

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU

FACULTE DES SCIENCES DEPARTEMENT DE

CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIERE

FILIERE : CHIMIE

MEMOIRE DE MASTER

SPECIALITE : *CHIMIE PHARMACEUTIQUE*

THEME

*Extraction et Evaluation des activités biologiques
de l'huile essentielle de Nigella Sativa L.*

Présenté par : M^{elle} *OUAKED AMEL*

Le 10/10/2021, devant le Jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>	<i>Affiliation</i>	<i>Qualité</i>
<i>REHAL FOUJIL</i>	<i>MAA</i>	<i>UMMTO</i>	<i>PRESIDENT</i>
<i>OUKACHA DJAMILA</i>	<i>MAA</i>	<i>UMMTO</i>	<i>ENCADREUR</i>
<i>SMAIL HACEN</i>	<i>CRD</i>	<i>SAIDAL</i>	<i>Co-ENCADREUR</i>
<i>BENCHOUAK MOUNIR</i>	<i>MAA</i>	<i>UMMTO</i>	<i>EXAMINATEUR</i>

Promotion 2020-2021



Remerciements

*Mes remerciements vont tout d'abord à mon **DIEU** le tout puissant et miséricordieux, qui m'a guidé dans la voie du savoir et de la connaissance scientifique, et qui ma donné le courage, la volonté, la force et la patience et permis d'accomplir et de mener à bien ce modeste travail.*

*Je tiens à exprimer mes profondes gratitude et mes sincères remerciements à ma promotrice, **Mme. OUKACHA Djamila**, enseignante au département de chimie de la faculté UMMTO de l'Université de Tizi-Ouzou, qui m'a fait l'honneur d'encadrées et de diriger ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa gentillesse, sa disponibilité, ses précieux conseils et critiques furent d'un apport considérable. Aussi je tiens à lui reconnaître le temps précieux qu'elle m'a consacré, qu'elle trouve ici l'expression de ma respectueuse et profonde reconnaissance pour ses encouragements, ses recommandations et sa bienveillance.*

*Je tiens à remercier **Dr. SMAIL Hacem**, mon Co-promoteur du CRD / SAIDAL d'avoir accepté de diriger ce travail. Qui m'a aidée, orientée et avoir la patience de me suivre durant mon expérimentation au sein de son laboratoire de microbiologie. J'ai beaucoup appris de ses qualités pédagogiques.*

*Mes vifs remerciements vont également aux membres de jury, **Mr. REHAL Foudil** et **Mr. BENCHOUAK Mounir** pour l'intérêt et l'honneur qu'ils ont porté à ma recherche, en acceptant de présider et d'examiner avec attention mon travail et de l'enrichir par leurs propositions.*

Également, je remercie vivement toutes les autorités académiques de l'UMMTO, particulièrement mes professeurs de première année jusqu'à la dernière, qui m'ont suivi au long de mon parcours pour leur formation.

Je remercie également toutes les équipes, et le personnel des différents services du groupe Saidal Gue De Constantine, qui m'ont aidée et permis de réaliser ce présent travail.

À tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, m'ont soutenu ou aidé et ayant participé de près ou de loin durant l'élaboration et la réalisation de ce travail. Quelle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Que tous ceux qui n'ont pas eu l'occasion d'être cités, trouvent à travers ces écrits l'expression de ma reconnaissance.



Epigraphie :

Heureux l'homme qui trouve un travail, car ce dernier profitera et sera utile à la société.

Dédicace :

Je dédie tout d'abord ce travail à Dieux le tout puissant qui m'a donné la volonté, la force et le courage pour réaliser ce modeste travail.

J'ai l'honneur de dédie le fruit de ce travail à :

Mes très chers parents OUAKED YOUCEF (Dieu le garde dans son vaste paradis), à ma mère MOUSSAOUI DAHBIA (Dieu me la garde) pour le grand travail que vous-avez fait de moi et que vous continuez à faire pour ma vie, tant social que professionnel, spirituel que privé, pour votre soutien constant, votre affection, vos innombrables sacrifices et sans votre amour je ne serais jamais arrivé là où je suis. Merci pour tout ce que vous m'avez appris et inculqué. Recevez ici ma profonde gratitude pour votre patience et votre confiance ; que ce travail soit pour vous un symbole de fierté. Nchallah je serai à la hauteur de vos sacrifices

A mes charmantes sœurs ; dont j'adresse toute mon affection et attachement.

A Mes neveux ; les signes de notre joie.

A mes beaux frères.

A toute ma promotion 2020 – 2021 Mercie pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble.

A tous les gens qui me connais, qui m'aiment et qui ont cru en moi...

A mon fiancé Abdessalam à sa famille Mahdi, je lui souhaite toute la réussite ainsi que le bonheur et la santé.

Je vous adore...

Amel

Glossaire

Les plantes médicinales : Sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses.

Aromathérapie : Est une thérapeutique qui utilise les extraits aromatiques des plantes odorantes (essences ou huile essentielles), ce sont des produits complexes à utiliser souvent à travers la peau et pour le traitement de diverses manifestations pathologiques.

Extraction : Technique chimique classique pour obtenir des composés organiques à partir du matériel végétal séché ou frais.

Rendement d'extraction : Le rendement de l'extraction est exprimé en pourcentage, et correspond au rendement moyen spécifique d'une substance.

Huile végétale : Huile constituée d'un ensemble des acides gras. Huile obtenue par pression à chaud ou à froid.

Criblage : Technique qui prouve la présence ou l'absence des métabolites secondaires dans un extrait de plante.

Test phytochimique : Est un ensemble des méthodes et techniques de préparation et d'analyse des substances organiques naturelles de la plante.

Alcaloïde : Substances azotées basiques.

Flavonoïdes : Pigments rencontrés chez les végétaux qui donnent des couleurs aux fruits et légumes.

Quinones : Des composés aromatiques.

Composés phénoliques : Molécules aromatiques constituées d'un groupement phényle et d'un hydroxyle OH.

Espèce : Ensemble d'individu interfécond pouvant donner une descendance fertile.

Métabolite : Produit de la transformation d'une substance de l'organisme.

Molécules bioactives : Molécules qui possèdent des propriétés biologiques ou des substances biologiquement actives dans un but curatif ou préventif.

Thérapeutiques : Un ensemble de mesures appliquées par un professionnel de la santé.

Entérale : Qui désigne l'administration faite par l'intermédiaire du tube digestive.

Parentérale : L'administration d'une substance au moyen d'une injection.

Bacille pyocyanique : Est une bactérie de la famille des pseudomonadaceae, mises en évidence par la coloration Gram -, aérobies stricts (ne pouvant vivre et se multiplier qu'en présence d'oxygène).

Annuelle : Se dit d'une plante dont le cycle de vie est de un an.

Bactéricide : Se dit d'une substance qui tue les bactéries.

Bactériostatique : Se dit d'une substance qui bloque et inhibent la croissance et la reproduction. Mais ne tue pas la bactérie.

Fongicide : Se dit d'une substance qui inhibe et tue les levures.

Fongistatique : Se dit d'une substance qui bloque mais ne tue pas les levures.

Fongique : Qui se rapporte aux champignons.

Anti-inflammatoire : Qui fait dégonfler et diminuer l'irritation. La plus part des anti-inflammatoires sont aussi des antidouleurs.

Antifongique ou antimycosique : Se dit d'un médicament qui agit contre les infections provoquées par les champignons ou les levures parasites.

Antimicrobien ou Antibactérien : Est une substance possédant la capacité de tuer des bactéries, détruit les micro-organismes.

Antioxydant : Molécules ou ensemble de molécules capables de neutraliser des radicaux libres, tout produit qui empêche l'oxydation de la matière.

Un œdème : Est une accumulation anormale de liquide entre les tissus. L'œdème concerne essentiellement la peau ou les muqueuses, où il produit un gonflement.

Moisissure : Champignon de petite taille qui provoque une modification chimique du milieu sur lequel il croît.

Gélose nutritive (GN) :

- Milieu d'isolement non sélectif.
- L'isolement est dans le but de contrôler la pureté d'une souche bactérienne.

Sabourand : Milieu (acide) d'isolement des levures et moisissures responsable de mycoses. Cas d'un prélèvement fortement contaminés, le milieu utilisé est Sabourand + chloramphénicol.

Inoculum : Échantillon contenant des germes vivants, destiné à être introduit au sein d'un milieu favorable à sa multiplication, afin de l'identifier, de l'étudier ou d'en produire une quantité supérieure.

Candida albican : Est l'espèce de levure la plus importante et la plus connue du genre Candida. Elle provoque des infections fongiques (candidiase ou candidose) essentiellement au niveau des muqueuses digestives.

Escherichia coli : Est un bacille gram négatif de la famille des Enterobacteriaceae. Également appelée colibacille et abrégée en E. coli, est une bactérie intestinale des Mammifères, très commune chez l'être humain. En effet, elle compose environ 80 % de notre flore intestinale aérobie ;

Membrane : Structure biologique formée de feuilles comportant une bicouche lipidique où sont insérées diverses protéines.

Cytotoxique : Se dit d'une substance toxique pour une espèce de cellule.

Sédatif : Se dit de toute substance qui agit contre la douleur, l'anxiété l'insomnie ou qui modère l'activité d'un organe.

Antitumoral : Désigne ce qui a la capacité de lutter contre une tumeur, qui peut faire stagner l'évolution d'une tumeur ou détruire la tumeur elle-même.

Antispasmodique (ou spasmolytique) : Remède contre les spasmes (Contraction musculaire brusque involontaire).

Antivirale : Se dit d'une substance qui agit contre les virus.

Eczéma : Syndrome caractérisant plusieurs maladies cutanées, d'origine immunallergique mais de mécanismes variables, se manifestant, dans sa forme aigue, par des lésions rouges, suintantes et très prurigineuses.

Antimitotique : Se dit d'une substance capable de s'opposer à la division des cellules (mitose), empêchant ainsi leur multiplication. Les antimitotiques sont employés dans le traitement cancéreux.

Antiseptique : Ce qui détruit les microbes et évite l'infection.

Ulcère : Une plaie de la peau, des yeux ou d'une muqueuse, accompagnée d'une désintégration du tissu.

Neuroleptique : Sont des médicaments psychotropes utilisés pour leur effet tranquilisant majeur.

Analgésiques : Se dit d'un médicament qui agit sur la douleur.

Hypocholestérolémie : Diminution du taux de cholestérol dans le sang.

Les œstrogènes : Régulent le cycle menstruel de la femme.

Liste des abréviations et symboles

A : Absorbance.

AAM : Activité antimicrobienne.

AFNOR : Association Française de Normalisation.

AINS : Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens.

ALAT : Alanine Aminotransférases.

ASAT : Aspartate Aminotransférases.

ATB : Antibiotique.

ATCC* : American Type Collection Culture.

BHIB : milieu nutritif tamponné.

c.à.d. : C'est-à-dire.

cm : centimètre.

CMB : Concentration Minimale Bactériostatique.

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse.

CQ : Chloroquine.

CRD/SAIDAL : Centre de Recherche et Développement/SAIDAL.

°C : Degré Celsius.

DL₅₀ : Dose létale 50.

DPPH : 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl.

Ø : Diamètres des halos.

E : Essais.

EB : Extrait Brut.

EC₅₀ : Concentration Efficace médiane (effective à 50%).

EGCG : épogallocathéchinegalatte = flavanol connu pour être un puissant antioxydant.

etc. : et les autres choses.

FeCl₃ : Trichlorure de Fer.

FRAP : Ferric ion Reducting Antioxydant Parameter.

g : gramme.

GGT : Gamma-Glutamyl Transférase.

GN : Gélose Nutritive.

Gr- : Gram négative.

Gr+ : Gram positive.

h : heure.

ha : hectare.

Liste des abréviations et symboles

HCl : Acide chlorhydrique.
HCQ : Hydroxychloroquine.
HDL : Bon Cholestérol.
H.E : Huile Essentielle.
H.Es : Huiles Essentielles.
HF : Huile Fixe.
HPLC : High Performance Liquid Chromatography.
H₂SO₄ : Acide Sulfurique.
IC₅₀ : Concentration Inhibitrice demi-maximale (à 50%).
IP : Intra-Péritonéale.
kg : Kilogramme.
KOH : Hydroxyde de Potassium.
LDL : Mauvais Cholestérol.
Méch : Masse sèche de l'échantillon.
Mext : Masse de l'extrait.
Mg : Magnésium.
mg : milligramme.
MH : Gélose Müller –Hinton.
min : minute.
ml : millilitre.
mm : millimètre.
Moy : Moyenne.
MP_D : Moyenne des Poids de la patte Droite.
MP_G : Moyenne des Poids de la patte Gauche.
μL : Microlitre.
N. : *Nigella*.
N° : Numéro.
NaOH : Hydroxyde de Sodium.
Na₂SO₄ : Sulfate de Sodium Anhydre.
N.B : Noté Bien.
nm : nanomètre.
NMRI : Naval Medical Research Institute.
Nrf2 : Nuclear factor (erythroid-derived 2).
NS : *Nigella Sativa*.

Liste des abréviations et symboles

P_D : Patte Droite.

P_G : Patte Gauche.

pH : potentiel Hydrogène.

PPT : Poly-Phénols Totaux.

% : Pourcentage.

R : Bactéries Résistante.

R(%) : Rendement d'extraction.

Réf : Référence.

ROS : Reactive Oxygen Species.

S : Bactéries Sensible.

SB ou **SAB** : Gélose Saburraux.

SM : Spectrométrie de Masse.

SRAS CoV-2 : acronyme anglais de severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2.
un agent infectieux appartenant à la grande famille des Coronavirus 2.

T : Témoin.

TAC : Total Antioxidant Capacity.

TQ : Thymoquinone.

TSB : Tryptocase Soja Bouillon.

UMMTO : Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

UV: Ultra-Violet.

V : Volume en ml ou cm³.

V/V : Volume à Volume.

XIX^{ème} : 19^{ème} Siècle.

Liste des figures

Figure 01 : Découverte de la tombe de Toutankhamon en 1922 par l'archéologue anglais Carter.....	3
Figure 02 : Usages traditionnels de <i>Nigella sativa</i>	4
Figure 03 : Graine de Nigelle cultivée	4
Figure 04 : Les graines de différentes espèces de nigelles.....	6
Figure 05 : Aspect morphologique de la plante <i>Nigella sativa</i>	7
Figure 06 : Activité biologique des polyphénols	9
Figure 07 : Représentation chimique de la thymoquinone et de ses dérivés retrouvés dans l'huile essentielle de <i>N. sativa</i> L.	10
Figure 08 : Synthèse de la thymoquinone à partir de thymol	10
Figure 09 : Structure des saponosides à hédéragénine isolés des graines de <i>Nigella sativa</i> L.11	
Figure 10 : Structure chimique des trois flavonoïdes isolés de <i>Nigella sativa</i> L.....	11
Figure 11 : Structure chimique des principaux alcaloïdes de <i>N. sativa</i> L.....	12
Figure 12 : Structure chimique de la nigellone	15
Figure 13 : Schéma illustrant la méthode des aromagrammes.....	15
Figure 14 : Les effets du stress oxydant.....	16
Figure 15 : Propriétés anticancéreuse de <i>Nigella sativa</i>	18
Figure 16 : Schéma récapitulatif des protocoles expérimentaux. CMI (concentration minimale inhibitrice).....	21
Figure 17 : Appareil d'expression à froid de l'huile de Nigelle.....	22
Figure 18 : Montage d'extraction par le Clevenger (hydrodistillateur standardisé) et de l'ampoule à décanter	23
Figure 19 : Souris albinos	26
Figure 20 : Produits anesthésiants : anesthésie 1 % générale	26
Figure 21 : Produits de référence diclofénac 75mg	26
Figure 22 : Pesées et identification de toutes les souris des lots.....	27
Figure 23 : Cage d'observation	27
Figure 24 : Répartition des lots	27
Figure 25 : Injection intra plantaire dans la patte gauche du la souris	29
Figure 26 : Oedème de la patte postérieure gauche de la souris	29
Figure 27 : Souris recevant notre solution par gavage	29
Figure 28 : Injection intra péritonéale de l'Anesthésie	29
Figure 29 : Animal anesthésié.....	29
Figure 30 : Principe de la méthode de diffusion sur disque	30

Liste des figures

Figure 31 : La haute ou la paille de travail.....	32
Figure 32 : Les différentes suspensions préparées. A : bactéries; B : champignons.....	33
Figure 33 : préparation de l'inoculum et l'ensemencement.....	33
Figure 34 : Dépôt des disques dans des boîtes pétri.....	35
Figure 35 : Micromètre (pied à coulisse)	35
Figure 36 : Réduction du radical DPPH par un antioxydant ou Influence de la concentration sur l'intensité de la couleur du DPPH•.....	37
Figure 37 : Résultat de l'activité antibactérienne de l'HF sur <i>Bacillus Cereus</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> et sur Céfalexine.....	44
Figures 38 : Photos des boîtes de pétri montrant l'activité antimicrobienne (AAM) de l'HF sur les bactéries utilisés (Evaluation de la CMI).....	46
Figure 39 : Résultats d'activité antioxydante DPPH.....	47
Figure 40 : Pourcentage d'inhibition pour l'huile végétale de <i>N. sativa</i> L. et la vitamine C	47
Figure 41 : Courbe de tendance de l'IC50 de l'huile fixe de <i>Nigella sativa</i> L	48
Figure 42 : Courbe de tendance de l'IC50 de la vitamine C	48

Liste des figures en Annexe

Figure 01 : Les pattes gauches et droites des souris de trois lots d'essais respectivement (D1, D2, D3).	
Figure 02 : Sacrifice des souris par dislocation cervicale.	
Figure 03 : Coupure des pattes à la hauteur de l'articulation.	
Figure 04 : <i>Fiche Technique d'Antibiogramme.</i>	
Figure 05 : Paroi des bactéries à Gram –.	
Figure 06 : Photographie au microscope optique de bactéries <i>Escherichia coli</i> .	
Figure 07 : <i>Pseudomonas Aeruginosa</i> sur gélose de Cétrimide.	
Figure 08 : Paroi bactéries à Gram +.	
Figure 09 : Photographie au microscope optique de bactéries <i>Staphylococcus aureus</i> .	
Figure 10 : Photographie au microscope optique de bactéries <i>Bacillus subtilis</i> .	
Figure 11 : <i>Candida albicans</i> .	
Figure 12 : <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	
Figure 13 : Les colonies. A : bactériennes ; B : fongiques.	
Figure 14 : Les colonies bactériennes pour la CMI.	

Liste des figures

Figure 15 : les milieux de cultures Gélose Saburraux (SB) et Gélose Müller –Hinton (MH).

Figure 16 : A- Etuve B-Bain marie (liquéfié les milieux de cultures); C-Autoclave (stérilisé les verreries).

Figure 17 : incubateur à 37°C/24hles bactéries (A) et à 30°C/48H levure (B).

Figure 18 : agitateur vortex.

Liste des tableaux

Tableau 01 : Les différentes espèces de Nigelle	5
Tableau 02 : Description botanique de <i>Nigella sativa</i> L.....	6
Tableau 03 : Composition en oligo-éléments des graines de <i>Nigella sativa</i>	9
Tableau 04 : Composition des graines de <i>Nigella sativa</i>	9
Tableau 05 : Différents produits à base d'huile de Nigelle	19
Tableau 06 : Présentation de l'espèce de nigelle (<i>Nigella Sativa</i> L) étudiée.....	20
Tableau 07 : Screening phytochimique.....	24
Tableau 08 : Le matériel de laboratoire utilisé pour l'activité anti-inflammatoire.....	26
Tableau 09 : Les microorganismes choisis pour l'activité antibactérienne	31
Tableau 10 : Les champignons choisis pour l'activité antifongique.....	31
Tableau 11 : Résultat des tests phytochimiques et les colorations obtenues par le criblage sur l'extrait de <i>Nigella sativa</i>	39
Tableau 12 : Les valeurs représentant le pourcentage et l'inhibition d'œdème	41
Tableau 13 : La sensibilité des différentes souches vis vis-à-vis des H.Es selon le comité Français de Microbiologie.....	42
Tableau 14 : Résultats de l'étude qualitative de la zone inhibitrice des bactéries	43
Tableau 15 : Résultats de l'étude qualitative de la zone inhibitrice des champignons en mm	45
Tableau 16 : Les valeurs de la CMI de l'HF vis-à-vis des souches testées	46

Liste des tableaux en Annexe

Tableau 01 : Poids des pattes gauche et droite des souris avec leurs moyennes pour l'hydrolat.	
Tableau 02 : Poids des pattes gauche et droite des souris avec leurs moyennes pour le Diclofénac de sodium 75mg/kg.	
Tableau 03 : Poids des pattes gauche et droite des souris avec leurs moyennes pour le Témoin (solution physiologique 0.9%).	

Glossaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

I. Généralités de sur la nigelle	3
I.1. Histoire et utilisation traditionnelle de <i>Nigella sativa L</i>	3
I.2. Étymologie et taxonomie	4
I.3. Différentes espèces de nigelles L.....	4
I.4. Description botanique de <i>Nigella sativa L</i>	6
I.5. Classification botaniques	7
I.6. Culture en Algérie.....	7
Les exigences de la culture.....	8
I.7. Rendement de production de graines de <i>Nigellasativa L</i>	8
II. Compositions chimique.....	8
II.1. Compositions générales	8
II.2. Métabolites secondaires.....	9
II.2.1. Synthèse de la thymoquinone	10
II.2.2. Saponosides	11
II.2.3. Polyphénols et flavonoïdes.....	11
II.2.4. Alcaloïdes	12
II.3. Rôle écologique potentiel des composés secondaires	12
II.3.1. Favoriser la coopération avec les animaux.....	12
II.3.2. Lutter contre la compétition avec d'autres plantes.....	12
II.3.3. Lutter contre la prédation et les attaques des agents pathogènes	13
II.3.4. Les métabolites secondaires des plantes utilisés par les animaux	13
II.4. Conclusion	13
III. Activités biologiques et Propriétés pharmacologiques	14
III.1. Propriétés anti-inflammatoires et analgésiques.....	14
III.2. Activité cicatrisante.....	14
III.3. Propriétés antibactériennes et antifongiques	15
III.3.1- L'aromatogramme	15

Sommaire

III.3.2- Microatmosphères	15
III.4. Activité antioxydante	16
III.4. 1. Le stress oxydant et les pathologies	16
III.5. Propriétés gastro-protectrices	17
III.6. Propriétés spasmolytiques	17
III.7. Propriétés hépatoprotectrices	17
III.8. Propriétés anticholestérolémiantes	17
III.9. Propriétés anthelminthiques	17
III.10. Propriétés immunostimulantes (la réponse immunitaire).....	17
III.11. Propriétés antitumorales	18
IV. La toxicité de <i>Nigella Sativa</i>	18
V. Produits à base de Nigelle à travers le monde.....	19

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1. OBJECTIFS	20
II.2. Matériels et méthodes	20
II.2.1. La méthode adoptée	21
II.2.2. Extraction des huiles	22
a. l'huile fixe	22
b. l'huile essentielle	22
c. L'hydrolat (l'huile essentielle) de graine de nigella sativa L	23
→ Comment choisir une bonne huile de nigelle?	23
d. Rendement d'extraction	24
II.2.3. Screening phytochimique	24
II.3. Evaluation de l'activité pharmacologique	25
II.3.1. Etude de l'activité anti-inflammatoire (in vitro).....	25
II.3.1.1. Matériel animal	25
II.3.1.2. Produits	26
A. Anesthésiants	26
B. Produit de référence : diclofénac 75mg	26
C. Réactifs utilisés	26
II.3.1.3. Matériel de laboratoire	26
II.3.1.4. Méthodologie (protocole expérimentale).....	27
✓ 1 ^{ère} partie	27

Sommaire

A. Répartition des lots (Constitution des lots).....	27
✓ 2 ^{ème} partie	28
B. Préparation des dilutions d'huile fixe	28
C. Préparation de la solution de carragénine	28
Mode opératoire	28
→Au temps T _{30min}	28
→Au temps T _{4h}	28
→Expression des résultats.....	28
II.3.2. Etude de l'activité antibactérienne et antifongique (in vitro)	30
II.3.2. 1. But et principe	30
II.3.2.2. Choix des souches bactériennes et fongiques.....	30
a) Obtention de souches pures isolées	30
→Préparation et Choix des milieux de culture	31
II.3.2.3. Protocole expérimental	32
a. Purification des souches	32
b. Préparation de l'inoculum	32
A. Pour les bactéries.....	32
B. Pour les levures (moisissures)	32
c. L'ensemencement par inondation.....	33
→Examen de l'échantillon.....	34
✓ Préparation de la 1 ^{ère} couche du milieu	34
✓ Préparation de la 2 ^{ème} couche du milieu	34
d. Application (dépôt) des disques imprégnés d'HE et incubation ...	34
→Résumé de diffusion sur le milieu gélosé.....	35
II.3.2.4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices CMI des extraits analysés (Etude quantitative).....	36
II.3.2.4.1. Préparation des dilutions d'HE dans le milieu de culture .	36
II.3.2.4.2. Lecture	36
II.3.3. Etude de l'activité antioxydante (in vitro).....	37
II.3.3.1. Effet scavenger du radical DPPH	37
II.3.3.2. Préparation de la solution du DPPH et les suspensions.....	37
II.3.3.3. Lecture des résultats	37
II.3.3.4. Détermination de la concentration inhibitrice IC ₅₀ %.....	38

Sommaire

Chapitre III : Résultat et discussion

III.1. Tests phytochimiques	39
→ Rendement de l'extraction.....	40
→ Caractérisation organoleptique.....	40
III.2. Les activités biologiques	40
III.2.1. Test anti-inflammatoire (discussion des résultats)	40
III.2.2. Test antibactériennes et antifongiques (discussion des résultats)	42
III.2.2.1. L'échelle de lecture des zones d'inhibition.....	42
III.2.2.2. Détermination de la CMI.....	46
III.2.3. Test d'activité antioxydant (discussion des résultats)	47
III.2.3.1. Piégeage du radical libre DPPH.....	47
III.2.3.2. Détermination de l'IC ₅₀	48

Conclusion générale

Perspectives

Annexes

Références bibliographiques

The background is a complex, multi-colored abstract pattern. It features a large, light blue thought bubble with a white outline, containing the text 'Introduction générale' in red. The bubble is connected to three smaller, similar bubbles on the left side. The background itself is a mix of warm brown and orange tones, with a large, dark blue, textured shape on the left. The overall appearance is that of a digital or pixelated artwork.

Introduction générale

Introduction générale

Depuis l'antiquité, les plantes ont permis à l'homme non seulement de se nourrir, se vêtir, se chauffer, se parfumer...mais aussi de maintenir son équilibre, soulager ses souffrances, préserver et soigner les maladies qui nuisent à sa santé.

Et depuis l'apparition de l'épidémie de la Covid-19 (Coronavirus : virus ciblant différents organes à l'exception des poumons), les chercheurs voient la nigelle comme un potentiel antiviral puissant, plusieurs études scientifiques portées sur l'étude de sa composition chimique, et ses multiples propriétés pharmacologiques, ont été réalisées et démontrent que la plante possède des molécules intéressantes pourrait améliorer l'activité du système immunitaire pour limiter la propagation et diminuerait les chances de réplication du SRAS CoV-2 dans notre organisme [1].

La *Nigella sativa L.* également connue sous le nom Cumin noir est une plante à fleurs annuelle appartenant à la famille des Ranunculaceae, originaire de Chine, du sous-continent indien, Méditerranée orientale, Asie occidentale et Afrique du Nord.

Traditionnellement utilisée depuis des millénaires à des fins médicinales et culinaires comme condiment grâce à la phytothérapie et l'aromathérapie, qui est susceptible d'être utilisée dans différents domaines de la biotechnologie tels qu'en pharmacie, parfumerie, cosmétique et en agro-alimentaire et ce pour leurs propriétés thérapeutiques et odorantes.

En août 2019, une méta-analyse a révélé que huit études scientifiques avaient déjà montré que les composants de la nigelle, à savoir la nigellidine, l'alpha-hédérine, l'hédéragénine, la thymohydroquinone et la thymoquinone pourraient modérer l'action des enzymes et protéines du SRAS CoV-2, responsables de la réplication du virus. D'autre part, une étude chinoise a reconnu les effets immuno-modulateurs de ces mêmes molécules [1].

En effet, en septembre 2019, de nouvelles recherches sur l'effet de la nigellidine sur le rat ont confirmé son activité immuno-modulatrice, anti-inflammatoire et inhibitrice potentielle des protéines du SRAS CoV-2 [1].

Une analyse indique que l'action antivirale double, applicable à la COVID-19 de la thymoquinone (TQ) est similaire et probablement supérieure à celle de la chloroquine (CQ) et de l'hydroxychloroquine (HCQ), cependant, apparemment sans les effets indésirables déclarés pour le CQ et du HCQ. Le large spectre antiviral et le mécanisme par lequel TQ neutralise vraisemblablement le nouveau virus justifie l'hypothèse que TQ est efficace dans le traitement de COVID-19. Une fois libéré le système respiratoire, la nature hydrophobe de la cargaison facilite son attachement au lipophile enveloppe du CoV-2 du SRAS [1].

Rien d'étonnant puisque le Prophète Mohammed (paix et prière d'Allah sur lui) a incité les croyants à son utilisation en insistant sur les bienfaits de cette graine et a dit à ce sujet dans

un hadith authentique rapporté par l'imam Al Boukhari : « *Il y a dans la graine de nigelle un remède contre toute maladie, sauf contre la mort.* » (Al-Bukhârî n°5688). Nous croyons en cela et les études médicales ont mis en avant la véracité de cette parole.

Il a dit aussi : « *Certes Allah n'a pas envoyé une maladie sans qu'Il n'ait envoyé avec elle un remède* » [2].

Je vous invite à travers ce travail, à découvrir ce trésor naturel méconnue, suscitant un véritable intérêt dans le monde. En commençant, nous vous présentons la synthèse des données actuelles concernant cette plante et les perspectives thérapeutiques notamment pour les pandémies à virus, ainsi rendre clair et évaluer les activités biologique in vitro des extraits de cette plante aromatique et médicinale.

Notre manuscrit sera scindé en trois parties :

Dans la première partie une recherche bibliographique consacrée à une description générale de la plante *Nigella sativa L* par sa composition chimique. Nous poursuivrons par l'étude des propriétés pharmacologiques de *Nigella sativa L*. pour avoir un aperçu sur ses potentialités thérapeutiques dans plusieurs pathologies. Néanmoins *Nigella sativa L*. n'est pas dénuée d'une certaine toxicité, ainsi nous aborderons dans la seconde partie, la partie expérimentale, qui décrit les démarches méthodologiques, et qui porte sur l'extraction et le rendement en huile essentielle, ainsi que l'évaluation de leur activité anti-inflammatoire, antibactérienne, antifongique et antioxydant qui peuvent être employés pour se protéger contre les effets du stress oxydant [3].

Les résultats et la discussion de chaque expérimentation de notre travail, sont présentés dans la troisième partie qui lui est dédiée.

Pour terminer, une conclusion générale sur l'ensemble de cette étude ainsi que les perspectives dégagées.



Chapitre I

**Synthèse
bibliographique**

I. Généralités de sur la nigelle

I.1. Histoire et utilisation traditionnelle de *Nigella sativa* L.

Au cours de l'histoire, le cumin noir a été utilisé comme un élément nutritif, préventif et curatif. En effet la phytothérapie, c'est-à-dire l'usage des plantes à des fins thérapeutiques remonte à l'Antiquité comme le prouve la découverte des fossiles du début du Crétacé (-250 millions d'années) témoignant de l'existence de la nigelle à la fin de l'Ère secondaire [4].

En effet, la nigelle a été trouvée sur la tombe de Toutankhamon, elle était considérée par les Egyptien de l'antiquité comme une panacée. Les nombreuses vertus thérapeutiques d'huile de cette plante semblaient déjà être connues. Pour preuve, des archéologues ont découvert un flacon d'huile de nigelle dans la tombe de ce pharaon, d'où l'attribution du nom de « remède des Pharaons », « trésor des Pharaons ». 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 [5].



Figure 01 : Découverte de la tombe de Toutankhamon en 1922 par l'archéologue anglais Carter
Dans la Bible, *Nigella sativa* est identifiée comme étant « le cumin noir curatif » [6].

A l'arrivée de l'islam, cette utilisation est devenue beaucoup plus accentuée au niveau de la communauté musulmane.

Cette plante a été utilisée depuis des siècles pour traiter les maladies comme : l'asthme bronchique, la bronchite, les rhumatismes et douleurs inflammatoires associées, pour augmenter la production de lait chez la femme allaitante (allaitement, dysménorrhée), pour traiter les désordres digestifs et favoriser l'élimination, pour *stimuler le système immunitaire* et lutter contre les infestations (parasitaires, intestinales et respiratoires), la digestion.

En médecine arabe : Les graines sont utilisées dans le traitement de l'hypertension artérielle et du diabète [7].

Elle est indiquée aussi dans la médecine Ayurvédique (médecine ancienne indienne) [8].

La figure 02 résume bien toutes les indications médicales traditionnelles de cette graine.

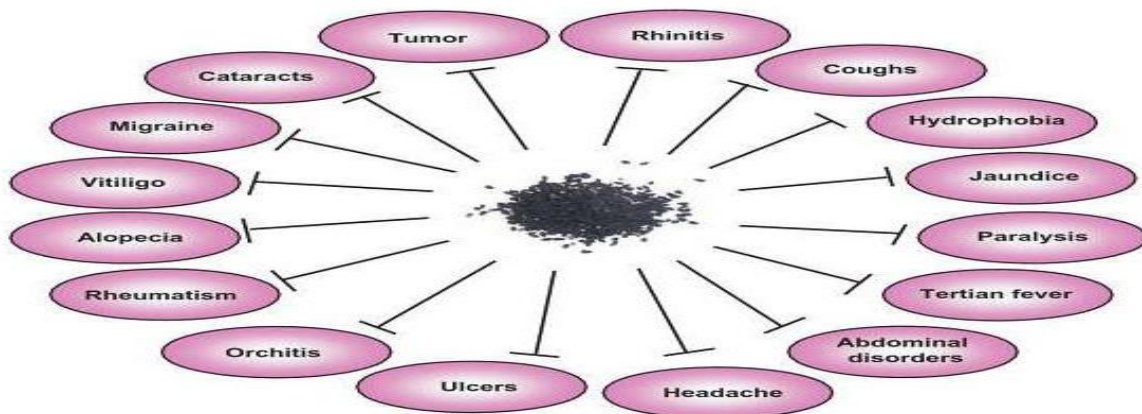


Figure 02 : Usages traditionnels de *Nigella sativa*, [8].

I.2. Étymologie et taxonomie :

Le nom de genre « nigelle » découle du latin « niger » ou « nigellus » qui signifie noirâtre, se référant à la couleur noire de ses graines (figure 03) [9].

Quant au nom d'espèce « sativa », il signifie « semer » ou « cultiver ».



Figure 03 : Graine de Nigelle cultivée.

Les grecs nommaient *Nigella sativa* « μέλανθιον » melanthion, de « melas » qui veut dire noir et « anthos » fleur, donc l'étymologie tire du même attribut [10].





Nigella sativa a également de nombreux noms vernaculaires dans le monde selon les pays et les régions dans lesquelles elle était utilisée

- **Noms communs** : cumin noir ou graines noires, nigelle cultivée.
- **Nom anglais** : Black seed.
- **Nom français** : Nigelle cultivée, nigelle bâtarde, faux cumin, cumin noir, sésame noir, poivrette, la neille, cheveux de Vénus, herbe aux épices.
- **Nom arabe** : Sanouj, Habbat el baraka, El habba souda
- **Nom kabyle** : Tikammin et *Sinoudjen* Algérie[11].
- **Nom scientifique** : *Nigella sativa* L[12].

I.3. Différentes espèces de nigelles L.

Le genre *Nigella* recouvre plusieurs espèces. Les plus connues sont *Nigella sativa* (Nigelle cultivée), *Nigella arvensis* (Nigelle des champs), *Nigella damascena* (Nigelle de Damas) et *Nigella orientalis* (Nigelle orientale) [13].

Tableau 01 : Les différentes espèces de Nigelle [14].

Noms	Localisation	Description
<p><i>Nigelladamascena</i> L. est appelée aussi <i>N.aristata</i>, <i>N. cretensis</i>, <i>N. latifolia</i>, <i>N. tenuiflora</i>, <i>N.Tuberculata</i></p>	<p>-En France : dans le midi, dans l'ouest et dans le sud-ouest. -En Europe : en Suisse, en Belgique et en région méditerranéenne. -Hors Europe : dans le nord de l'Afrique, dans les îles de Madère et des canaries.</p>	 <p>Plante herbacée annuelle, jusqu'à 60 cm de hauteur. Cette fleur se distingue des 4 autres espèces par son involucre à longues lanières enchevêtrées disposé immédiatement sous la fleur.</p>
<p><i>Nigellaorientalis</i> L. est appelée aussi <i>Nigellastrumflavum</i>, <i>Nigellastrum orientale</i>.</p>	<p>Sud-ouest de l'Asie. -En Europe.</p>	 <p>plante herbacée annuelle, peut aller jusqu'à 45 cm de haut ou aussi bas que 10 cm, simple ou peu ramifiée.</p>
<p><i>Nigellahispanica</i> L. est appelée aussi <i>N. amoena</i>, <i>N. gallica</i>, <i>N. confusa</i>.</p>	<p>En France : midi et sud-ouest. -En Europe : Espagne et Portugal. -Hors Europe : Afrique du Nord.</p>	 <p>plante annuelle, jusqu'à 35 cm de haut, dressée, peu ramifiée et non involucree.</p>
<p><i>Nigellaarvensis</i> L. est appelée aussi <i>N.aristata</i>, <i>N. cretensis</i>, <i>N. latifolia</i>, <i>N. tenuiflora</i>, <i>N.Tuberculata</i>.</p>	<p>-En France : présente principalement sur les sols calcaires elle est cependant rare dans l'ouest et le centre. -En Europe : Europe centrale et méridionale. -Hors Europe : Asie occidentale, Nord de l'Afrique.</p>	 <p>Plante herbacée annuelle jusqu'à 45 cm, très légèrement ramifiée; à grande fleur isolée sans involucre.</p>

Les espèces les plus étudiées sont 05 espèces : *Nigella damascena*, *Nigella hispanica* L., *Nigella arvensis* L ; *Nigella orientalis* L et *Nigelle sativa* L.

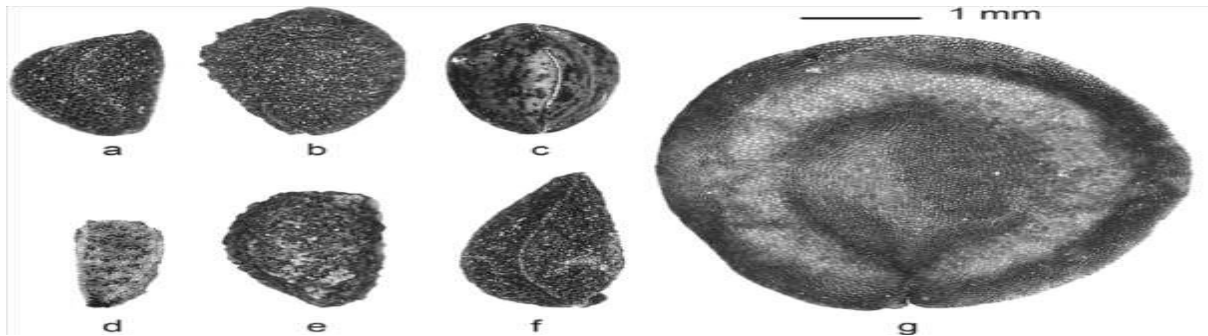


Figure 04 : Les graines de différentes espèces de nigelles, **a** *N. arvensis*L., **b** *N. damascena*L., **c** *N. hispanica*L., **d** *N. integrifolia*Regel, **e** *N. nigella strum* Willk., **f** *N. sativa* L., **g** *N. orientalis*L

I.4. Description botanique de *Nigella sativa* L

La nigelle est une plante herbacée annuelle érigée, atteignant 30 à 60 cm de hauteur, de croissance rapide, avec une végétation bien développée. C'est une plante hermaphrodite à reproduction autonome, qui possède :

Tableau 02 : Description botanique de *Nigella sativa* L [15][16][6].

