaux en adoptant séparément les méthodes colorimétriques (Folin-Ciocalteux et trichlorure d'aluminium (AlCl₃)) révèle la présence des quantités plus ou moins importante en polyphénols et en flavonoïdes dans l'huile végétale (81.91 mg EAG/g E et 5.71 mg EC/g E) respectivement, suivi de l'extrait méthanoïque et de l'extrait aqueux avec des teneurs modérées.

L'évaluation de l'activité antibactérienne des différents extraits de *Nigella sativa* a été réalisée par la méthode des disques (aromatogramme) contre les quatre souches bactériennes suivantes: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*.

Les résultats obtenus ont montré que l'huile végétale de nigelle ainsi que l'extrait méthanoïque présentent une activité variable sur les souches à Gram positif qui sont *S. aureus* et *B. subtilis*, dont la plus forte a été exercé sur la souche *S. aureus*, traduite par une zone d'inhibition importante (24mm±0.47). Ainsi, nous avons distingué que les bactéries à Gram négatif se sont caractérisées par une insensibilité par rapport aux extraits testés.

Ces résultats pourraient être expliqués par une différence fondamentale entre la flore à Gram positif et celle à Gram négatif. Cette différence touche l'aspect morphologique ainsi que les mécanismes génétiques propres à chaque espèce.

Par ailleurs, l'huile végétale des graines de *Nigella sativa* semble présenter un intérêt réel et potentiel par ses activités antioxydants qui ont été établies in vitro par la méthode du piégeage du radical libre DPPH qui a indiqué que cette huile végétale présente une activité importante dont la valeur d'IC₅₀ est de 309µg/ml.

A la lumière de ces résultats il serait intéressant de compléter ce travail par :

- Utilisation d'autres méthodes d'extractions avec d'autres solvants organiques.
- Isolement et l'identification des composés bioactifs en utilisant plusieurs techniques plus fines (CCM, HPLC, CG MS...).
- Approfondir les recherches sur les propriétés pharmacologiques de l'espèce végétale étudiée (*Nigella sativa*).
- Analyse des activités in vitro et in vivo pour évaluer les différents propriétés : antioxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes, anticancéreuses etc ...

Références bibliographiques

A

- Abdel-Hameed, E.S., (2009) Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. *Food Chem.* 114:1271-1277.
- Abu-Al-Basal A., (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.
- Agrawal R., Kharya M.D., Shrivastava R. (1979). Antimicrobial anthelmintic activities of the essential oil of *Nigella sativa* Linn. *Indian journal of experimental biology.* 17: 1264-1265.
- AitMbarek L., Ait Mouse H., Elabbadi N., Bensalah M., Gamouh A., Aboufatima R., Al-Ghamdi M.S., (2001). The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of *Nigella sativa*, *J. Ethnopharmacol.* 76: 45-48.
- Al-Hader A., Aqel M., Hassan Z. (1993). Hypoglycaemic effects of the volatile oil of *Nigella sativa*. *Int J. Pharmacognosy*, 31: 96-100.
- Ali B.H., Blunden G. (2003). Pharmacological and toxicological properties of π *Nigella sativa*. *Phytotherapy research.* 17 : 299-305.
- Aljabre S.H.M., Randhawa M.A., Akhtar N., Alakloby O.M., Alqurashi A.M., Aldossary A. (2005). Antidermatophyte activity of ether extract of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. *Journal of Ethnopharmacology.* 101: 116- 119.
- Al-Jassir, M.S. (1992). Chemical composition and microflora of black cumin (π *Nigella sativa* L.) seeds growing in Saudi Arabia. *Food Chem.*, 45: 239–242.
- 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 in π different brands of *Nigella sativa* seeds. *Journal of Food Composition and Analysis.* 19: 167-175.
- Anderson, Jr. ER., Koplan, J., Henney, JE. et Billy, TJ. (2001). Diagnosis and Management of Foodborne Illness: A Primer for Physicians. Centers for Disease Control, Morbidity and Mortality Weekly Report 50 (2): 1-69.
- Ansari A., Hassan S., Kenne L., Atta U.R., π & Wehler J. (1988). Structural studies on a saponin isolated from *Nigella sativa*. *Phytochemistry* (27), pp. 3977-3979.
- Antuono F., Hamaza K. (2002). Composition of *Nigella sativa* and *Nigella π *damascene* from Egypt. *Planta medica.* 27: 142 -149.*
- Ardestani A, yazdanparast R, (2007). Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teurcopolin* on in vitro protein glycosidation. *Food and chemical toxicology*; 45:2402-2111.
- Atta M.B., Imaizumi K. (1998). Antioxidant activity of *nigella* (*Nigella sativa* L.) seeds extracts. *JAPAN Oil Chemists' Society.* 47: 49-54.

ATTA-UR-RAHMAN M., CUN-HENG H., CLARDY J. Isolation and structure determination of nigellicine, a novel alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Tetrahedron letters*. 1985; 23: 2759-2762.

B

badary, O.A., Taha, R.A., Gamal El-Din, A.M., Abdel-Wahab, M.H. (2003). Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug and chemical toxicology*. 26: 87-98.

Baran, J.-M. 2000. Daturas, plantes magiques, hallucinogènes et médicinales à l'île de la Réunion et dans le monde. Thèse de doctorat en médecine. Université de Nancy, France.

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

Bonnier G. (1990). La grande flore en couleur. Ed Belin, Paris. Tome 1.

Boudiaf, K., 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 (2006).

Bouyer .T ., 1996 : Description d'une nouvelle espèce de Maltagoreabouyer, 1993 (Lepidoptera, Satumiidae). *Bulletin et Annales de la Société royale belge d'Entomologie*, 132 : 3-5.

Burits M., Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*. 2000; **14**: 323-328.

Blumenthal M., W.Busse A., Goldberg V.H., & Gruenwald J.T., Hall C.W. (2002). Encyclopédie des plantes médicinales : identification, préparations, soins par les extraits embryonnaires végétaux. 275: 1603-1609.

BRUNETON J. (1999) : « Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales ». Editions Tec & Doc, Paris, éditions médicales internationales, pp: 483-560.

Bruneton J. (2009). Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. 4e Ed : Lavoisier ; Paris. P.1269.

C

Cowan M.M., 1999- Plants products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 564-582.

Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C. Gustafson J.E., Warmington J.R., Wyllie S.G. 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88, 170–175.

D

- Daba M.H., Abdel-Rahman M.S. (1998). Hepatoprotective activity of thymoquinone in isolated rat hepatocytes. *Toxicology letters*. 95: 23-9.
- Djeridane, A., Yousfi M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P et Vidal, N. (2006). Antioxydant activity of some Algerian medicinal plants extracts compound. *Food Chemistry*, 97 : 654-660.
- Dif, M. M., Benchiha, H., Mehdadi, Z., Benali-Toumi, F., Benyahia, M., & Bouterfas, K. (2015). Étude quantitative des polyphénols dans les différents organes de l'espèce *Papaver rhoeas* L. *Phytothérapie*, 13(5), 314-319.
- Dorman H.J.D., Deans H.J.D. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88 (2) 308–316.
- Duraffourd C., D'Hervicourt L. & Lapraz J.C., 1990.- Cahiers de phytothérapie clinique. 1. Examens de laboratoires galénique. Eléments thérapeutiques synergiques. 2ème éd. Masson, Paris.