Partie de la plante	Figures
<p>Tige : La tige est fortement ramifiée, subcylindrique, nervurée et creuse quand elle est sèche. De couleur vert clair à vert foncé.</p>	
<p>Feuille : La feuille est plumeuse, divisée en lobes étroits, elle est lancéolée à linéaires et présente des onglets nectarifères. Les feuilles inférieures sont petites et pétaloïdes et les supérieures sont longues.</p>	
<p>Fleur : Les fleurs sont solitaires, axillaires et terminales. Elles sont bisexuées, radiales, très riches en nectar. Elles sont petites à pétales blanchâtres et sépales pétaloïdes de couleur bleu clair et présentent de nombreuses étamines insérées sur le réceptacle.</p>	
<p>Fruit : Le fruit est une capsule formée de follicules soudés, s'ouvrant au sommet par une fente interne</p>	
<p>Graine : La graine est de couleur noirâtre, avec un tégument assez dur orné de stries. La graine faisant en moyenne 2-3 mm dans le sens de la longueur, elle a une base large puis se rétrécit en forme triangulaire anguleuse. En l'écrasant entre les doigts, elle dégage une odeur de camphre.</p>	

I.5. Classification botaniques



Figure 05 : Aspect morphologique de la plante *Nigella sativa*, d'après [16].

- **Hauteur :** 20 cm à 70 cm
- **Couleurs des fleurs :** Blanc, Rose, Violet, Bleu
- **Exposition souhaitée :** Ensoleillée
- **Type de sol :** Sableux, Sec, Drainé, Acide
- **Période de plantation :** Mars, Avril, Mai
- **Période de floraison :** Juin, Juillet, Août, Septembre.
- **Feuillage :** Caduc
- **Entretien :** Arrosage modéré, facile d'entretien.

I.6. Culture en Algérie

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 pH 6-7 mais préfère le sable sol limoneux, elle est assez tolérante à la sécheresse et peut survivre sans des sols secs mais nécessite un arrosage régulier pendant les périodes de sécheresse prolongée[17].

La plante est très facile à cultiver chez nous, il lui faut par contre pas mal de soleil.

La nigelle est très peu cultivée en Algérie, elle est limitée à l'échelle traditionnelle dans les régions de : Ouargla, Biskra, Timimoun, Adrar, Médéa et Skikda [18] [19] [20].

En Algérie, elle est cultivée uniquement de manière traditionnelle principalement dans les Oasis[12].

➔ **Les exigences de la culture :**

La nigelle préfère :

- Des climats doux.
- Une exposition ensoleillée et

Elle demande

- Des sols riches, meubles et bien

I.7. Rendement de production de graines de *Nigellasativa L*

En moyenne le rendement de la graine de nigelle est de 160 à 240 kg par hectare. Le meilleur rendement est obtenu pour une quantité de semis de 2 kg/ha, et avec un espacement entre plants de 15cm. L'augmentation du nombre de plants au-delà d'un seuil optimal, pour une surface donnée, provoque une baisse de rendement par une compétition négative entre les plantes [21].

II. Compositions chimique

II.1. Composions générales

La plus par des études phytochimiques exécuter pour déterminer la composition chimique et les principes actifs des graines de *Nigella sativa L*, ont révélées qu'elle est riche par: des lipides, protéines, acides aminés, glucides et des métabolites secondaires en quantité bien moins grande : terpénoïdes, polyphénols, alcaloïdes, acides organiques (Ces métabolites secondaires jouent un rôle de protection contre les attaques d'herbivores ou de pathogènes et améliorent l'efficacité de la reproduction). Elles contiennent aussi des monosaccharides tels que le glucose, rahmnose, xylose, arabinose et des polysaccharides non amidonnés sous forme de fibres alimentaires [22]. Ces substances chimiques qui sont varient en fonction des lieux de récoltes, de la période de récolte, des conditions climatiques, des procédés de cultures, de stockage, la nature de la terre et d'autres facteurs, ainsi que les méthodes d'extraction et de détection.

En plus de ces composés majoritaires, *Nigella sativa L* contient des huiles essentielles, des huiles fixes et des acides gras. Elle contient aussi plusieurs vitamines (A, B, B2, C et Niacine) et des sels minéraux {calcium (Ca), potassium (K), phosphore (P), sodium(Na), fer (Fe), zinc (Zn), magnésium (Mn) et sélénium (Se)} [23].

Tableau 03 : Composition en oligo-éléments des graines de *Nigella sativa* [25].

Minéraux (Oligo-éléments)	Valeur nutritive pour 100g
Potassium	808g
Calcium	570g
Phosphore	543g
Magnésium	265g
Sodium	17,6g
Fer	9,70g

Les graines de *Nigella sativa* L. contiennent 36%-38% d'huiles fixe, protéines, alcaloïdes, saponine (α -hederine) et 0,4 à 2.5% d'huile essentielle (volatile) [25].

La majeure partie de l'activité biologique de *Nigella sativa* est attribuée à la thymoquinone qui est la composante principale de l'huile essentielle, mais également présent dans l'huile fixe [11].

Tableau 04 : Composition des graines de *Nigella sativa*, d'après [26][27][28][29][30].

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
Eau	6

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

II.2. Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires appartiennent à des groupes chimiques très variés tels les alcaloïdes, les terpènes, les composés phénoliques, etc. [31] [32].

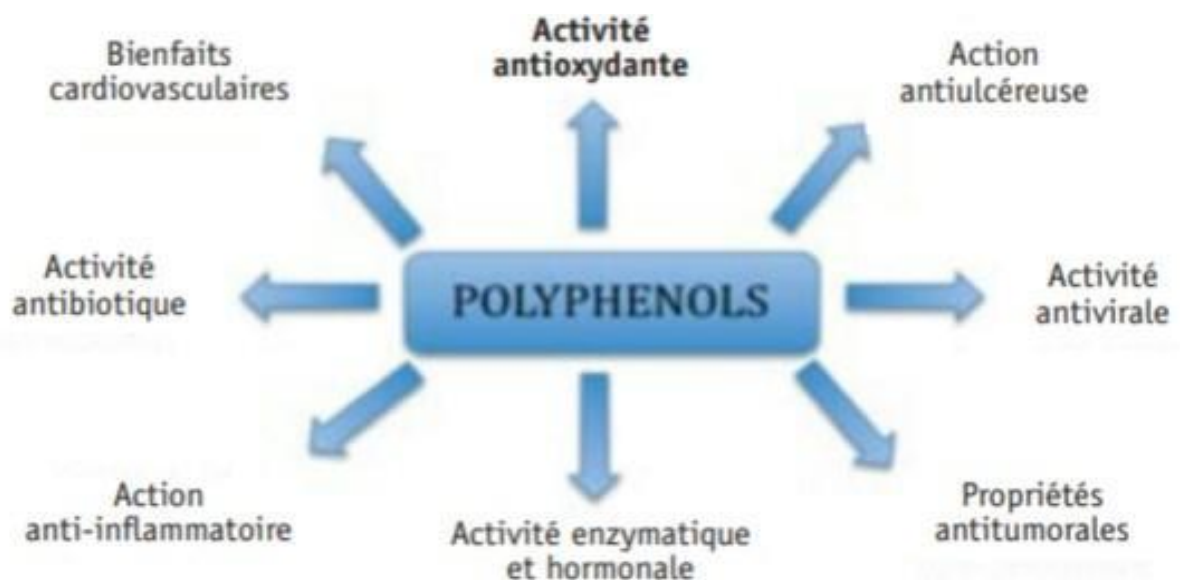


Figure 06 : Activité biologique des polyphénols [33].

II.2.1. Synthèse de la thymoquinone

C'est en 1963 que la thymoquinone, monoterpène oxygéné, a été isolée dans l'huile de nigelle, par El-Dakhakhny, et d'autres études ont mis en évidence les principaux constituants [34].

La thymoquinone ou **2-isopropyl-5-methyl-p-benzoquinone** est une poudre cristallisée de couleur jaune. Soluble dans les solvants organiques tels que l'éther, le chloroforme ou l'éthanol, mais partiellement soluble dans l'eau. Elle possède un point de fusion de 45-47°C, sa formule moléculaire est $C_{10}H_{12}O_2$, et son poids moléculaire de 164,2 g/mol, a été identifié comme le principal composant (jusqu'à 50 %) en plus du p-cymène (40 %), de l' α -pinène (jusqu'à 15 %), la dithymoquinone et la thymohydroquinone. D'autres dérivés du terpène n'ont été trouvés qu'à l'état de traces quantités ; Carvacrol, carvone, limonène, 4-terpinéol, et le citronellol [35].

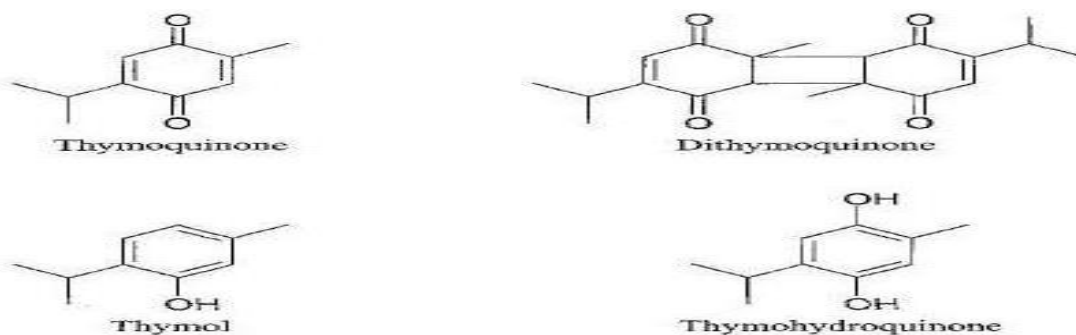


Figure 07 : Représentation chimique de la thymoquinone et de ses dérivés retrouvés dans l'huile essentielle de *N. sativa* L.

Le motif thymoquinonique n'existe dans aucune famille de médicaments, par contre on peut retrouver des motifs benzo- ou naphthoquinoniques comme dans la mitomycine C, la rifampicine ou encore la vitamine K. Le motif benzoquinone est un bon accepteur d'électrons, il est facilement réduit en *p*-hydroxyphénol, et inversement. Tous peuvent donc intervenir dans des processus de transfert d'électrons dans l'organisme.

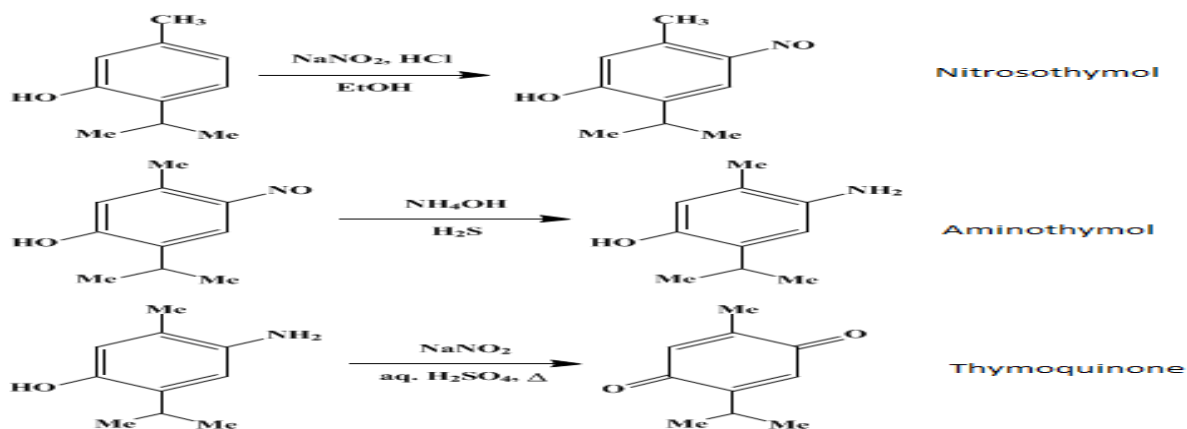
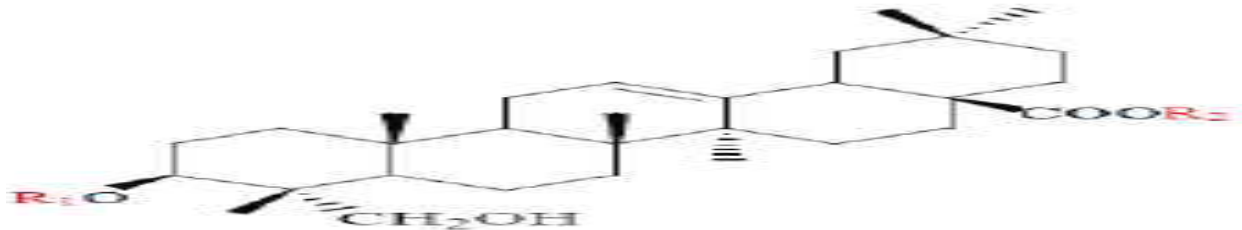


Figure 08 : Synthèse de la thymoquinone à partir de thymol, d'après [36].

II.2.2.Saponosides

Les saponosides sont des hétérosides de stérols ou de triterpènes; ils sont très largement distribués dans les végétaux. Solubles dans l'eau, ils libèrent par hydrolyse un ou plusieurs oses et une génine (sapogénine)[37]. Une de leurs caractéristiques est la propriété tensioactive les saponosides se dissolvent dans l'eau en formant des solutions moussantes [38].

En 1882, Greenisch est isolée au XIXème siècle la première saponine de nigelle sativa qui nommée mélanthine, dont l'aglycone est l'hédéragénine [37].



R1

1 = α -L-rha (1-2)- α -L-ara
 2 = β -D-xyl (1-3)- α -L-rha (1-2)- α -L-ara
 3 = α -rha (1-2)- α -L-ara
 4 = β -D-xyl (1-3)- α -L-rha (1-2)- α -L-ara
 Avec : 1 = α -hédérine

R2

H
 H
 α -rha (1-4)- β -D-glu (1-6)- β -D-glu
 α -rha (1-4)- β -D-glu (1-6)- β -D-glu

Figure 09 : Structure des saponosides à hédéragénine isolés des graines de *Nigella sativa* L.

II.2.3. Polyphénols et flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments végétaux et composés aromatiques (de la famille des polyphénols), simples ou glycosylés, responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles, ils présentent une source importante d'antioxydants dans nos alimentations.

Trois flavonoïdes triglycosylés (figure 11) ont été isolés à partir des graines de *Nigella sativa* et leurs structures ont été déterminées [39]:

- 1) quercétine 3-glycosyl (1→2) galactosyl (1→2) glucoside.
- 2) kœmpférol 3-glycosyl (1→2) galactosyl (1→2) glucoside.
- 3) quercétine 3-(6-feruloglucosyl) (1→2) galactosyl (1→2) glucoside.

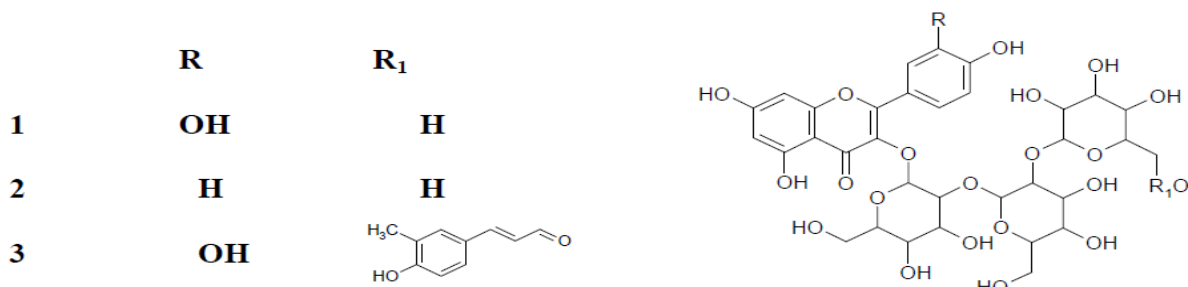


Figure 10 : Structure chimique des trois flavonoïdes isolés de *Nigella sativa* L

En 2008, quatorze composés phénoliques ont été isolés à partir d'un extrait méthanolique de pousses et de racines de *N. sativa*.

II.2.4. Alcaloïdes

Ce sont des composés organiques azotés basiques, d'origine naturelle, (le plus souvent d'origine végétale), de structure moléculaire complexe et doué de propriétés physiologiques et thérapeutiques prononcées même à faible dose [37][40].

En effet, ces substances présentent à faible dose une multitude d'activités pharmacologiques telles qu'anti-tumorale, antiparasitaire, qui à forte dose peuvent devenir très toxiques.

Ce qui est très intéressant dans la graine de Nigelle c'est cette caractéristique rarement observée de présence d'alcaloïdes majoritaires de trois structures de base différentes :

- Nigellicine[41] et nigellidine, ayant un noyau indazol[42], →(alcaloïdes indazoliques)
- L'isoquinone nigellimine[43] et son N-oxyde[41] →(alcaloïdes isoquinoléiques)
- Les alcaloïdes diterpènes Dollablane-types nigellamines A1, A2, B1, B2, A3, A4, A5, et C [44]. →(alcaloïdes diterpéniques)

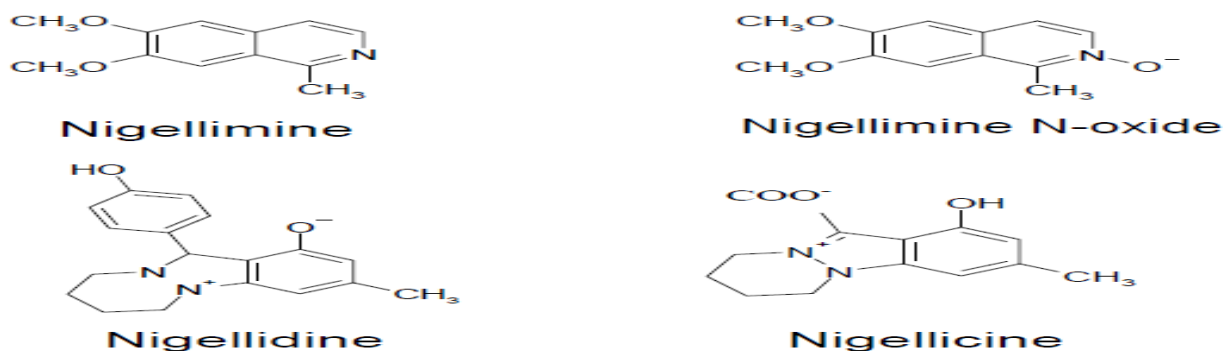


Figure 11 : Structure chimique des principaux alcaloïdes de *N. sativa* L.

II.3. Rôle écologique potentiel des composés secondaires

II.3.1. Favoriser la coopération avec les animaux

Les métabolites secondaires peuvent être des moyens de signalisation et d'interaction entre les plantes et les animaux disséminateurs ou pollinisateurs par l'intermédiaire de couleurs (anthocyanes, caroténoïdes...) et d'odeurs (HE et différentes substances volatiles) [45].

II.3.2. Lutter contre la compétition avec d'autres plantes

Des phénomènes d'allélopathie « toxicité pour les autres » sont connus pour différentes espèces de plantes. Ainsi les feuilles de noyer contiennent un glucoside phénolique qui, lorsqu'elles tombent au sol, s'hydrolyse et s'oxyde en juglone 24 sous l'action de la pluie.

La juglone est une Naphtoquinone, toxique pour la plupart des plantes, empêchant leur germination, excepté quelques-unes comme le paturin qui est devenu résistant[46][47].

II.3.3. Lutter contre la prédation et les attaques des agents pathogènes

On prête aux métabolites secondaires des plantes un rôle de défense contre les prédateurs et les pathogènes. Certaines observations semblent en accord avec cette hypothèse.

Ce sont souvent ces formes immatures qui produisent des défenses chimiques qui disparaissent ensuite [48].

II.3.4. Les métabolites secondaires des plantes utilisés par les animaux

Si beaucoup de plantes semblent à l'abri de l'attaque des prédateurs grâce à leur composition chimique, certaines subissent néanmoins l'attaque d'animaux qui se sont spécialisés, pouvant ainsi exploiter, voire même ravagé, certaines espèces. Voici un exemple.

Des insectes peuvent utiliser des substances d'origine végétale comme protection par rapport aux prédateurs : la chenille du papillon *Danaus plexippus* se nourrit sur une Asclepiadacées contenant des cardénolides cardiotoxiques. Les prédateurs de ces insectes, des oiseaux, évitent alors ceux qui se sont nourris sur cette plante [46][47].

Cet exemple montre la multiplicité des stratégies et des interactions existant au sein des systèmes plantes-pathogènes-prédateurs. Aux mécanismes de défense des plantes, répondent des adaptations des insectes par exemple. Une coévolution et une diversification des mécanismes s'ensuivent.

II.4. Conclusion

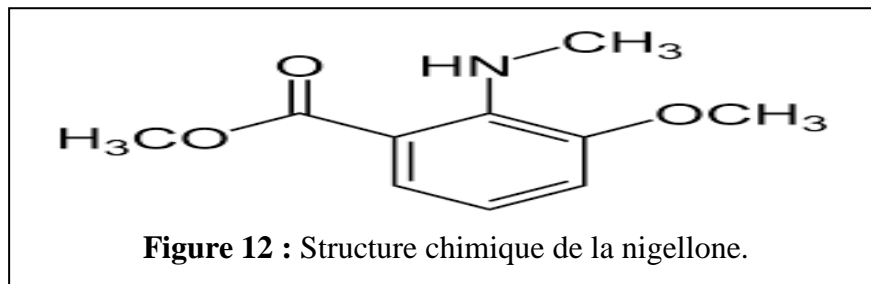
La chimie de la graine de *N. sativa* est remarquable par la présence simultanée d'une huile fixe et d'une huile essentielle. Voici résumés les points importants de cette composition :

- ❖ Une forte teneur en huile grasse (32%) 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.

- ❖ La présence d'une huile essentielle (0,4 à 0,5 %) composée majoritairement de monoterpènes. On y trouve aussi le composé actif de l'huile fixe, la thymoquinone et des dérivés soufrés : les disulfides.

- ❖ On a pu en outre identifier 12 alcaloïdes de 3 types chimiques différents ; plusieurs saponosides dont l' α -hédérine et des composés phénoliques : hétérosides de flavonol, isobenzofuranone et hydroxyacétophénone. Les graines de Nigelle contiennent aussi des protéines (20%), des minéraux (fer, zinc, phosphore), des vitamines du groupe B (surtout B1).

Des propriétés antihistaminiques et une action cicatrisante ont été observées avec la nigellone [54].



III.3. Propriétés antibactériennes et antifongiques

L'huile végétale, l'huile essentielle et la thymoquinone ont des activités antimicrobiennes vis-à-vis de nombreuses bactéries résistantes aux antibiotiques [55].

III.3.1- L'aromatogramme

L'aromatogramme est basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelé antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques. cette méthode a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des antibiotiques testés, de s'appliquer à un grand nombre d'espèces bactériennes, et d'avoir été largement évaluée par 50 ans d'utilisation mondiale, il s'agit d'une méthode en milieu gélosé à l'agar 1 réalisée dans une boîte de pétri. Le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque de papier sur lequel on dispose une quantité d'extrait (figure 13) [56].

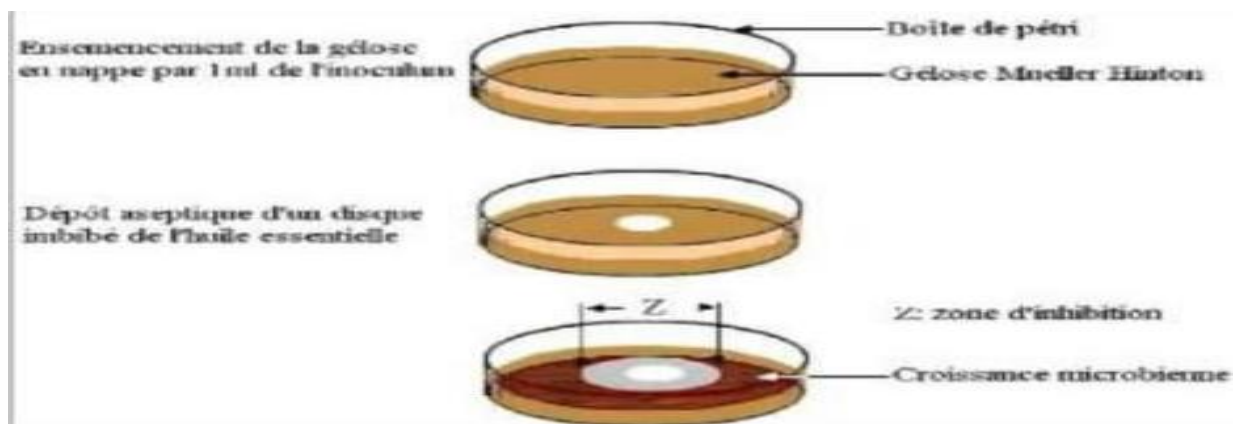


Figure 13 : Schéma illustrant la méthode des aromatochromes.

III.3.2- Microatmosphères

La technique consiste à disposer le disque imbibé d'une quantité déterminée d'huile essentielle au milieu du couvercle de la boîte de Pétri. La boîte est fermée avec le couvercle en bas (ce qui empêche le disque de tomber sur la gélose) et mise à l'étuve à 37° pendant 12 à 18 heures. A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne traduit par une zone translucide sur la gélose de contour plus ou moins nette, à tendance circulaire lorsque le disque est bien centré. Les résultats se lisent avec un pied à coulisse et s'expriment par un

diamètre moyen en cm, ou mm. Le témoin réalisé pour chaque expérience est une boîte ensemencée dont le disque déposé sur le couvercle n'est pas imbibé d'huile essentielle. La boîte de contrôle est une boîte de Pétri ensemencée dans les conditions de l'expérience. Elle nous renseigne sur l'homogénéité du tapis bactérie [56].

III.4. Activité antioxydante

Plusieurs études ont montrées la forte activité antioxydant des extraits de nigelle, qui est attribuées a la présence de plusieurs acides phénoliques et flavonoïdes [57].

L'huile fixe et ses fractions (lipides neutres, glycolipides et phospholipide) ont montre une activité antioxydant vis-à-vis des deux radicaux libres stables (DPPH et le radical glavinoxyl). Cette activité antioxydant est corrélée avec la teneur en acides gras polyinsaturés, en compose insaponifiables et en phospholipides, de même que la valeur peroxyde initiale de l'huile [5]. La thymoquinone, le carvacrol, le t-anéthole et le 4-terpinéol exercent un important effet piègeur de radicaux libres [58].

III.4.1. Le stress oxydant et les pathologies

Le stress oxydant est résultant lorsque se trouve un excès de radicaux libres qui peut s'accumuler, en raison de différentes situations environnementales et pathologiques ainsi que certaines habitudes de vie [59]. Mais généralement, la conséquence majeure des radicaux libres est le dommage qu'ils causent aux bases des acides nucléiques, aux lipides et aux protéines, lequel peut fortement compromettre la santé et la viabilité d'une cellule ou induire une variété de réponses cellulaires par la génération d'espèces ré actives secondaires et ultimement, mener à la mort cellulaire par nécrose ou par apoptose [60].

Une production importante de ROS joue un rôle dans la pathogénèse de nombreuses maladies comme par exemple d'Alzheimer, l'épilepsie, l'ischémie cérébrale, la commotion cérébrale, la maladie de Parkinson, la sclérose amyotrophique latérale et dans le processus de vieillissement du cerveau en soit (*figure 35*) [59][61].

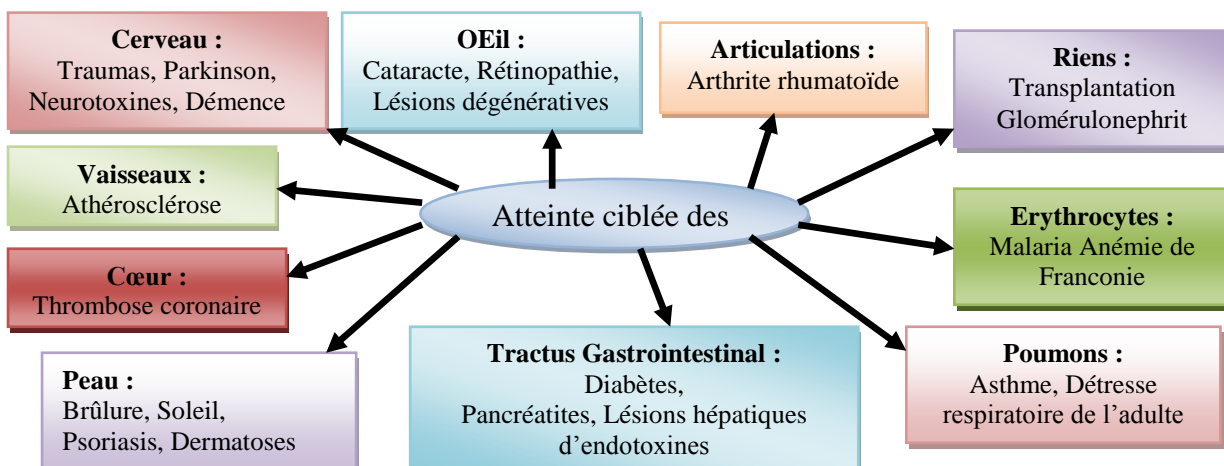


Figure 14 : Les effets du stress oxydant.

III.5. Propriétés gastro-protectrices

L'huile de nigelle réduit la formation d'ulcères gastriques induits par l'éthanol chez le rat [62].

III.6. 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 [63].

III.7. Propriétés hépatoprotectrices

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 [62].

III.8. 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 [62].

III.9. Propriétés anthelminthiques

Les graines et la fraction hétérosidique sont de très puissants anti-cestodes, contrairement aux saponosides qui sont inactifs [64][65]. 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 [66].

III.10. Propriétés immunostimulantes (la réponse immunitaire)

Il a été démontré que l'administration de *N. sativa* stimule la réponse lymphocytaire et la production des interleukine-3, tout en augmentant 30% l'activité des cellules [5].

Elle favorise aussi la libération des interleukines-1 β , cela entraîne une stimulation de l'activité phagocytaire des leucocytes polynucléaires et macrophages [67].

L'attention du monde entier s'est tournée vers l'éclosion de la maladie à coronavirus (COVID-19) qui a été signalée pour la première fois à Wuhan, en Chine, le 31 décembre 2019. L'effet de l'extrait de *N. sativa* sur la réplication du coronavirus et sur l'expression du gène TRP durant l'infection par le CoV a été évalué par Ulasien 2014. L'extrait de *N. sativa* a montré une charge virale d'impact et une expression du gène TRP après l'infection par le Covid après [68].

La charge virale a diminué quand des extraits de *Nigella sativa* ont été ajoutés aux cellules infectées par le Covid chez une souris avec une augmentation de la sécrétion d'IL-8 [69].

Le traitement des cellules avec des extraits de *Ns* avant l'infection par le Covid diminue la réplication du virus [69].

III.11. Propriétés antitumorales

La thymoquinone potentialise les fonctions détoxifiantes du foie, de ce fait elle augmente le taux de glutathion et réduit les tumeurs [70].

De plus, avec la dithymoquinone et des extraits éthanoliques de 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 [71].



Figure 15 : Propriétés anticancéreuse de *Nigella sativa*.

IV. La toxicité de *Nigella Sativa*

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.

Zaoui et collaborateurs ont rapporté que les huiles fixes présentent un 53DL₅₀ de 28,8 mL/kg (po) et 2,06 ml/kg (ip). Dans le même sens, la toxicité chronique de 2 ml/kg des huiles durant 12 semaines présente des valeurs normales pour les ALAT, les GGT et l'aspartate aminotransférase (ASAT). La plupart de ces études montrent clairement que la nigelle possède un index thérapeutique élevé et une excellente innocuité à des doses inférieures à 4 g/kg/jour de *N. sativa* [67].

De plus, le surdosage thérapeutique en graines de *Nigella sativa* peut provoquer des avortements. Cette toxicité est due essentiellement à la présence de forte dose de saponines (deviens très irritants) et d'alcaloïdes (deviens toxiques) dans les graines de Nigelle [56].

V. Produits à base de Nigelle à travers le monde

Sur internet, on retrouve de nombreux produits à base d'huile de Nigelle, les graines quant à elles sont trouvées dans de nombreuses épiceries.

Tableau 05 : Différents produits à base d'huile de Nigelle.

<p>L'huile végétale de <i>Nigella sativa</i> pour un usage oral (aide à renforcer les défenses naturelles de l'organisme et à favoriser la digestion) ou un usage cosmétique (peaux, cheveux),</p>	
<p>Thé noir à la Nigelle</p>	
<p>Café crème à base de nigelle</p>	
<p>Capsules à l'huile de Nigelle pour renforcer le système immunitaire. L'utilisation des capsules d'huile de Nigelle permet de suivre un traitement à la Nigelle de façon très simple.</p>	
<p>Gélules de poudre de <i>Nigella sativa</i> dont la poudre est obtenue par cryobroyage, utilisées pour renforcer les défenses immunitaires de l'organisme.</p>	
<p>Poudre de Nigelle pure, souvent mélangée avec du miel ou dans les plats en alternative au poivre.</p>	
<p>les graines de Nigelle rentrent dans la composition d'un mélange d'épices Ras el hanout très populaire pour parfumer les plats de viandes. (Panchphoron = cinq épices : Nigelle, Cumin, Fenugrec, Moutarde noire et Fenouil, en quantités égales).</p>	



Nigelle

Partie
Expérimentale

« L'expérimentateur qui ne sait pas ce qu'il cherche
ne comprend pas ce qu'il trouve. »

Claude Bernard, De la physiologie générale (XIX^{ème} siècle)



Chapitre II

Matériels et méthodes

II.1. OBJECTIFS

L'objectif général était de rechercher les propriétés anti-inflammatoire et antioxydante, ainsi que les propriétés antimicrobiennes et anti fongiques des deux l'huiles fixe et essentielle (hydrolat) de *Nigella sativa L.*

Pour atteindre cet objectif général, nous avons fixé les objectifs spécifiques suivants :

- réaliser l'**expression à froid** pour l'extraction des huiles fixe des *graines de nigella sativa L.*
- réaliser un hydrolat par **Clevenger**.
- mesurer le pouvoir anti-inflammatoire de l'hydrolat de *nigella sativa L.*
- évaluer l'activité antioxydante de l'huile de *nigella sativa L.*
- déterminer l'activité antibactérienne et antifongique de l'huile de *nigella sativa L.*

II.2. Matériels et méthodes

La partie expérimentale de notre étude a été réalisée au sein du laboratoire de microbiologie du centre de recherche et développement CRD de SAIDAL à Alger. Elle s'est déroulée entre juin et juillet 2021.

L'objectif de notre travail expérimental est l'évaluation in vitro des activités anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antifongiques, et antioxydantes des deux huiles, fixe et essentielle (hydrolat), des graines de *Nigella sativa L.* de provenance syrienne acheté chez un herboriste dans un sachet de plastique normale fermée.

Tableau 06 : Présentation de l'espèce de nigelle (*Nigella Sativa L*) étudiée.

	<i>Nigella sativa</i>
Présentation	
Nom français	Cumin noir
Nom arabe	Sinouj
Famille	Renonculacée
Partie utilisée	Graine
Taille	2 à 3.5mm
Couleur	Noire
Aspect	Granuleuse et réticulée
Odeur	Très forte
Gout	Piquant
Lieux d'achat	Un herboriste
Prix /kg	1000DA
Provenance	La Syrie

II.2.1. La méthode adoptée

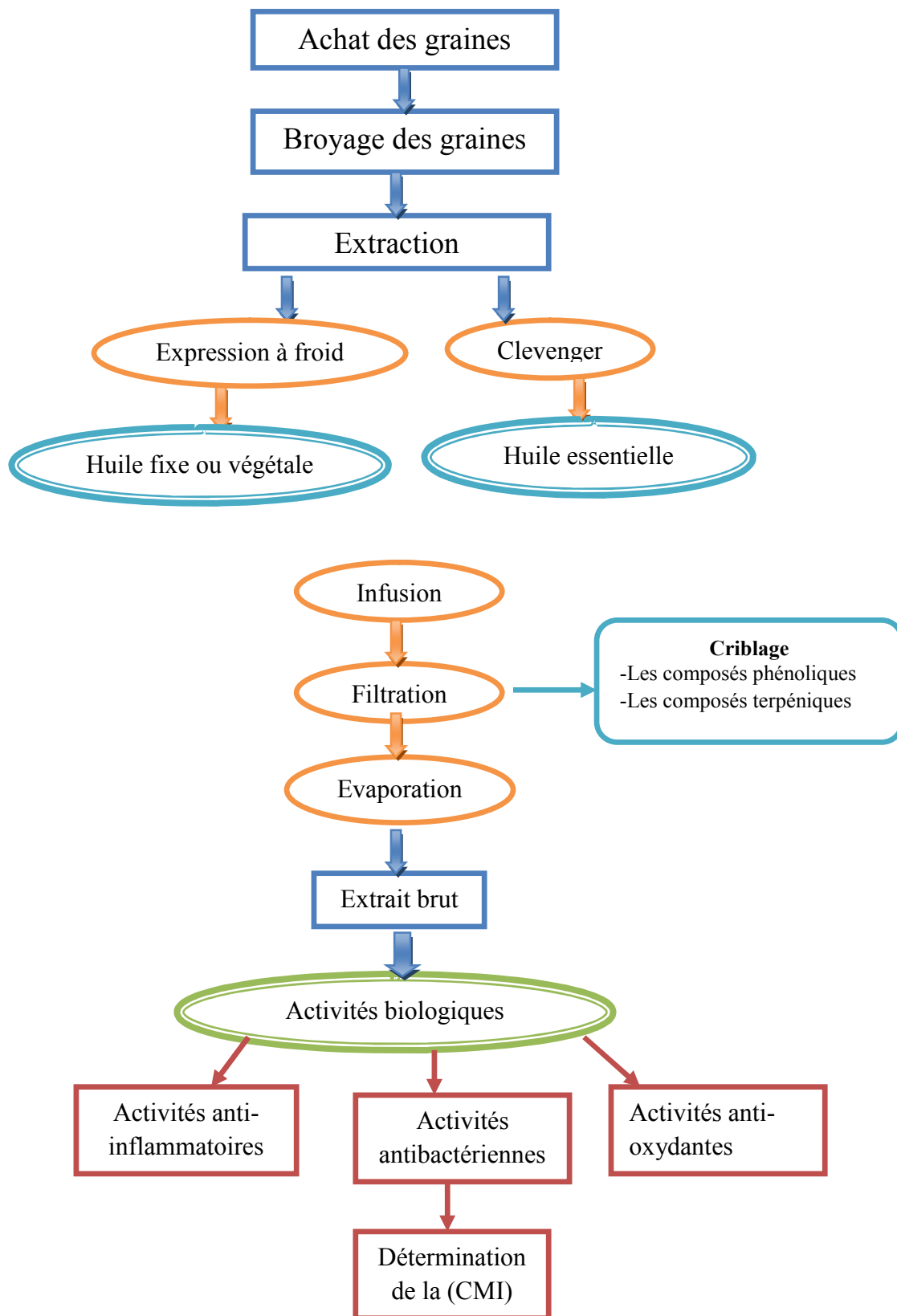


Figure 16: Schéma récapitulatif des protocoles expérimentaux. CMI (concentration minimale inhibitrice).

II.2.2.Extraction des huiles

a. l'huile fixe :

L'huile fixe des graines de **Nigelle** (*Nigella Sativa*) est obtenue par pression à froid à l'aide d'une presse à vis sans fin représenté dans la (figure 16), au sein de la ferme pédagogique Kheloufi 1 à zéralda. L'huile obtenue est ensuite centrifugée pour faire précipiter les impuretés et récupérer l'huile pure.



Figure 17 : Appareil d'expression à froid de l'huile de Nigelle.

b. l'huile essentielle :

L'extraction est faite par technique d'hydro-distillation simple en utilisant un appareil de Clevenger (Clevenger, 1928) du laboratoire de substances naturelles du CRD/SAIDAL. 400 g de graines de nigelle broyées sont mis dans un ballon de deux litres et rempli au 2/3 avec de l'eau distillée. Le ballon porté à ébullition par le chauffe ballon, produit une vapeur d'eau remplie d'essences dans la partie A, qui se condense après passage sur la surface froide du réfrigérant (partie B).

L'hydro-distillation dure 3 à 4h jusqu'à épuisement total de la matière végétale. Le condensat est alors est récupéré dans la partie C et recueilli dans une ampoule à décanter sous forme de deux phases ou l'huile essentielle se sépare de la phase aqueuse grâce a leurs différences de densité.

On décante la phase aqueuse inférieur et on recueille la phase constituée de l'huile essentielle dans un flacon en verre ombré et mise en contact avec le sulfate de sodium anhydre (Na₂SO₄) pour éliminer toute trace d'eau et conservée à +4°C à l'abri de la lumière.

L'eau en excès retourne dans le ballon par la partie D qu'un robinet a 3 voies (f) fait communiquer avec la partie C.

Peser le produit obtenu afin de pouvoir déterminer ultérieurement le rendement.