E

- El-Alfy T., El-Fataty H, Toama M., 1975. Isolation and structure assignment of an antimicrobial principle from the volatile oil *Nigella sativa* L. *Pharmacia.*, 30: P109-111.
- E1-Dakhakhny M., Madi N J., Lember N., Ammon H P T. (2002). *Nigella sativa* oil, nigellone and derived thymoquinone inhibit synthesis of 5-lipoxygenase products in polymorphonuclear leukocytes from rats. *J Ethnopharmacol*. 2002; 81: 161-164.
- El-Mahmoudy A., Matsuyama H., Borgan M.A., Shimizu Y., El-Sayed M.G., Minamoto N. (2002). Thymoquinone suppresses expression of inducible nitric oxide synthase in rat macrophages. *International immune pharmacology*. 2: 1603-1611.
- El-Tahir K.B., Ashour M.Mio., Al-Harbi M.M. 1993. The cardiovascular actions of the volatile oil of the black seed (*Nigella sativa*) in rats: elucidation of the mechanism of action. *Gen. Pharmacol.*, 24: 1123-1131.
- Enwuru, N.V., S.O. Ogbonnia, F. Nkemehule, C.a. Enwuru and O. Tolani, (2008). Evaluation of antibacterial activity and acute toxicity of the *Stachytarpheta angustifolia* (Mill) Vahl. *Afr. J. Biotechnol.*, 7: 1740-1744.

F

- Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., et Abdelly C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Compte Rendu de Biologie*. 331, 372-379.
- Fabienne, O.L., La Nigelle, une épice d'intérêt médicinal. Thèse. (2013)P, 44-45.

Flamini G. Cioni P.L., Puleio R., Morelli I., Panizzi L. 1999. Antimicrobial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* and its constituent pulegone against bacteria and fungi. *Phytother Res.*, 13(4): 349-351.

G

Gilani A H., Jabeen Q., Khan M A U. A review of medicinal uses and pharmacological activities of *Nigella sativa*. *Pakistan J of Biol Science* 2004 ; 7: 441-451 .

Guignard J.L. (2001). In : Botanique systématique moléculaire. 12^{ème} Edition Masson (Paris), P: 304.

Gulluce M., Sokmen M., Daferera D., Agar G., Ozkan H., Kartal N., Polissiou M., Sokmen A., Sahin F. (2003). In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Saturejahortensis* L. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 3958– 3965.

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

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

GREENISH H. Contribution to the Chemistry of *Nigella sativa* (Vol. 10). *Pharmac J Trans*; 1880.

Grenoble, 2005, La nigelle, une épice d'intérêt médicinal, Thèse, Faculté de pharmacie 174 p.

H

Hajhashemi V., Ghannadi A., Jafarabadi H. Black cumin seed essential oil, as a potent analgesic and antiinflammatory drug. *Phytother Research*. 2004; 18: 195-199.

Hanafy M S., Hatem M E. Studies on the antimicrobial activity of *Nigella sativa* seed (black cumin). *J of Ethnopharmacol.*1999; 34: 275–8.

Hanifi N., 1991. - Importance des ressources phytogénétiques et leur utilisation en Algérie. In conservation des ressources végétales. Publication d'Actes éditions : 47-49.

Harbone J.B. (1998). *Phytochemical methods a guide to moderns techniques of plants analysis*, 3rd edition. p. 412.

Harzallah H.J., Noumi E., Bekir K., Bakhrouf A and Mahjoub T. (2012). Chemical composition, antibacterial and antifungal properties of Tunisian *Nigella sativa* fixed oil. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 6(22) pp. 4675-4679.

Hawsawi Z.A., Ali B.A., Bamosa A.O. (2001) Effect of *Nigella sativa* (Black seed) and

thymoquinone on blood glucose in albino rats. *Annals of Saudi medicine*. Med. 21: 242-244.

Hodek, P., Trefil, P., Stiborová, M. (2002) Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions*. 139: 1-21.

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.

I

Ibn Al-Qaîm, A. (1957). *La médecine du prophète*. Beyrouth: Al fikr.

K

Kalemba D. &Kunicka A., 2003.- Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 10: 813-829.

Kalia, K., Sharma, K., Singh, HP. et Singh, B. (2008). Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of *Potentilla atrosanguinea* Lodd. and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC. *J. Agric. Food Chem*. 56: 10129–10134.

Kanter M., Coskun O., Uysal H. 2006. The antioxidative and antihistaminic effect of *Nigella sativa* and its major constituent, thymoquinone on ethanol-induced gastric mucosal damage. *Arch. Toxicol.*, 80 (4): 217-224.