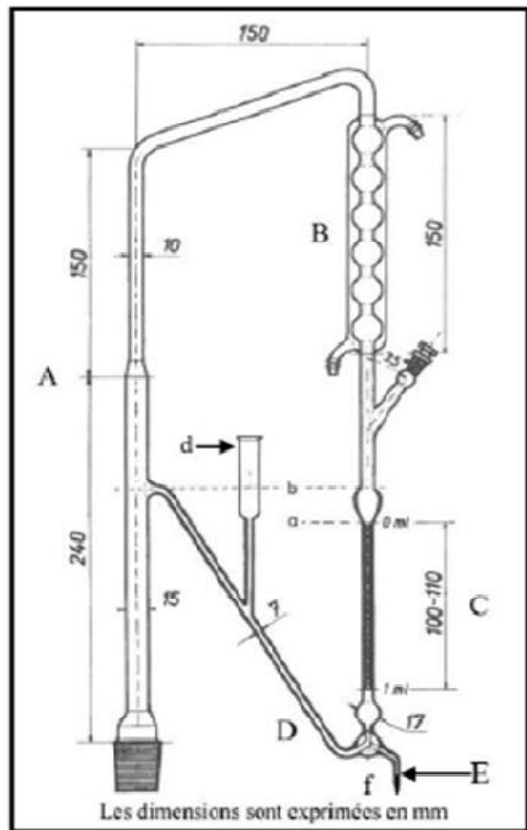


Figure 18 : Montage d'extraction par le Clevenger (hydrodistillateur standardisé) et de l'ampoule à décanter.

c. L'hydrolat (l'huile essentielle) de graine de nigella sativa L.

L'eau d'évaporation condensée durant la distillation de l'huile essentielle constitue l'hydrolat. Cet hydrolat, contient les mêmes composés volatils présents dans l'huile essentielle mais en quantité moindre, en plus les composés hydrosolubles.

→ Comment choisir une bonne huile de nigelle ?

Voici les 11 critères d'une bonne huile de nigelle :

- 1 – 100% pure
- 2 – Fraîchement pressée avec date de pression récente
- 3 – Non filtrée
- 4 – Pressée à froid
- 5 – Graines de qualité
- 6 – Pressée mécaniquement
- 7 – Presse à moteur électrique
- 8 – Humidité de l'huilerie contrôlée
- 9 – Bouteille en verre
- 10 – Bouteille anti-uv
- 11 – Traçabilité

d. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction est calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = \left(\frac{M_{\text{ext}}}{M_{\text{éch}}} \right) * 100$$

Où: **R** : est le rendement en %.

M ext : est la masse de l'extrait après évaporation du solvant en mg.

M éch : est la masse sèche de l'échantillon végétal en mg.

II.2.3. 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 irridoïdes, les tannins galliques les tannins cathéchiques, les alcaloïdes, les flavonoïdes, les sénosides, les quinones, les coumarines et les mucilages. Le tableau 07 montre la méthode appliquée à la recherche de chacun de ces métabolites secondaires.

La particularité de l'huile de *Nigella sativa* est la présence des quinones : thymoquinone et thymohydroquinone ; et d'un composé phénolique : thymol. Ces quinones sont les composés actifs de l'huile de Nigelle qui lui confèrent d'importantes propriétés pharmacologiques.

Tableau 07 : Screening phytochimique [72].

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-amylque.	Coloration rouge orangé
Sénosides	2,5 g de poudre + 50 ml d'eau distillée + 2 ml d'acide chlorhydrique concentré. Chauffer Pendant 15 min+40 ml d'éther. La couche étherée est séparée, séchée avec le sulfate de sodium anhydre,	Coloration violette rouge

	évaporée+ 5 ml d'ammoniaque diluée (1/2) au résidu refroidi	
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 (mousse)	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 tri terpènes	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.3. Evaluation de l'activité pharmacologique

II.3.1. Etude de l'activité anti-inflammatoire (in vitro)

II.3.1.1. Matériel animal

Dans le cadre de cette étude, 15 souris de sexe mâle et femelle ont servi d'animaux d'expérience. Les animaux ont été repartis en 3 lots de 5 animaux

L'étude a porté sur des souris de race *Swiss albinos* de souche *NMRI* (Naval Medical Research Institute) dont le poids moyen de 24 grammes, ils sont gardés à une température ambiante variant entre 25 à 30°C avec 10 heures d'éclairage par jour et 70% d'hygrométrie. Elle sont nourris avec des granulés composé de 49% de glucide, 23.3% de protéine et 5.7% de complexe minérale vitaminé et l'eau du robinet. Les animaux ont été mis à jeun douze heures

avant l'expérimentation tout en ayant un libre accès à l'eau. Les souris proviennent de l'animalerie qui a été élevés au niveau du laboratoire pharmacotoxicologie, unité animale du complexe Biotic et Antibiotical SADAIL d'Alger.



Figure 19 : Souris albinos

II.3.1.2. Produits

A. Anesthésiants

- Prozil fort 100 ml en intra-péritonéale (IP).

B. Produit de référence : diclofénac 75mg.

Le DICLOFENAC est un anti-inflammatoires appartient à la famille des médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) tels que l'aspirine ou l'ibuprofène par exemple. Ces médicaments diminuent l'inflammation, la douleur et la fièvre ; utilisés dans des études expérimentales et cliniques.



Figure 20 : Produits anesthésiants : anesthésie 1 % générale.



Figure 21 : Produits de référence diclofénac 75mg.

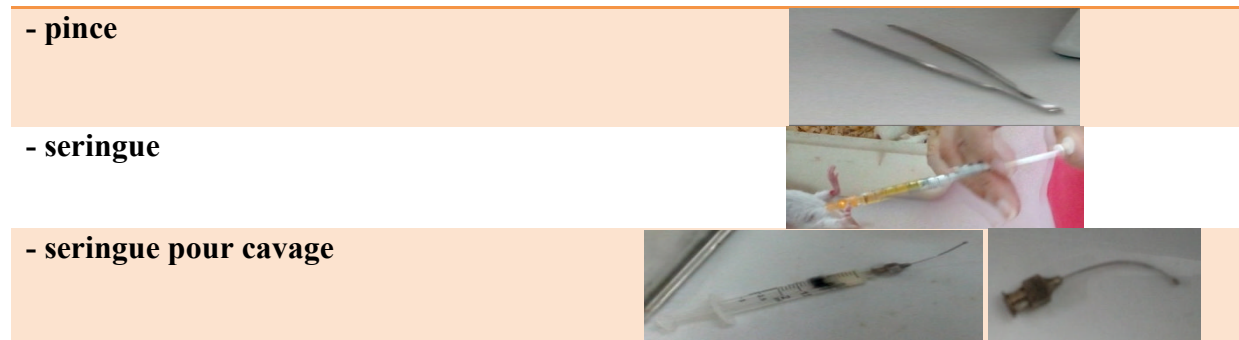
C. Réactifs utilisés

- Carragénine (SIGMA-ALDRICH®)
- Tween 80

II.3.1.3. Matériel de laboratoire

Tableau 08 : Le matériel de laboratoire utilisé pour l'activité anti-inflammatoire.

Matériel de laboratoire	Figure
- cage de contention pour souris ;	
- balance	



II.3.1.4. Méthodologie (protocole expérimentale)

✓ 1^{ère} partie :

A. Répartition des lots (Constitution des lots)

La veille de l'expérimentation, les souris ont été pesées et identifiées au niveau de la queue avec un feutre indélébile puis mises ensuite dans des cages étiquetées et individuelles.

Les animaux ont été répartis en cinq lots, comme suit :

- Lot Témoin (T) : reçoit 0.5 ml/souris d'eau distillée ;
- Lot Référence (Réf) : reçoit 0.5 ml/souris de produit de référence de Diclofenac de sodium (anti-inflammatoire) 75mg;
- Lot Essais (E1 ; E2 ; E3) : chaque lot étant composé de cinq (5) souris de (19→20g) et chaque souris reçoit 0.5 ml du l'hydrolat de graine de nigelle.

Tous les animaux ont été mis à jeun durant 12 heures.

→**Remarque** : On ne doit pas priver de nourriture les rongeurs de laboratoire et les lapins avant une anesthésie générale. Si l'expérience l'exige cependant, la durée du jeûne doit alors être aussi courte que possible.



Figure 22: Pesées et identification de toutes les souris des lots.

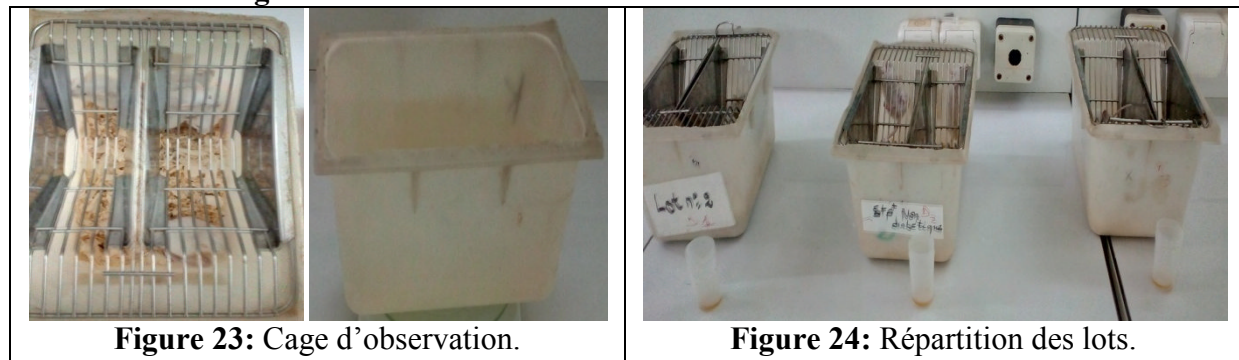


Figure 23: Cage d'observation.

Figure 24: Répartition des lots.

✓ 2^{ème} partie :

Le jour de l'expérimentation, préparer les solutions à administrer

B. Préparation des dilutions d'huile fixe

La dilution de la solution mère au dixième (1/10) par la méthode de la double dilution en progression géométrique a permis d'obtenir 3 solutions filles (Eau distillé + HF + Tween 80 (pour permettre à l'huile de nigelle de se disperser dans l'eau distillée c.à.d. homogénéisé et rend miscible notre solution) à 26.52, à 23 et 20 mg/ml de notre huile végétale, constituant ainsi la gamme de concentrations.

C. Préparation de la solution de carragénine

Pour la préparation, nous mettons 25 ml d'eau distillée dans un petit bécher, nous lui ajoutons progressivement de la carragénine (0.2g), puis nous ajustons le volume à 50 ml avec de l'eau distillée. (Plus quelques gouttes de Tween 80 pour permettre à la poudre de carragénine de se disperser dans l'eau distillée).

Mode opératoire

La mise en œuvre du test a consisté à :

- ✓ Préparer une solution à 1% de carragénine dans de l'eau distillée.
- ✓ Administrer les différentes substances par gavage à raison de 0.5 ml pour

20 g de poids corporel aux souris de tous les lots.

→Au temps T_{30min} :

- ✓ Provoquer l'œdème en injectant à chaque souris, trente minutes après le gavage, un volume de 0.025 ml de la solution de carragénine à 1% est injecté au niveau de la patte postérieure gauche au milieu de l'aponévrose plantaire du coussinet, les animaux sont ensuite remis dans leurs cage (*figure 25 et 26*).

➔ Il est à noté que la patte arrière droite de chaque souris sert de contrôle.

→Au temps T_{4h} :

- ✓ Attendre 4 heures et faire une anesthésie aux animaux de chaque lot.
- ✓ Les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale (rupture de la nuque).
- ✓ Les pattes (gauche et droite) ont été coupées à la hauteur de l'articulation puis peser (voire la figure sur l'Annexe).

→Expression des résultats :

- ✓ Calculer les moyennes arithmétiques des poids de la patte gauche et de la patte droite pour chaque lot ;
- ✓ calculer le pourcentage (%) d'augmentation des poids de la patte d'œdème selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'œdème} = \left[\frac{\text{MPG} - \text{MPD}}{\text{MPD}} \right] * 100$$

MP_G : moyenne des poids de la patte gauche.

MP_D : moyenne des poids de la patte droite.

- ✓ calculer le pourcentage (%) d'inhibition (de réduction) de l'œdème chez les souris traitées par rapport aux témoins selon la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = \left[\frac{\% \text{ d'œdème témoin} - \% \text{ d'œdème Essai}}{\% \text{ d'œdème témoin}} \right] * 100$$



Figure 25: Injection intra plantaire dans la patte gauche du la souris.



Figure 26: Oedème de la patte postérieure gauche de la souris.



Figure 27: Souris recevant notre solution par gavage.



Figure 28 : Injection intra péritonéale de l'Anesthésie. **Figure 29 :** Animal anesthésié.

II.3.2. Etude de l'activité antibactérienne et antifongique (in vitro)

II.3.2. 1. But et principe :

Le but repose sur l'évaluation du pouvoir antibactérien de l'extrait brut et huile fixe de *Nigella sativa L.* qui se fait en deux étapes, une étude qualitative pour la mise en évidence d'une zone d'inhibition sensible et une étude quantitative pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactériostatique (CMB).

Le principe repose sur le pouvoir migratoire du microorganisme testé et consiste à déterminer la zone d'inhibition et de la croissance de ces derniers, en contact de l'huile fixe et de l'hydrolat de graines de nigelle par la méthode de diffusion en milieu solide (MH) ou aromatoگرامme en utilisant des disques d'antibiotiques absorbants de 9 mm de diamètre imprégnés de l'extrait à étudier vis-à-vis d'un germe test préalablement ensemencé. Après un certain temps de contact, il se produit une zone d'inhibition dont la mesure du diamètre de cette zone permet d'estimer le degré de sensibilité de cette souche vis-à-vis du microorganisme testé.

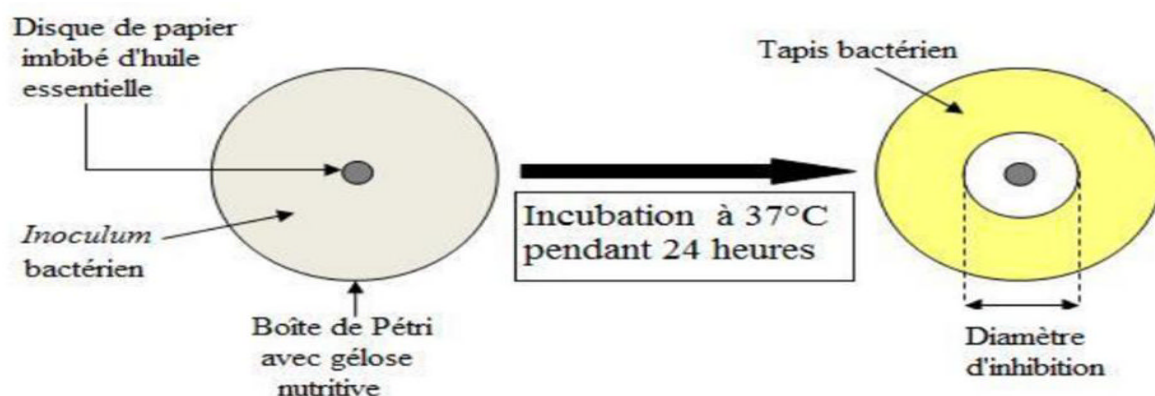


Figure 30 : Principe de la méthode de diffusion sur disque [73].

Définition : Un antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une bactérie vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques.

II.3.2.2. Choix des souches bactériennes et fongiques

a) Obtention de souches pures isolées :

Afin de rechercher l'activité antibactérienne et antifongique de nos extraits (l'huile fixe et de l'hydrolat) de *Nigella sativa L.* nous avons utilisé quatre (04) souches bactériennes et deux (02) 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/SADAIL, Alger, dont les références sont inscrites sur le (**Tableaux 09 et 10**)

Tableau 09 : Les microorganismes choisis pour l'activité antibactérienne.

Souches	Nature	Paroi	Forme	Collection ATCC*	Type
Escherichia. Coli (<i>E. Coli</i>)	Gram-	Simple	Bacilles	8739	Pathogène
Pseudomonas aeruginosa	Gram-	Simple	Bacilles	9027	Pathogène
Bacillus subtilis	Gram+	Double	Bacilles	6633	Pathogène
Staphylococcus aureus	Gram+	Double	Cocci	6538	Pathogène

Tableau 10 : Les champignons choisis pour l'activité antifongique.

souches fongiques	Collection ATCC*	Forme	La famille	Type
Candida albicans	24433	Levure pseudohyphe	saccharomycetaceae	Pathogène
Saccharomyces cerevisiae	2601	Levure unicellulaire	saccharomycètes	Pathogène

ATCC*: American Type Collection Culture.

→Préparation et Choix des milieux de culture

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*

Des cultures jeunes sont préparées en dissolvant des pastilles de souches de référence ATCC dans 5 ml de tryptocase soja bouillon (TSB) et incubées pendant 18h à 37°C pour les bactéries et pendant 48h à 25°C pour les champignons, un cercle d'activité (zone d'inhibition) de chaque disque est observé dans le milieu qui entoure ce disque. Suivant l'efficacité de la substance sur le germe en question, une surface plus ou moins étendue peut être vue, où les colonies microbiennes ont disparu. Il peut être choisi avec quasi-certitude le traitement le plus efficace, c'est la phase de revivification et d'enrichissement.

A partir de ces souches revivifiées en milieu BHIB, on ensemence deux boîtes de pétri par 1 ml de chacune des souches revivifiées. Une boîte de pétri sera utilisée pour la préparation des tubes de conservation constituant ainsi notre souchothèque de laboratoire, l'autre boîte pour préparer notre inoculum. Selon les méthodes et les souches utilisées nous avons choisi les milieux de cultures suivants [74]:

- Gélose Muller –Hinton pour les bactéries.
- Gélose Nutritive pour les bactéries.
- Gélose Saburraux Base pour les moisissures.

La composition et les caractéristiques des milieux de culture sont rappelées en Annexe.

II.3.2.3. Protocole expérimental

Nous avons coulé aseptiquement sous la haute le milieu de culture gélosé nutritif dans les boîtes de pétri de 90 mm de diamètre (20ml) par boîte.

Après solidification du milieu de culture, nous avons étalé 1ml de chaque suspension microbienne à la surface du milieu gélosé à l'aide d'une pipette pasteur stérile.



Figure 31 : La haute ou la paillasse de travail.

a. Purification des souches :

Les différentes souches bactériennes ont été repiquées sur milieu gélose nutritif par la méthode de stries, puis incubées à 37°C pendant 24h afin d'obtenir des colonies isolées et pures et pouvant servir l'inoculum.

b. Préparation de l'inoculum :

A partir des cultures bactériennes jeunes, des colonies isolées à l'état pur ont été prélevées. Chaque colonie est mise en suspension dans 2.5 ml d'eau distillée stérile.

Ensuite, les solutions ont été homogénéisées à l'aide d'une agitation manuelle.

A. Pour les bactéries :

- A partir d'une culture jeune de 18h, réaliser des suspensions en prélevant 3 à 5 colonies bien isolées et identiques, et les mettre dans 05 ml d'eau physiologiques stériles
- Agiter au vortex pendant quelques secondes
- Réaliser une lecture de la transmittance avec le spectrophotomètre à une longueur d'onde de 620nm et qui doit être entre (22%-32%), ce qui correspond à une concentration de 10^7 - 10^8 germes /ml.

B. Pour les levures (moisissures) :

- A partir d'une culture jeune de 48h, réaliser des suspensions en prélevant des colonies bien isolées et identiques, et les mettre dans 05 ml de sérum physiologiques stériles
- Agiter au vortex pendant quelques secondes

- Réaliser une lecture de la transmittance avec le spectrophotomètre à une longueur d'onde de 620 nm et qui doit être entre (2%-3%) ce qui correspond à une concentration de 10^7 - 10^8 germes /ml.

NB : Si la valeur obtenue de la première lecture pour les bactéries et les levures n'est pas comprises dans les intervalles voulus, les concentrations doivent être ajustées en ajoutant soit l'eau physiologique ou les colonies, et l'inoculum doit être utilisé dans les 15 minutes qui suivent sa préparation.