Khan M A., Ashfaq M K., Zuberi H S., Mahmood M S., Gilani A H. The in vivo antifungal activity of the aqueous extract from *Nigella sativa* seeds. *Phytotherapy Research*. 2003; 17:183– 186.

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.

Kim, D.-O., Chun, O.K., Kim, Y.J., Moon, H.-Y. et Lee, C.Y. (2003). Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *J. Agric. Food Chem*. 51: 6509-6515.

L

Levy S. B. (2001). Antibiotic Resistance: Consequences of Inaction. *Clinical Infectious Diseases*, 33 (Suppl. 3) :124–129.

M

Maisuthisakul, P., Pasuk, S., Ritthiruangdej, P. (2008) Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. *J Food Composition and Analysis*. 21: 229-240.

Mansour M., Tornhamre S. Inhibition of 5-lipoxygenase and leukotriene C4 synthase in human blood cells by thymoquinone. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*.2004; 19: 431-436.

Marino M., Bersani C., Comi G. 1999. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. *J. Food Prot.*, 62(9): 1017-23.

Mautrait C. et Raoult R.(2009) . la préparation : mode d'emploi (officine, sous-traitance et BP). 2eme édition. PorphyreFrance . P. 468.

Medinica R., Mukerjee S., Huschart T., Corbitt W. 1994. Immunomodulatory and anticancer activity of *Nigella sativa* plant extract in humans. *Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting*. p2865.

MERFORT I., WRAY V., BARAKAT H., HUSSEIN S., NAWWAR M., WILLUHN G. Flavonoid triglycerides from seeds of *Nigella sativa*. *Phytochemistry*. 1997; 46: 359-363.

Meziti A. (2009). Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* mémoire Pour l'obtention du Diplôme de magister en biochimie appliquée Université El-Haj Lakhdar Batna, p. 21-32.

Mahmood M.S., Gilani A.H., Khwaja A., Rashid A., Ashfaq M.K. (2003). The in vitro effect of aqueous extract of *Nigella sativa* seeds on nitric oxide production. *Phytotherapy research*. 17: 921-924.

Molyneux Deepak Bhatnagar Thomas f., Cleveland Jiujiang Yu Noreen Mahoney Kathleen I., Chan Russell jong H. kim Bruce C. Campbell – 2004 ; Examination of fungal stress response genes using *Saccharomyces cerevisiae* as a model system.

Morsi N.M. (2000) Antimicrobial effect of crude extracts of *Nigella sativa* on multiple antibiotics-resistant bacteria. *Acta microbiologicaPolonica*. 49: 63-74.

Moussaoui M. 2013 Les vertus médicinales de la graine de Nigelle. Paris : Sana; 2013.

Murugan, R. et Parimelazhagan, T. (2014). Comparative evaluation of different extraction methods for antioxidant and anti-inflammatory properties from *Osbeckiaparvifolia* Arn.–An in vitro approach. *Journal of King Saud University–Science* 26:267–275.

McCord, J.M. (1995) Superoxide radical: Controversies, contradictions and paradoxes. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 202: 112-117.

McCutcheon A.R., Roberts T.E., Gibbons E., Ellis S.M., Babiuk L.A., Hancock R.E., Towers G.H. (1995). Antiviral screening of British Columbian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*, 49: 101-110.

N

Nadkarni K. (1976). *Crocus sativus*, *Nigella sativa*. In K.M. Nadkarni (Ed.). *Indian Materia Medica.*, pp. 386–411.

Nair M.K.M., Vasudevan P., Venkitanarayanan K. (2005) Antibacterial effect of black seed oil on *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 16: 395-398.

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*. 56:79-84.

Nickavar B., Mojaba F., Javidniab K., Amolia M.A.R. (2003). Chemical composition of the fixed and volatile oils of *Nigella sativa* L. from Iran. *Journal of biosciences*. 58: 9-10.