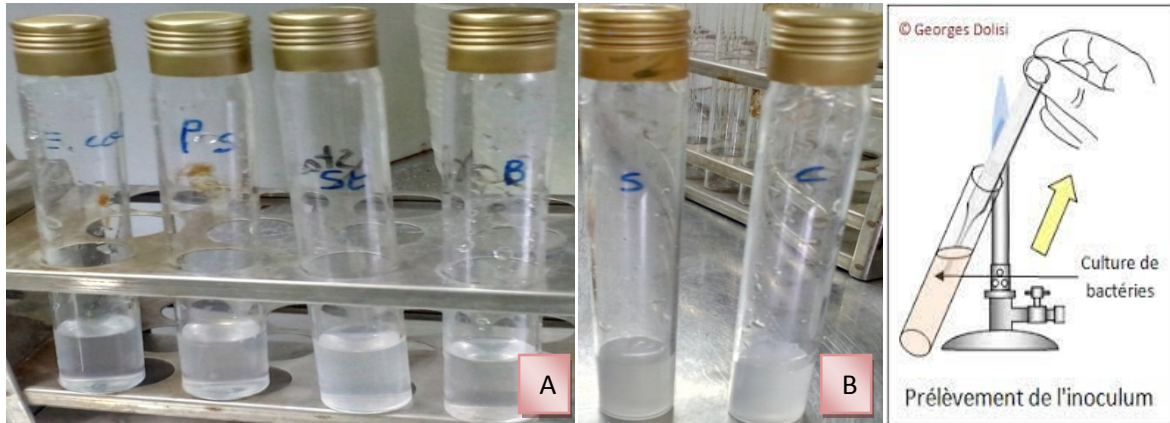


Figure 32 : Les différentes suspensions préparées. A : bactéries; B : champignons

c. L'ensemencement par inondation

1 ml de l'inoculum bactérien ou de la levure est déposé, puis étalé sur le milieu Muller-Hinton ou Sabouraud respectivement. Après avoir trempé l'écouvillon stérile dans la suspension bactérienne en le pressant fortement sur la paroi interne du tube (en le tournant) afin de le déchargée au maximum, l'écouvillon est étalé sur la totalité de la surface gélosée séchée, de haut en bas en stries serrées. L'opération est répétée trois fois en tournant la boîte 60° à chaque fois $^\circ$, et en pivotant l'écouvillon sur lui-même sans oublier de faire pivoter l'écouvillonnage sur la périphérie de la gélose. On aspire l'excès du liquide puis on laisse bien sécher la boîte pendant 15 mn à 35°C .

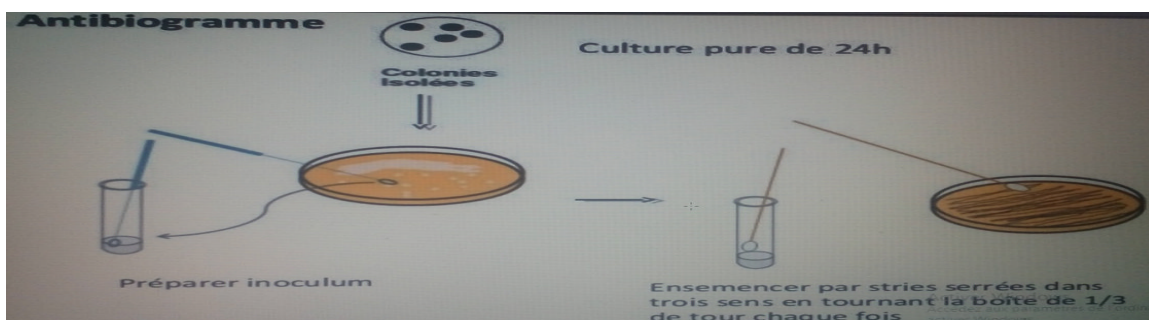
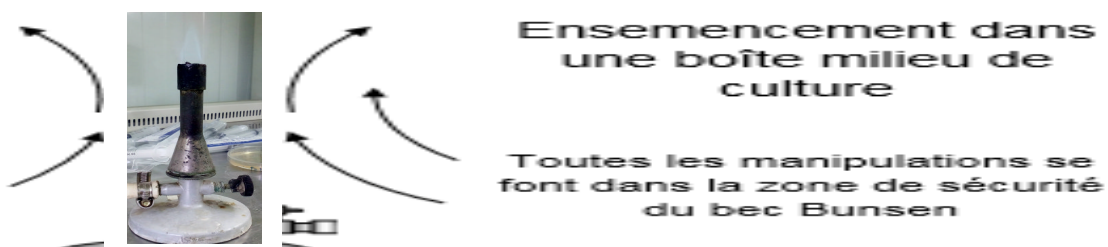


Figure 33 : Préparation de l'inoculum et l'ensemencement.



→Examen de l'échantillon :**✓ Préparation de la 1^{ère} couche du milieu :**

- Faire fondre le milieu gélosé Muller-Hinton et le Sabouraud dans un bain-marie à 95°C.
- Verser aseptiquement une 1^{ère} couche dans les boites de Pétri à raison de 15ml par boite avec 03 répétitions par souches.
- Laisser refroidir et solidifier sur la paillasse

✓ Préparation de la 2^{ème} couche du milieu :

- Faire fondre le milieu gélosé Mueller-Hinton et le sabouraud dans un bain-marie à 95°C.
- Baisser la température jusqu'à 45°C.
- Remplir des flacons en verres stériles avec 50 ml de Muller –Hinton pour les bactéries, et avec 50ml de Sabouraud pour les levures pour chacun des souches.
- Ensemencer les milieux de culture avec 200 µl de chaque suspension.
- Agiter manuellement les flacons.
- Transvaser rapidement 4ml de chaque milieu inoculé en 2^{ème} couche sur la surface des boites contenant déjà la 1^{ère} couche de gélose.
- Étaler rapidement en faisant pivoter la boite sur elle même pour avoir une surface uniforme.
- Laisser solidifier sur la paillasse.

d. Application (dépôt) des disques imprégnés d'HE et incubation:

Nous avons prélevé des disques antibiotiques stériles à 120°C pendant 20 min dans un autoclavage de papier Wattman №4 avec un diamètre de 9mm par l'emporte-pièce, imbibés par capillarité avec l'hydrolat et l'huile fixe de nigelle à étudier, en mettant seulement en contact avec le bout du disque. Celui-ci va absorber progressivement jusqu'à imprégnation totale du disque. Puis, ce dernier est déposé à l'aide d'une pince stérile à la surface du milieu Muller-Hinton ou gélose Sabouraud sur la boite de pétri préalablement ensemencé par le germe test, de telle manière que les zones d'inhibition ne se chevauchent pas.

On dépose dans chaque boite des disques stériles imprégnés par l'extrait brut et l'huile fixe de *Nigella sativa*.

Nous avons laissé diffuser sur la paillasse à température ambiante pendant 30 min, puis, la lecture s'effectue après 24h d'incubation à 37°C pour les bactéries et 48h à 25°C pour les champignons par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition du germe-cible.

Deux témoins positifs contenant chacun un antibactérien de référence la gentamycine et un antifongique de référence le fluconazole et un témoin négatif constitué d'un disque d'antibiotique stérile imprégné de méthanol.

Autrement dit, une fois les géloses nutritives ensemencées, les disques sont imbibés dans chaque extrait (*Nigella sativa*) puis disposés sur la surface de la gélose (disques/boite) à l'aide d'une pince stérilisée au bec bunsen.

Remarque : Cette évaluation pourrait être utilisé pour des préparations finales à partir des huiles essentielles et extraits naturelles de plantes, mais en utilisant les solvants adéquats afin d'obtenir des solutions permettant une bonne diffusion sur la gélose

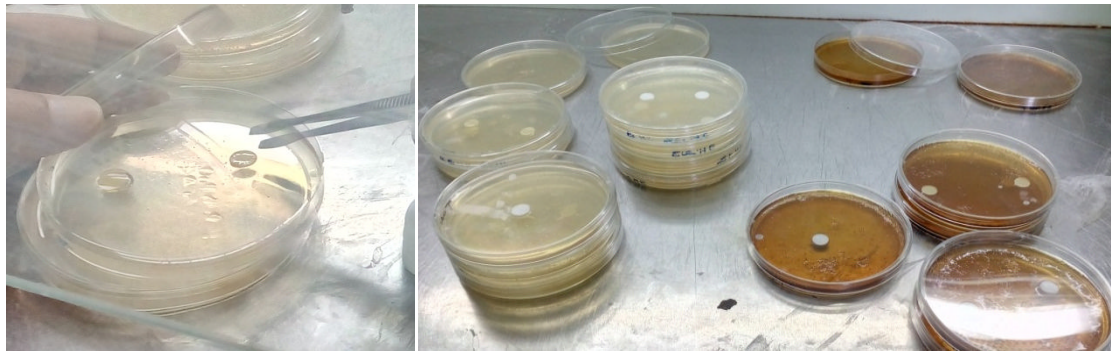


Figure 34 : Dépôt des disques dans des boîtes pétri.

→Résumé de diffusion sur le milieu gélosé

En premier lieu, les deux milieux ont été fondus au bain marie à 95°C puis refroidis à l'air libre jusqu'à 45°C. Ensuite les Géloses M-H et SAB sont versées dans des boîtes pétries de diamètre de 90 mm à raison de 15 ml par boîte. Après avoir fermé les boites de pétri, on laisse les géloses séchées avant l'emploi [75].

Un écouvillon stérile est utilisé pour l'ensemencement en prenant soin de suivre toutes les étapes nécessaires et adéquates à la mise en place des différentes souches microbiennes [75]. A l'aide d'une pince stérile, on prélève des disques en papier buvard de 9 mm de diamètre qu'on imbibe d'HF et d'EB et que l'on dépose sur les boites de pétries déjà ensemencées.

Après 20 mn, on incube les boites à l'étuve réglée à 25°C pendant 48h pour les champignons et à 37°C pendant 24h pour les bactéries.

La lecture se fait par mesure du diamètre de la zone d'inhibition (du halo) autour des disques à l'aide d'un pied à coulisse.



Figure 35 : Micromètre (pied à coulisse).

II.3.2.4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices CMI des extraits analysés (Etude quantitative):

La CMI permet de définir la sensibilité ou la résistance des souches microbiennes.

Nous avons déterminé la CMI réalisés sur milieu solide (MH) [76] uniquement pour l'HF de *Nigella sativa L.* qui a présenté une activité antimicrobienne importante vis-à-vis des souches utilisés, afin de préciser le caractère bactériostatique ou bactéricide de cette l'huile.

II.3.2.4.1. Préparation des dilutions d'HE dans le milieu de culture

- ✓ Préparer une suspension de 10^4 UFC/ml des bactéries et de la levure à étudier
- ✓ Préparer le M-H (Muller-Hinton) avec 0.5% de Tween 80 (c'est une polysorbate, hydrophile qui oriente les émulsions dans le sens "huile dans l'eau", autrement dit, qui disperse la phase huileuse dans la phase aqueuse de manière à obtenir une émulsion du type H/E) et ce après stérilisation du milieu à 120 °C pendant 15 mn.
- ✓ Une quantité de 2 g d'extrait est mélangé à 100 ml du milieu Muller-Hinton (MH liquéfié).
- ✓ Préparer deux séries de dilutions de l'huile essentielle à étudier allant de 2% jusqu'à 0.03% dans les milieux précités, ont permis de préparer une gamme de dilutions successives de raison $\frac{1}{2}$ (1/2, 1/4, 1/16, et 1/8).

→ La réalisation des dilutions successives se fait comme suit :

- ✓ 1ml d'huile essentielle est dilué dans 50ml de milieu dans un premier flacon ce qui donne la dilution à 2%.
- ✓ Verser la moitié du premier flacon dans un deuxième et ajuster à 50 ml pour obtenir la dilution à 1%.
- ✓ Procéder de la même manière jusqu'à l'obtention de la dernière dilution de 0.03%.
- ✓ Ensuite, verser 15 ml de chaque dilution dans 02 boîtes de Pétri du milieu Muller-Hinton pour les bactéries ou Sabouraud pour les champignons (Gélose en surfusion) et laisser solidifier.
- ✓ Chacune de ces boîtes contenant la dilution en question est divisée en six parties correspondantes à six germes testés.
- ✓ Un inoculum de 10^4 UF/ml de chaque germe est ensemencé dans une partie précise à l'aide d'une micro seringue stérile par spot de 1 à 2 μ l des inoculas ainsi préparés.
- ✓ Préparer des boîtes témoins (positifs) contenant le milieu MH avec Tween sans l'huile essentielle
- ✓ Laisser environ 20 minutes sur paillasse pour une prédifusion de l'extrait
- ✓ Incuber les boîtes de Pétri à 37°C pendant 24 à 48h.

II.3.2.4.2. Lecture :

La CMI de chaque souche est déterminée après incubations à 37°C pour les bactéries pendant 24h et à 30°C pour la levure pendant 48h; la CMI est la plus faible concentration de l'extrait (d'huile essentielle) inhibant toute croissance bactérienne ou levurienne (moisissures) visible à l'œil nu. {Gram- / Gram+} → Lire la CMI pour laquelle il n'y a pas de culture visible.

NB : La présence d'une colonie ou deux n'est pas prise en considération.

II.3.3. Etude de l'activité antioxydante (in vitro)

II.3.3.1. Effet scavenger du radical DPPH

Dans notre étude sur la plante *Nigella Sativa L*, nous avons utilisé le test colorimétrique qui utilise le radical DPPH (2,2 diphényl-1-picryl-hydrazyl) de couleur violacée qui absorbe à 516 nm, qui mesure l'effet (piégeur) d'un antioxydant à inhiber le radical DPPH•.

Le principe de ce test selon [77]; est basé sur 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 piégeur 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, l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des extraits présents dans le milieu (figure 36) [78].



Figure 36 : Réduction du radical DPPH par un antioxydant ou Influence de la concentration sur l'intensité de la couleur du DPPH•

II.3.3.2. Préparation de la solution du DPPH et les suspensions

Consiste à l'adhésion de 2,4 mg de DPPH dans 100 ml d'éthanol → solution DPPH
50 microlitres d'Extrait aqueux de *Nigella sativa L*. à différentes concentrations sont ajoutés à 1950 µL de la solution éthanolique du DPPH (2%), puis on va mettre ce mélange à l'obscurité pendant 30 min. → suspensions

En parallèle, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 50µL d'éthanol avec 1950µL de la solution éthanolique de DPPH. Egalement le même test a été réalisé dans les mêmes conditions opératoires avec un antioxydant de référence (contrôle positif) : acide ascorbique.

II.3.3.3. 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 [79]. L'activité anti-oxydante est estimée selon l'équation suivante :

$$\%d'inhibition = \frac{(Abst-AbsE)}{Abst} \times 100$$

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

Abs t : Absorbance témoin (blanc ou contrôle négatif).

Abs E : Absorbance de l'extrait (Echantillon).

II.3.3.4. Détermination de la concentration inhibitrice IC₅₀%

Ce paramètre IC₅₀ indique le pouvoir antioxydant d'un composé ou d'un extrait et qui est défini [80] comme la concentration d'antioxydant requise exprimée en mg/ml nécessaire pour diminuer le radical DPPH de 50%, il est inversement lié à la capacité anti-oxydante.

Le paramètre IC₅₀ a été calculé à partir des équations de la courbe de régression linéaire tracée du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait aqueux. Il faut rappeler que plus la valeur de IC₅₀ est petite plus l'activité antioxydante est grande.

The background of the slide features a close-up photograph of a vanilla orchid plant. On the left, a large, pale, fuzzy flower is in bloom. To the right, a woven basket is filled with dark, slender vanilla beans. The entire scene is set against a blurred green background, suggesting a lush agricultural environment.


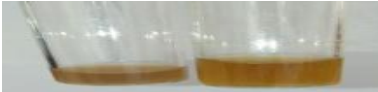
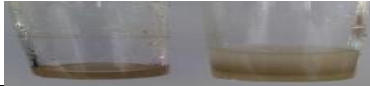







Chapitre III

Résultats et discussion

III.1. Tests phytochimiques

Les tests phytochimiques, réalisés sur les différents modes d'extractions, préparés dans différents solvants (eau, méthanol, chloroforme et éther de pétrole) des graines de *Nigella sativa* ont permis de détecter les différentes familles des métabolites secondaires présents dans l'espèce étudiée. Dans ce travail, 08 composés secondaires ont été analysés et qui sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 11 : Résultats des tests phytochimiques et les colorations obtenues par le criblage sur l'extrait de *Nigella sativa*.

N°	Métabolite testé	Réactifs	Résultats	Couleur
1	Flavonoides	Mg + HCl	+	Rose 
2	Quinones	NaOH	+	Jaune foncé 
3	Anthraquinones	KOH	-	/ 
4	Tanins	FeCl ₃	+++	Brun Verdâtre 
		Gélatine	+	Précipité 
5	Anthocyanes	HCl	-	/ 
6	Caroténoïdes	HCl+H ₂ SO ₄	-	/ 
7	Stéroïdes	Anhydride acétique+H ₂ SO ₄	-	/ 
8	Alcaloïdes	Dragondrof	+++	Orange 
		Mayer	+++	Précipité Blanc 

N.B : +++ Fortement positif ; ++ : Moyennement positif ; + : Faiblement positif ; -Négatif.

D'après les résultats des tests phytochimiques effectués sur *Nigella sativa*, on constate qu'il existe une différence basée sur la présence ou l'absence de la couleur identifiant le composé en question.

Nigella sativa a réagi moyennement avec les réactifs vis-à-vis ces métabolites. Les réactions chimiques effectuées avec les réactifs, ont révélé une forte présence d'alcaloïde. D'autre part, ce test a affirmé l'absence des anthraquinones, caroténoïdes et stéroïdes chez cette espèce. (Voir tableau 11)

→ Rendement de l'extraction

$$\text{Rdt}\% = \frac{\text{mHE}}{\text{mV végétale}} \times 100$$

$$\text{Rdt}\% = 50\mu\text{L}\%$$

$$\text{mHE} = 0.016 \text{ g} \quad \text{mV végétal} = 400 \text{ g}$$

A la fin de l'extraction, un volume de 50 μ L d'HE de *Nigella sativa L.* a été récupéré. Ce qui représente un rendement très faible d'une goutte (50 μ L).

Nous avons extrait des traces d'HE. La difficulté de trouver une quantité suffisante d'HE peut s'expliquer par des raisons suivantes : l'origine, la nature du sol, le temps de la récolte, l'espèce, la région de la culture la durée de séchage, le mode et la durée d'extraction des huiles essentielles. En fait il a été montré que le rendement de l'huile essentielle dans les nouveaux grains séchés au bout de huit heures est plus élevé (0,4 ml par minute) et par 50 grammes [81]. Alors que nous avons travaillé sur des grains secs. Ce type de l'huile volatile peut être perdu en fonction de temps de stockage.

→ Caractérisation organoleptique

Cette caractérisation de l'HE de *Nigella sativa L.* a porté sur trois volets :

- **L'aspect** : liquide mobile, limpide ;
- **La couleur** : vert foncé ;
- **L'odeur** : Donnât une forte odeur rappelant l'odeur des grains de *Nigelle*.

III.2. Les activités biologiques

III.2.1. Test anti-inflammatoire (discussion des résultats)

Le but de ce test est la mesure l'activité anti-inflammatoire de l'hydrolat de graines de nigelle

Nous avons déterminés le pourcentage d'œdème suite à une inflammation provoquée sur les pattes gauches des souris à l'aide d'un produit irritant à base de carragénine.

Des doses d'eau (Témoin) d'hydrolat (huile fixe) et le produit de référence (Diclofenac de sodium) ont été injectés aux lots de souris correspondants.

La comparaison du taux de réduction de l'œdème des pattes après injection des doses égales du produit à tester et celui de référence correspondant, est réalisée par rapport à un témoin.

Les tableaux 17, 18 et 19 représentent la moyenne des pattes gauches et droites des souris des lots hydrolat, de référence et témoin (*voir l'Annexe*).

A partir des tableaux et l'équation d'œdème, et de la réduction d'œdème

- L'équation d'œdème :

$$\% \text{ d'œdème} = \left[\frac{\text{MPG} - \text{MPD}}{\text{MPD}} \right] * 100$$

MP_G : moyenne des poids de la patte gauche.

MP_D : moyenne des poids de la patte droite.

- L'équation d'inhibition de l'œdème :

$$\% \text{ inhibition} = \left[\frac{\% \text{ d'œdème témoin} - \% \text{ d'œdème Essai}}{\% \text{ d'œdème témoin}} \right] * 100$$

Le pourcentage (%) d'œdème et le pourcentage (%) d'inhibition de l'œdème de chaque lot ont été calculés.

Tableau 12 : Les valeurs représentant le pourcentage et l'inhibition d'œdème.