O

Owen P.L. And Johns T. 1999. Xanthine oxidase inhibitory of northeastern north American plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacology*, 64: 149-160.

Perez, M.B., Calderon, N.L., Croci C.A. (2007) Radiation-induced enhancement of antioxidant activity in extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Food Chem*. 104: 585-592.

P

Pierangeli G, Vital G, WindellRevera L.J, (2009).. *Plants Res*, (3)7, 511.

Podsdek, A. (2007) Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT*. 40:1-11.

Pooter H.L. et Schamp N., Comparaison of the volatils composition of some *Calaminthasatureja* species. In : *Progress in essential oil research*. Ed. E-J. Brunk, Walter De Gruyter, Berlin. (1986) 139-150p.

R

Rajkapoor B., Anandan A., Jayakar B. (2002). Anti-ulcer effect of *Nigella sativa* Linn. against gastric ulcers in rats. *Current Science*. 82: 177-179.

Ramadan MF., Mörsel JT. Characterization of phospholipid composition of black cumin (*Nigella sativa*) seed oil. *Nahrung/Food*. 2002a; 46:240-244.

Riberau-GayonP.(1968). Propriétés chimique des phénols. In « les composés phénoliques des végétaux ». Ed Dunod, Paris.

S

Salem M.L. (2005). Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. Seed. *International Immunopharmacology*. 5: 1749-1770.

Salman MT., Khan RA., Shukla I. (2008). Antimicrobial activity of Black Cumin seeds (*Nigella sativa*) against multi-Drug resistant strains of Coagulase negative Staphylococci. *Hippocratic J. Unani Med.*, 3:107-112.

Sarter Samira. 2013. Propriétés antibactériennes des extraits des plantes médicinales comme conservateur naturel dans les aliments et de l'aquaculture : O5 In : Livre des résumés de l'Atelier international : Exploration de la biodiversité pour le développement durable en Asie du Sud-Est (EBSEA 2013), Hanoi, Vietnam, 16-09-2013. Institut Polytechnique de Hanoi ; CIRAD ; s.l. : s.n., Résumé, [2 p.] Atelier international : Exploration de la biodiversité pour le développement durable en Asie du Sud-Est (EBSEA 2013), Hanoi, Viet Nam, 16 Septembre 2013.

Scehovic J 1990. Tannins et autres polymères phénoliques dans les plantes de prairies : détermination de leur teneur et de leur activité biologique. *Revue Suisse agric.* 22(3) :179-184.

Y

Yano, Y., Satomi, M., Oikawa, H. 2006. Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. *International J. Food Microbiology*, 111: 6-11.

Annexes

Annexe 01 : Appareillage.

Agitateur magnétique

Autoclave

Balance de précision

Bain marie

Soxhlet

Spectrophotomètre

Evaporateur rotatif

Vortex

Annexe 2:

Anse de platine

Ballon

Bec bunsen

Boite de pétrie

Becher

Barreau magnétique

Crayon marqueur

Disque de papier Wattman

Ecouvillon

Etiquettes

Erlenmeyer

Gants

Papier aluminium

Papier buvard

Papier filtre

Plaque chauffante

Pince

Pipette pasteur

Portoir

Règle double décimètre

Seringue

Tube à essai,

Produits chimiques :

Acétate de sodium

Ammoniaque

Formol

HCL

Alcool isomylique

Acide sulfurique 10%

Acide gallique

Carbonate de sodium

Catéchine

Chlorure de fer

Chlorure de sodium

DPPH

Eau distillée

Eau physiologique

FeSO₄

Folin - Ciocalteu

Gélose Muller Hinton

Méthanol

Ethanol

Quercétine

Acide ascorbique (vit C)

Annexe 3 :

Milieux de cultures

- Gélose nutritive :

| | |
|-------------------------|----------|
| Extrait de viande..... | 1g/L |
| Extrait de levure..... | 2,5g/L |
| Peptone..... | 5,0g/L |
| Chlorure de sodium..... | 5,0 g/L |
| Agar..... | 15,0 g/L |

Ph: 7,0

- Milieu Muller Hinton :

| | |
|---------------------------------|-------|
| Extrait de viande de bœuf..... | 300g |
| Infusion de viande de bœuf..... | 17.5g |
| Hydrolysate de caséine..... | 1.5g |
| Gélose..... | 10g |

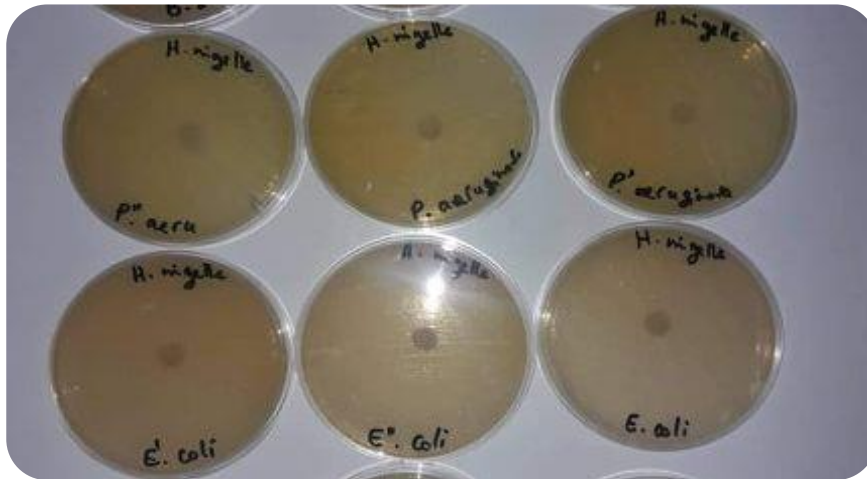
Ph : 7.4

Annexe 4 : Résultats du test de mesure de pourcentage d'inhibition du radical DPPH.

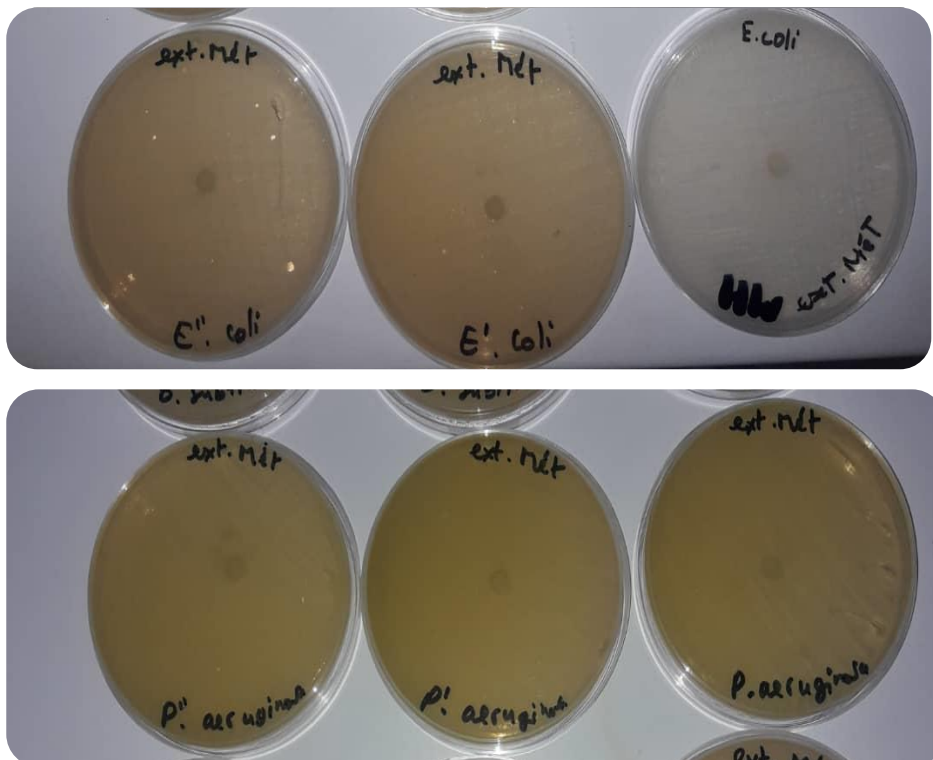
| C \ I% | 200ug/ml | 400 ug/ml | 600 ug/ml | 800 ug/ml | 1000 ug/ml |
|--------|----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| HN | 3.68% | 8.35% | 36.65% | 50.97% | 63.66% |
| Vit C | 28.63% | 46.42% | 67.46% | 89.47% | 98.69% |