Lots	Témoin	Référence	L'hydrolat
(%) d'œdème	24.72	16.31	19.12
(%) d'inhibition	00	34.02	22.65

A partir du *tableau 12* on remarque que la valeur de l'inhibition de l'œdème est de 22.65% pour l'hydrolat ce qui montre que l'hydrolat de graines de nigelle inhibe de façon appréciable l'œdème induit par la carragénine à 1%, cette valeur est donc proche que celui du produit de référence qui est de 34.02%.

De ce fait, nous concluons que l'hydrolat de la plante étudié est un produit qui possède non seulement un pouvoir anti-inflammatoire mais celui-ci est proche que celui d'un produit déjà existant sur le marché.

III.2.2. Test antibactériennes et antifongiques (discussion des résultats)

Nous avons déterminé l'effet antibactérien et l'effet antifongique de l'hydrolat et de l'HF sur les quatre souches bactériennes et les deux souches fongiques testées. Et d'après l'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne donnée par [82], La sensibilité de ces dernières est estimée par mensuration des diamètres (\emptyset) des halos d'inhibitions dans les deux sens perpendiculaires autour des disques imprégnés de principes actifs à l'aide d'un pied à coulisse.

Les zones d'inhibition, variant entre 9 et 32mm, indiquent que les souches sont sensibles à *Nigella sativa*. En fonction de l'existence ou non des zones d'inhibitions, deux réponses sont possibles :

- Souche sensible : L'apparition de la zone d'inhibition.
- Souche résistante : Absence de zone d'inhibition (résultats négatif).

Les résultats de l'Activité antimicrobienne et antifongique sont regroupés dans les **tableaux 14 et 15**.

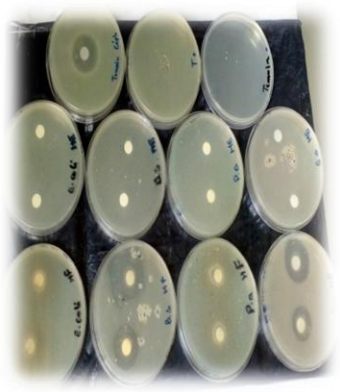
III.2.2.1. L'échelle de lecture des zones d'inhibition :

- ✓ L'évaluation qualitative des huiles fixes et de l'hydrolat est exprimée par l'observation de l'activité antimicrobienne qui se traduit par l'absence ou la présence d'un halo (zone claire) d'inhibition autour des disques.
- ✓ Mesurer le diamètre de zone d'inhibition obtenue après incubations pour chaque souche microbienne à l'aide d'un pied à coulisse.
- ✓ La sensibilité des diverses souches microbiennes étudiées vis-à-vis des extraits de l'huile de nigelle sera estimée par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition \emptyset comme suit :

Tableau 13 : La sensibilité des différentes souches vis vis-à-vis des H.Es selon le comité Français de Microbiologie.

Le diamètre d'inhibition « \emptyset »	Sensibilité	Inhibition
$\emptyset < 10 \text{ mm}$	non sensible (-)	Non inhibitrice
$16 \text{ mm} > \emptyset > 10 \text{ mm}$	sensible (+)	Légèrement inhibitrice
$28 \text{ mm} > \emptyset > 16 \text{ mm}$	très sensible (++)	Modérément inhibitrice
$\emptyset \geq 28 \text{ mm}$	extrêmement sensible (+++)	Fortement inhibitrice

Tableau 14 : Résultats de l'étude qualitative de la zone inhibitrice des bactéries ;

Bactéries testés (Souches bactériennes)	Gram	Diamètre (Ø) des zones d'inhibition en (mm)		Sensibilité	Résultats de l'activité antibactérienne
		HF	Hydrolat (H + Eau)		
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	24.00 : 27.50 Moy = 25.75	12.00 : 12.50 Moy = 12.25	+++ Très sensible	
<i>Bacillus subtilis</i>	+	28.00 : 32.00 Moy = 30.00	09.50 : 10.50 Moy : 10.00	+++ Très sensible	
<i>Escherichia coli</i>	-	12.00 : 12.50 Moy = 12.25	09.00 : 09.50 Moy = 09.25	++ : sensible	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	12.00 : 11.50 Moy = 11.75	09.00 : 09.50 Moy = 09.25	faible	

T - : pas de colonies, pas de contamination c.à.d. on a manipulé dans des conditions aseptiques.

T+ : amas de colonies, souches sans inhibiteurs ou antibiotiques, le milieu est fertile.

D'après les résultats obtenus, nous pouvons dire que toutes les espèces testées présentent une certaine sensibilité vis-à-vis de l'HF des graines de Nigelle. Cependant, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* se sont révélées très sensibles, tandis qu'*Escherichia coli*, et *Pseudomonas aeruginosa* sont révélés sensibles.

Les résultats relatifs à l'activité de l'huile fixe et de l'hydrolat envers les bactéries sont rapportés dans le **tableau 14**. 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 fixe et de l'hydrolat *Nigella sativa L*.

Notre hydrolat et l'HF de nigelle sont comparés par-rapport à un antibiotique standard de contrôle, la Céfaloxyne (100 mg/ml) utilisée comme témoin positif {T+ antibiotique} (Ø = **29.00 mm**). 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.

Dans notre étude, et selon l'échelle de sensibilité de l'activité antimicrobienne, les huiles de *Nigella sativa L* a montré une extrême activité vis à vis des souches Gr + constituées par les *staphylococcus aureus* et les *Bacillus subtilis*. Cependant l'action inhibitrice sur *Bacillus subtilis* (Ø=**30.00 mm**) est meilleure.

Concernant l'étude de l'action inhibitrice des huiles, nous notons une faible ou absence d'activité vis-à-vis des bactéries Gr- : *Escherichia coli* ($\varnothing=12.25$ mm) et *Pseudomonas aeruginosa* ($\varnothing= 11.75$ mm) (voir tableau 14).

Dans notre étude, les bactéries à Gram positive testées sont plus sensibles que les souches à Gram négative. Cette différence de sensibilité des souches microbiennes aux huiles peut être expliquée par une adaptation évolutive liée étroitement aux conditions biotiques (l'espèce elle-même) et abiotique (milieu), et peut être attribuée à la différence de la structure entre les bactéries Gram positive et les bactéries Gram négative [83]. Selon [84], 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.

Nous venons de montrer que l'huile 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*. Les huiles contenant ces terpènes phénoliques se sont avérées particulièrement efficaces en tant qu'agents antibactériens. 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.

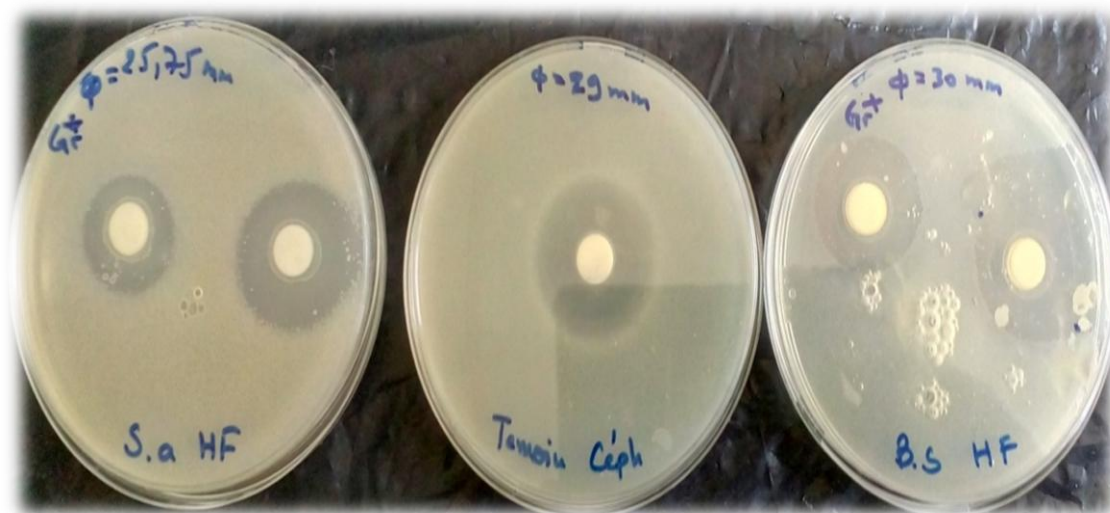
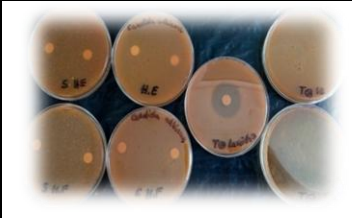


Figure 37 : Résultat de l'activité antibactérienne de l'HF sur *Bacillus Cereus* et *Staphylococcus aureus* et sur Céfaloquine.

Tableau 15 : Résultats de l'étude qualitative de la zone inhibitrice des champignons en mm.

Champignons testés (Souches fongiques)	Diamètre (Ø) des zones d'inhibition en (mm)		Sensibilité	Résultats de l'activité antifongique
	HF	Hydrolat		
<i>Candida albicans</i>	10.00 : 10.00 Moy = 10.00	09.00 : 10.00 Moy = 09.50	nulle	
<i>Saccharomyce cerevisiae</i>	13.00 : 12.50 Moy = 12.75 Fongistatique (activité faible)	09.50 : 09.00 Moy = 09.25	++ : sensible	

T - : pas de croissance, c.à.d. on a manipulé dans des conditions aseptiques.

T+ : SB, le milieu est fertile.

T+ antifongique Lamidaz : (Ø = 32.00 mm)

→ **Remarque** : on à pas pu obtenir l'HE pure, pour cela nous avons utilisé l'hydrolat, c'est pour cela que l'activité antifongique est très faible ou nulle.

NB : * = résistant (Ø < 9 mm), non sensible

L'étude de l'activité antifongique de l'huile fixe et de l'hydrolat vis à vis des deux champignons a montré une très faible résistance de levures *Candida albicans* et *Saccharomyce cerevisiae* vis-à-vis des deux extraits. (Tableau 15) Nous n'avons remarqué aucune inhibition chez les deux levures étudiés, Donc le champignon est résistant aux extraits étudiés.

Généralement, ces souches fongiques ont été isolées à partir des éléments riches en flavonoïdes, ce qui exprime la production et la multiplication des spores et donc on peut les considérer comme milieu de culture pour certains champignons. Alors, il n'y a pas une inhibition fongique chez *Nigella sativa* parce qu'ils sont très riches en flavonoïde.

Nous constatons que notre HF présente une forte activité antimicrobienne par rapport à l'activité antifongique qui a présenté une certaine activité modérée dont les diamètres des zones d'inhibition n'ont pas dépassé les 13mm.

III.2.2.2. Détermination de la CMI

La concentration minimal inhibitrice ou CMI est la plus petite concentration de l'agent antibactérien suffisante pour inhiber, in vitro, la croissance d'un microorganisme. Elle renseigne sur le potentiel bactériostatique de l'agent antibactérien utilisé. La CMI de l'HF vis-à-vis d'une souche donnée sera donc la plus petite des concentrations ne montrant aucune croissance visible à l'œil nu de germes [85].

Les subcultures réalisées suite à l'obtention des CMI ont permis d'observer les concentrations minimales, les résultats des CMI d'huile végétale sur les bactéries sont regroupés dans le *tableau 16*

Tableau 16 : Les valeurs de la CMI de l'HF vis-à-vis des souches testées.

Dilution%		2	1	0.5	0.25	0.125	0.03	0.06	T
Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	+	+	+	+
	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
Gram -	<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	+	+	+	+	+	+

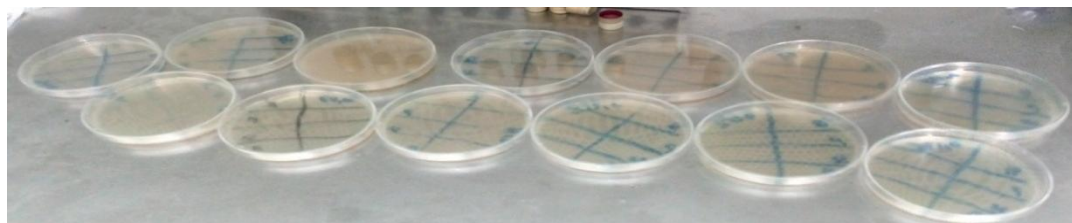
(-): absence de croissance

(+): présence de croissance

L'huile de *Nigella sativa* s'est avérée active sur les souches étudiées même à de très faibles concentrations pour certaines, malgré l'ajout de Tween 80 qui abaisse considérablement l'activité antimicrobienne des HEs [86].

Les valeurs de CMI obtenus, ont montré que l'huile végétale possède un pouvoir inhibiteur important sur les grams positif car aucune croissance bactérienne visible n'a été observée dans la zone dédiée a (*Staphylococcus aureus* et les *Bacillus subtilis*) avec des CMI respectives de 0.25% et 0.125%. Pour les quatre espèces microbiennes testées, le maximum d'action est noté sur les bactéries *Bacillus subtilis* avec CMI de 0.125%.

Ces valeurs 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.



Figures 38 : Photos des boîtes de pétri montrant l'activité antimicrobienne (AAM) de l'HF sur les bactéries utilisés (Evaluation de la CMI).

III.2.3. Test d'activité antioxydant (discussion des résultats)

III.2.3.1. Piégeage du radical libre DPPH

L'activité antioxydante a été évaluée par la méthode du radical DPPH°, la réduction de ce radical s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH°) à la couleur jaune (DPPH-H) (Figure 16). Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti-radicalaires [87].

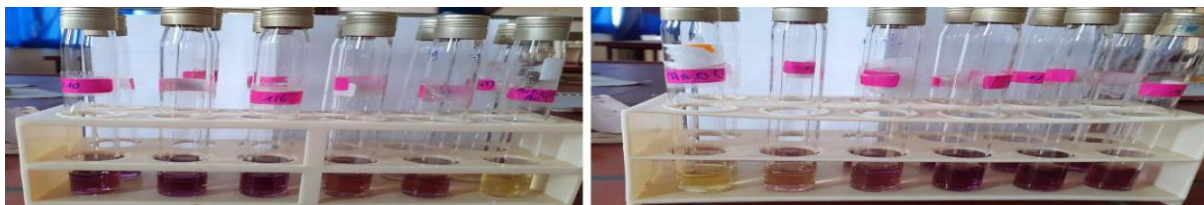


Figure 39 : Résultats d'activité antioxydante DPPH.

Dans ce test on utilise l'acide ascorbique comme standard, les résultats obtenus (pourcentage d'inhibitions I%) sont représentés dans la courbe d'étalonnage (figure 41, 42), ayant l'équation: $Y=39.01x$ avec un coefficient de corrélation $R^2=0.982$ et $Y=39.17x+27.16$ avec un coefficient de corrélation $R^2=0.991$.

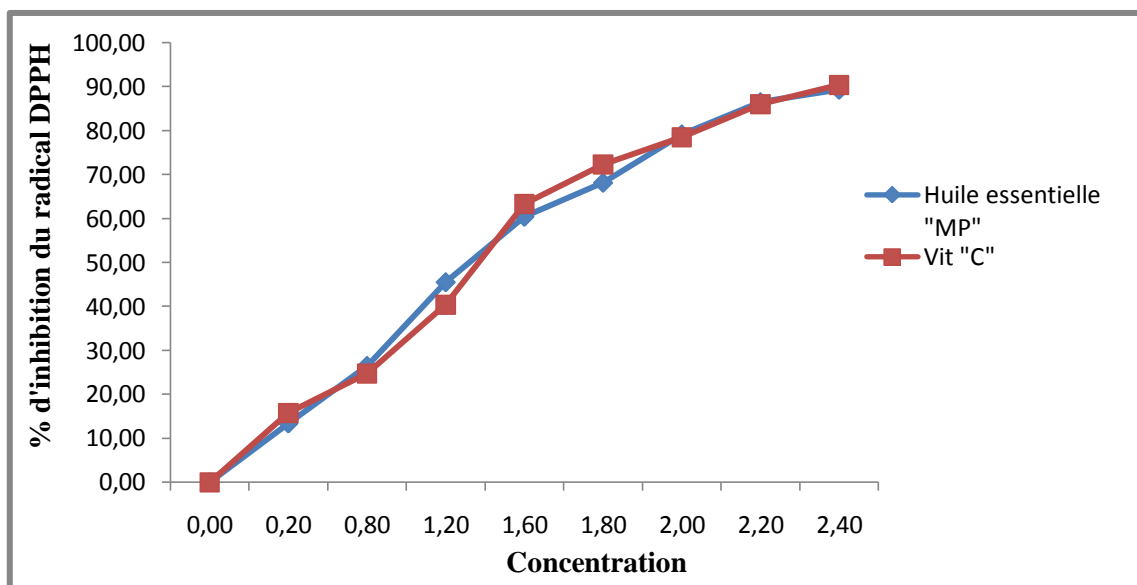


Figure 40 : Pourcentage d'inhibition pour l'huile végétale de *N. sativa L.* et la vitamine C.

D'après la *figure 40*, il semble que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration soit pour la vitamine C, ou pour l'huile végétale de *Nigella sativa*.

On remarque également que le pourcentage d'inhibition du radical libre pour l'huile végétal est proche de celui de la vitamine C. En effet, à la concentration de 2,4 mg/ml, notre

huile fixe a révélé un pourcentage d'inhibition de DPPH de 90,43 % tandis que la vitamine C est de 89,32 %.

Nos résultats indiquent que la plante étudiée, *Nigella sativa L.* a un très fort pouvoir réducteur du radical DPPH.

III.2.3.2. Détermination de l'IC₅₀

IC₅₀ est inversent lié à la capacité antioxydant d'un composés, car il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50 %. Plus la valeur d'IC₅₀ est basse, plus l'antioxydant est fort, un exemple de calcul est schématisé dans la figure 41.

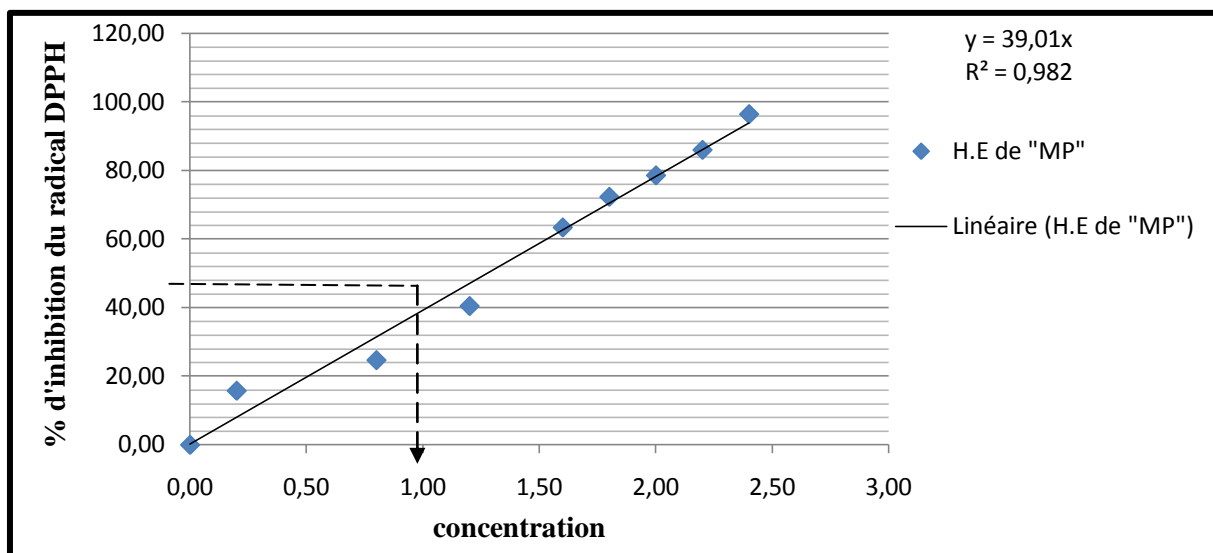


Figure 41: Courbe de tendance de l'IC₅₀ de l'huile fixe de *Nigella sativa L.*

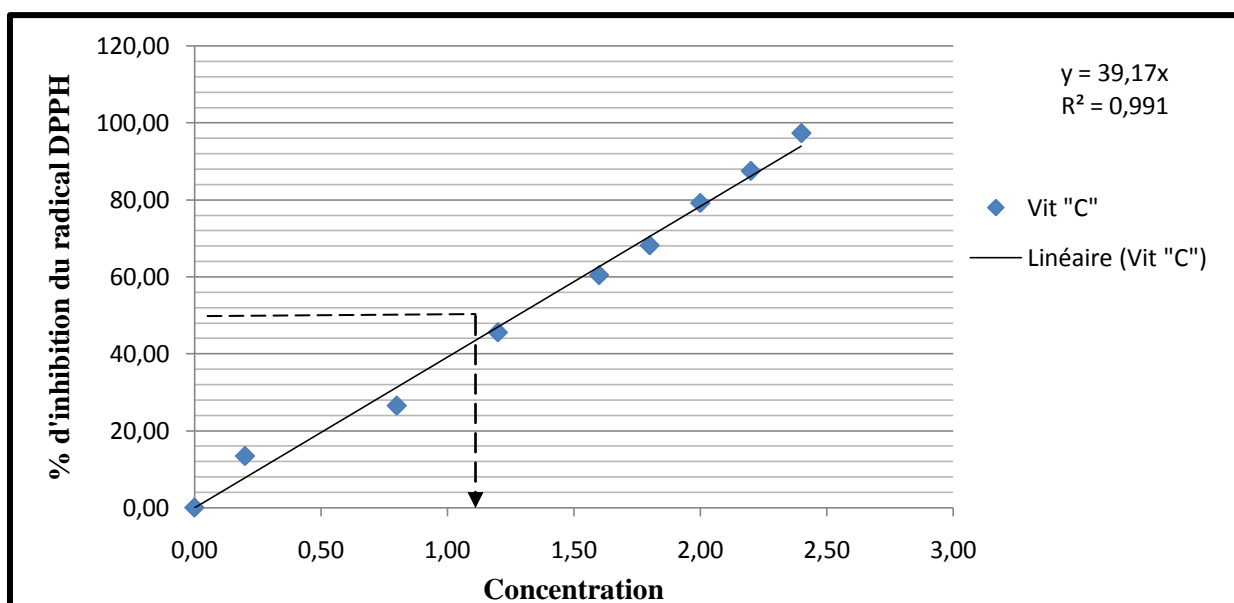


Figure 42 : Courbe de tendance de l'IC₅₀ de la vitamine C.