Annexes 5

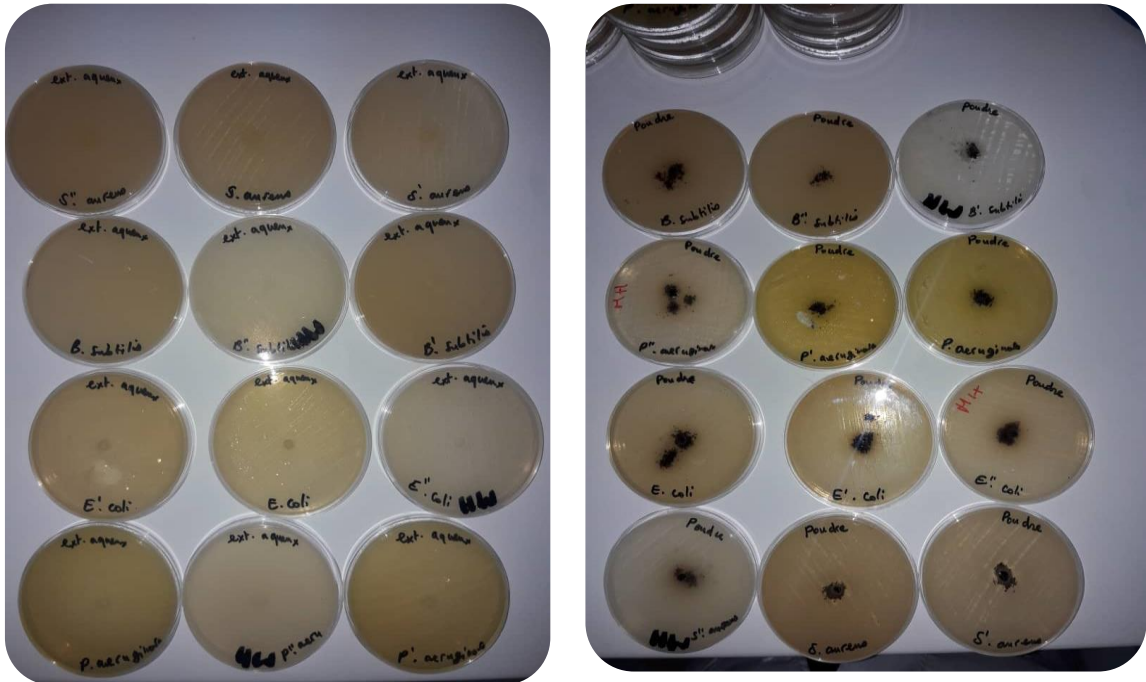
- Résistance des souches à Gram- (*Escherichia coli* *Pseudomonas aeruginosa*) vis-à-vis l'huile végétale de la nigelle



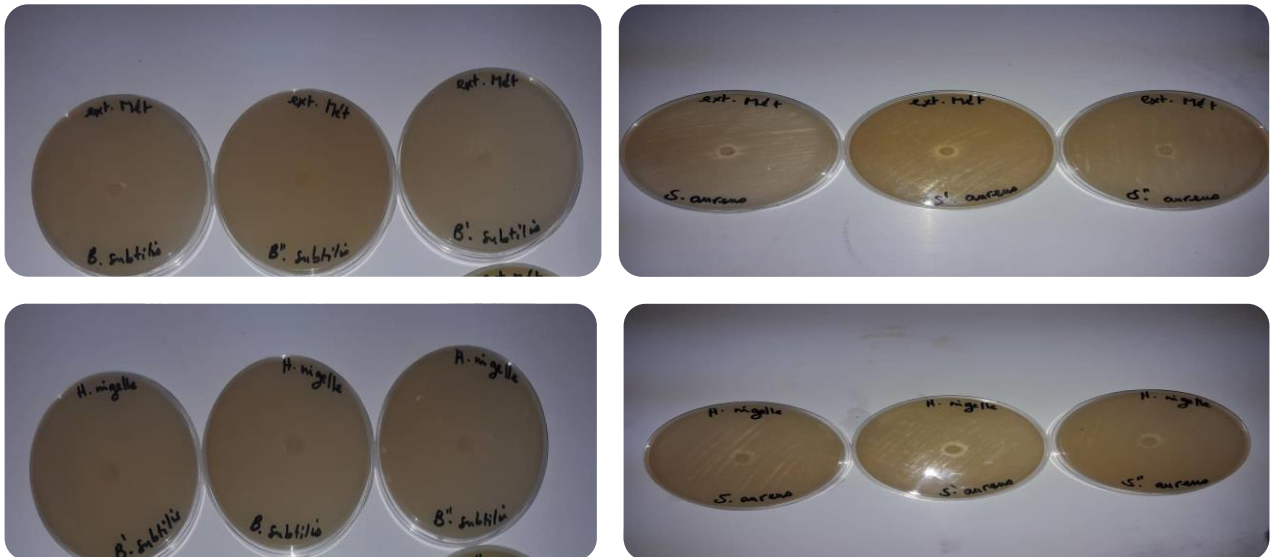
- Résistance des souches à Gram- (*Escherichia coli* *Pseudomonas aeruginosa*) vis-à-vis l'extrait méthanoïque



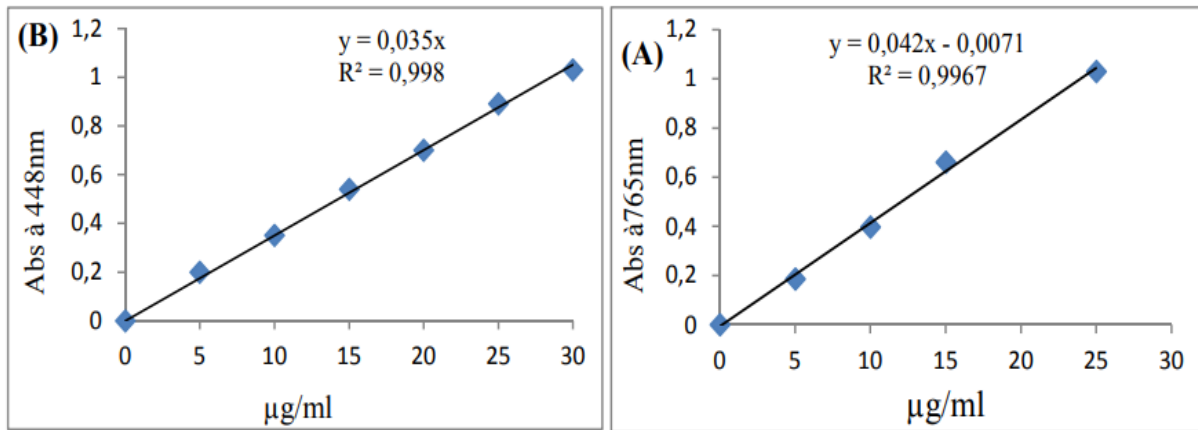
- Résistance de toutes les souches (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) vis-à-vis l'extrait aqueux de la nigelle.



- Sensibilité des souches à Gram + (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) vis-à-vis l'huile végétale et l'extrait méthanoïque



Annexe 6 : Les courbes d'étalonnages d'acide galliqueA et la Quercitine B



Annexe 7 : Taux de polyphénols et de flavonoïdes des différents extraits des graines de la nigelle en (mg EAG/g E) et en (mg EC/g E).