D'après les figures 41 et 42, notre huile fixe est un antioxydant efficace par rapport aux antioxydants de référence, avec un IC50 qui est respectivement 1,282 mg/ml pour l'huile essentielle de *Nigella sativa L.* et 1,276 mg/ml pour le Vitamine C. Cette huile a montré une activité antioxydant important que celui de l'acide ascorbique (Vitamine C).

Nous avons utilisé la méthode de réduction de DPPH pour étudier l'activité antioxydante, bien que l'utilisation d'une seule méthode ne puisse donner qu'une suggestion réduite de l'activité antioxydante. Cette méthode est simple mais fortement sensible et elle est très utilisée.

D'après notre recherche bibliographique, il n'y a pas beaucoup des publications scientifiques qui ont étudié les activités antioxydantes d'huile fixe de *Nigella sativa*, mais le peu de références consultées prouve l'existence d'une activité antioxydante très intéressante de l'huile de nigelle en général.

Thymoquinone Sales

Thymoquinone

0.1% - 10% Oil

0.1% - 99% Powder

**Conclusion
générale**

Anti-cancer

Anti-fatigue

Lower blood pressure

Conclusion générale

Au terme de cette étude, nous concluons que les graines de *Nigella sativa L.* possèdent un intérêt thérapeutique très intéressant. Tout d'abord une source importante d'huile (39.84 %), composant majeur de ces graines lui conférant la nomination d'une graine oléagineuse.

Cependant l'extraction de l'huile essentielle (HE) par le Clevenger a permis d'obtenir un rendement très faible de l'ordre de 50 µl/400g de matière sèche. Des problèmes techniques nous ont empêché d'extraire des quantités suffisantes et le manque des réactifs nécessaires pour faire des dilutions, nous a obligé de faire des tests à partir de l'huile fixe et de l'hydrolat.

Cette plante médicinale connue pour ses propriétés biologiques intéressantes qui est utilisée dans divers domaines en médecine, pharmacie, cosmétologie et en agriculture.

L'activité anti-inflammatoire de *Nigella sativa L.* a été évaluée par le pourcentage (%) d'œdème et possèdent des propriétés anti-inflammatoire importantes.

Les tests microbiologiques effectués sur l'huile fixe et l'hydrolat de *Nigella sativa* ont été réalisés sur 04 souches bactériennes (deux souches de Gram+ et deux souches de Gram-) et 02 champignons, selon la méthode de diffusion sur gélose Muller-Hinton et sabouraud.

Etant montré que cette HF possède un large spectre d'activité antibactérienne sur les germes gram positifs principalement **staphylococcus aureus** et **Bacillus subtilis** (Ø= 23 mm), ainsi qu'une activité antifongique sur *Saccharomyce cerevisiae*.

L'activité antioxydante de *Nigella sativa L.* s'explique par sa richesse en polyphénols totaux (PPT) et une proportion en flavonoïdes, cette activité à été évaluée par la méthode de réduction de radical libre DPPH.

De cette étude il en résulte, une vision plus globale à l'avenir pour une exploitation plus rationnelle des huiles essentielle et fixe des graines de *Nigella sativa L.* à des fins préventif et thérapeutique pour lutter contre plusieurs infections bactériennes, fongiques, parasitaires, virales et d'autres pathologies cancéreuses et autres. Ceci montre que cette plante est certainement intéressante pour être utilisée comme thérapie alternative ou comme modèle pour la synthèse de nouvelles substances bioactives.

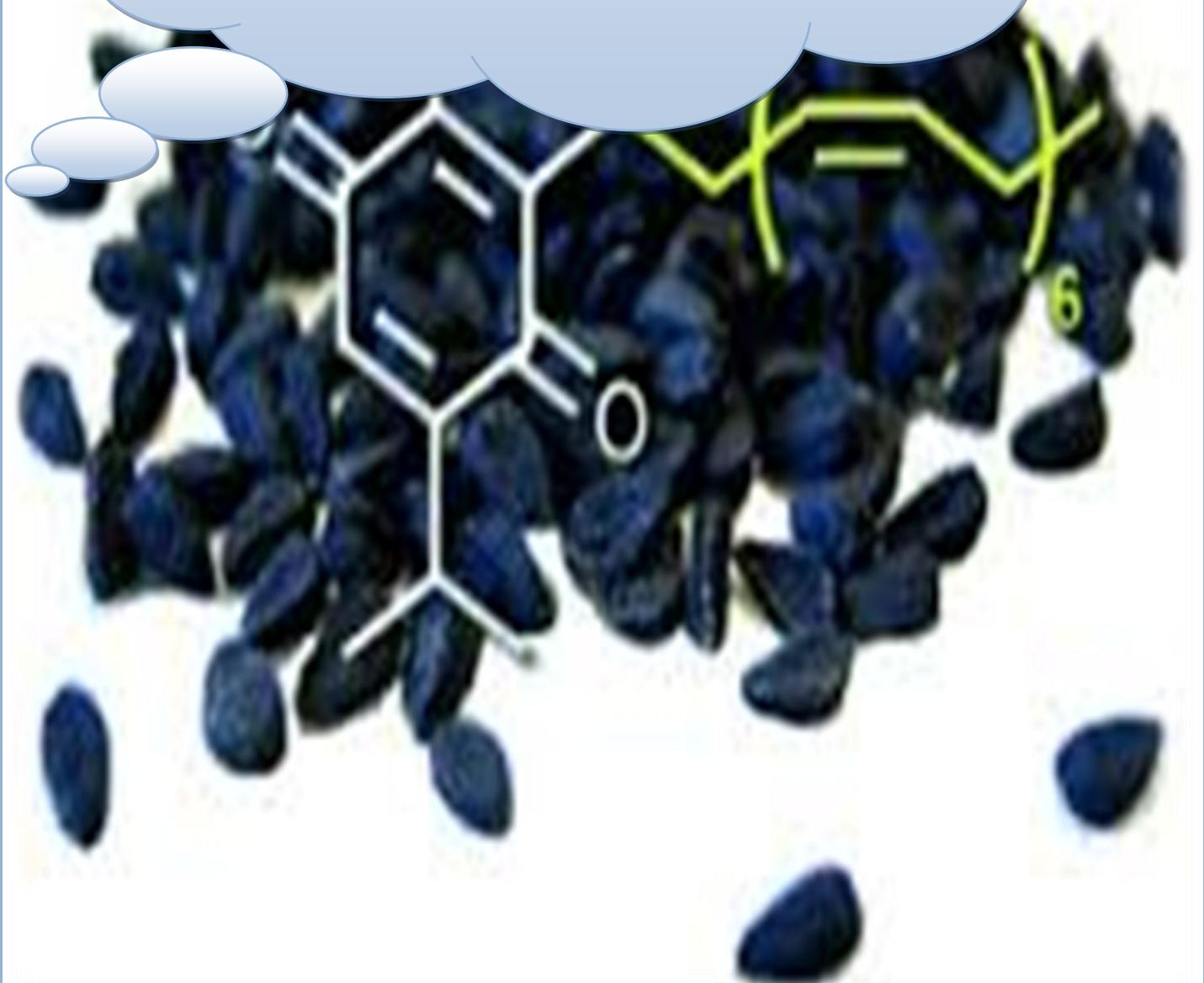
En ce sens, l'étude phytochimique montre que *Nigella sativa L* constitue une véritable carte métabolique (les polyphénols, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les tannins, les coumarines ainsi que les huiles essentielles.) qui peut-être utile pour lutter et apporter un remède à plusieurs pathologies humaines. En l'occurrence, de cette plante, la nigelle de par sa richesse en composés antioxydants de ses huiles, peut être utilisée pour lutter contre les infections virales notamment l'infection à coronavirus le sars-cov2 à l'origine de la pandémie actuelle dans le monde.

Perspectives

Pour mieux cerner l'effet thérapeutique de cette plante, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées:

- ✓ Evaluer la toxicité de l'extrait natif et traité.
- ✓ Elargir la gamme des microorganismes cibles.
- ✓ Evaluer les doses minimales bioactives pour chaque fraction de l'extrait étudié.
- ✓ Appliquer d'autres tests antioxydants tels que les méthodes de réduction de phosphomolybdate (TAC: Total AntioxidantCapacity) et celle de réduction des ions ferriques (FRAP: Ferric ion Reducting Antioxydant Parameter) pour avoir une indication plus affinée sur la capacité antioxydante de cette plante.
- ✓ il serait judicieux de reprendre nos essais dans des conditions meilleures, c.à.d. nécessitent des études complémentaires profondes à différents niveaux de l'approche à travers une caractérisation fine et poussée de ces huiles essentielles par d'autres techniques telles que la CPG/SM ou l'HPLC/SM.
- ✓ Les résultats dans ce modeste travail restent préliminaires et il serait intéressant d'utiliser des méthodes plus performantes pour isoler cette gamme extraordinaire des molécules bioactives et tester leurs activités, en envisageant l'attention au composé thymoquinone (TQ), une substance présente dans nature dissoute dans la fraction volatile de l'huile du cumin noir, déjà proposée pour le traitement de COVID-19, qui pourront constituer un créneau très prometteur à l'avenir pour les industries pharmaceutiques et cosmétiques en Algérie.
- ✓ Les huiles et les grains de *Nigella sativa* L. vue sa composition chimique est utilisée en gastronomie, notamment comme compléments alimentaires.
- ✓ Par conséquent, nous suggérons que la combinaison de l'EGCG, de la Thymoquinone et de la vitamine D3 pourrait activer les gènes dépendants du Nrf2 et protéger les cellules contre l'infection virale et pourrait être utilisée dans la prévention des infections virales, telles que le SARS-CoV-2 (Covid-19).

Annexes



Annexes

A. Etude de l'activité anti-inflammatoire (in vitro)

Tableau 01 : Poids des pattes gauche et droite des souris avec leurs moyennes pour l'hydrolat

	Souris 01	Souris 02	Souris 03	Souris 04	Souris 05	Moyenne	(%) œdème	(%) Inhibition
P_G(g)	0.17	0.191	0.138	0.164	0.149	0.162	19.12	22.65
P_D(g)	0.124	0.175	0.131	0.121	0.129	0.136		

P_G : Patte gauche.

P_D : Patte droite.

Tableau 02 : Poids des pattes gauche et droite des souris avec leurs moyennes pour le Diclofénac de sodium 75mg/kg

	Souris 01	Souris 02	Souris 03	Souris 04	Souris 05	Moyenne	(%) œdème	(%) Inhibition
P_G(g)	0.173	0.164	0.149	0.169	0.163	0.164	16.31	34.02
P_D(g)	0.130	0.151	0.131	0.155	0.138	0.141		

Tableau 03 : Poids des pattes gauche et droite des souris avec leurs moyennes pour le Témoin (solution physiologique 0.9%)

	Souris 01	Souris 02	Souris 03	Souris 04	Souris 05	Moyenne	(%) œdème	(%) Inhibition
P_G(g)	0.208	0.210	0.220	0.247	0.225	0.222	24.72	0
P_D(g)	0.184	0.170	0.169	0.187	0.182	0.178		

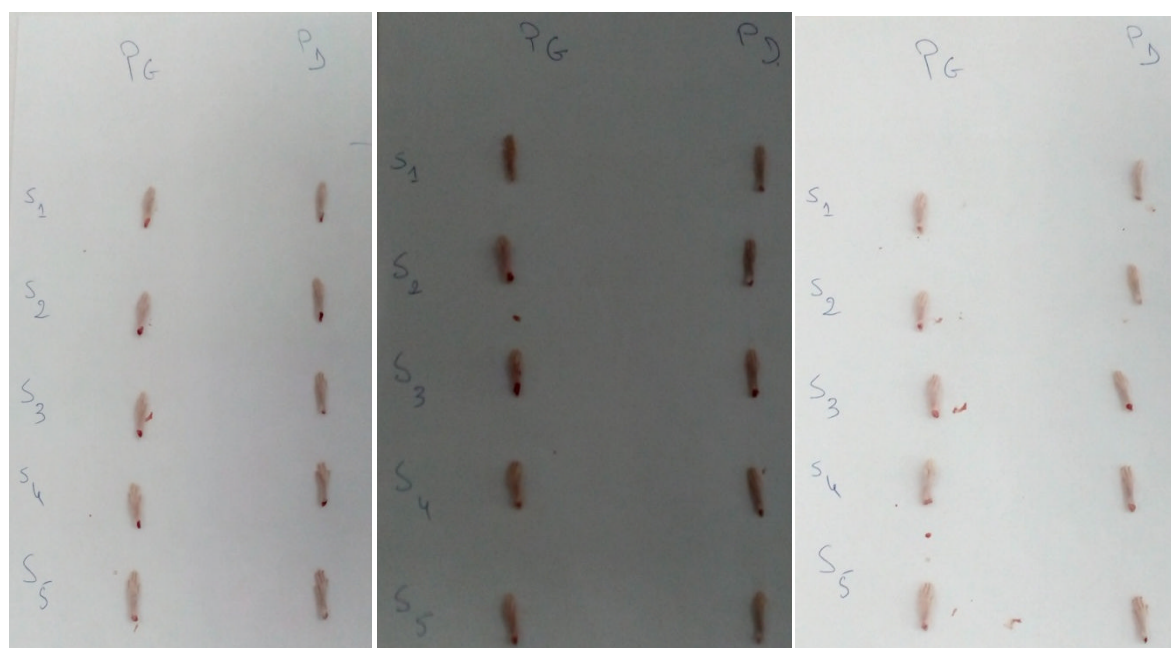


Figure 01 : Les pattes gauches et droites des souris de trois lots d'essais respectivement (D1, D2, D3)



Figure 02 : Sacrifice des souris par dislocation cervicale.



Figure 03 : Coupure des pattes à la hauteur de l'articulation.

B. Etude de l'activité antimicrobienne et antifongique (in vitro)

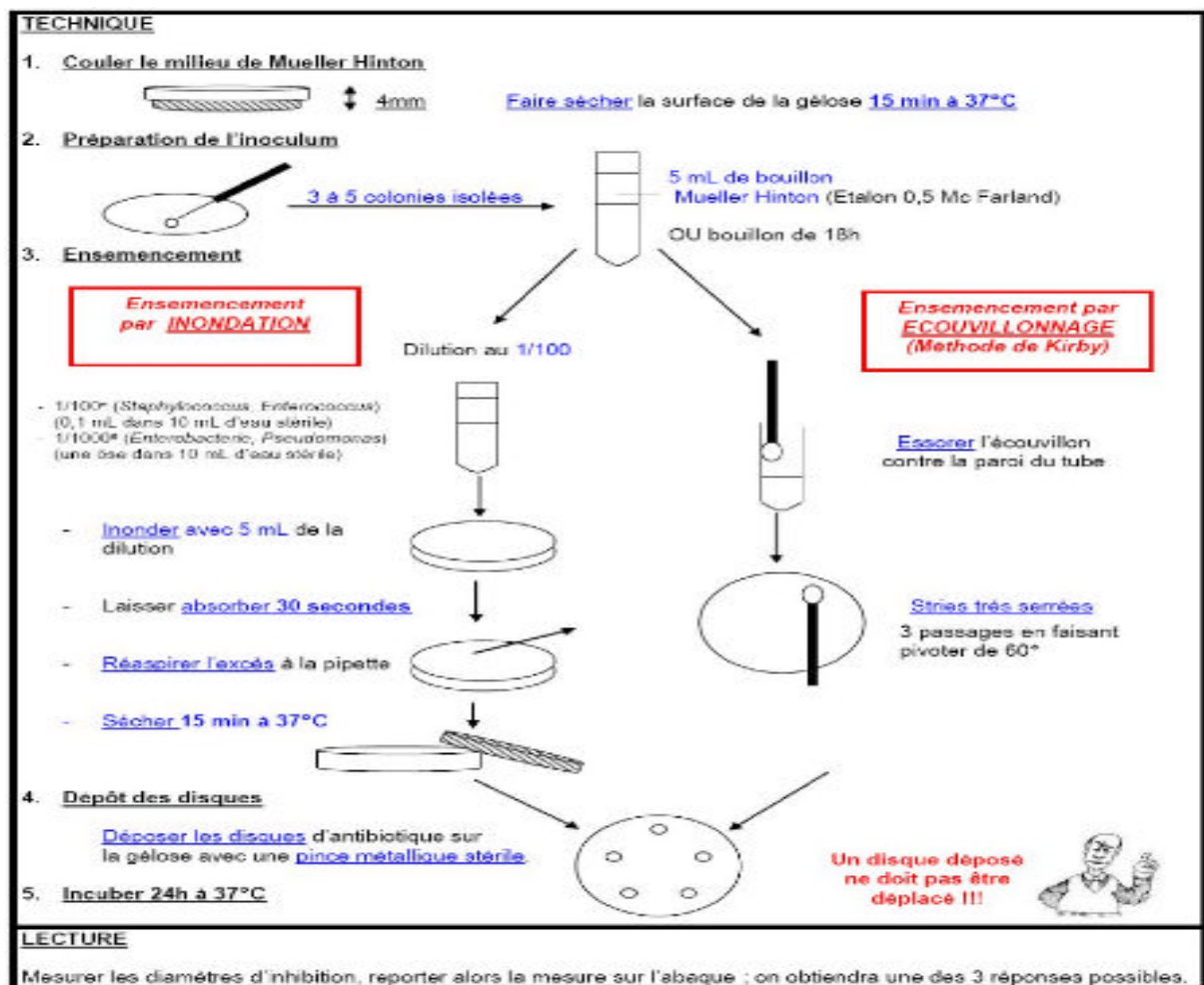


Figure 04 : Fiche Technique d'Antibiogramme

B.1. Quelques microorganismes utilisés et leurs pathologies affections :

Les microorganismes :

Ce sont des êtres vivants microscopiques, de nature végétale (micro algues par exemple) ou animale (microbe). Les micro-organismes ne peuvent pas être vus à l'œil nu, ce qui définit leur taille, ils sont très divers : les bactéries, les virus et champignons parmi ces familles de microorganismes on citera les plus connues et celle qu'on utilisera dans notre étude :

1. Bactéries :

Les bactéries sont des êtres vivants qui appartiennent à un groupe. Ce sont des organismes cellulaires simples appelés Procaryote qui ne contiennent pas de noyaux et qui sont d'habitude trouvé en très grand nombre parce qu'ils peuvent se multiplier rapidement. Il y a beaucoup de types de bactéries qui sont toutes séparées dans différents groupes, chaque groupe ayant des propriétés uniques.

Une caractéristique importante des bactéries est la paroi cellulaire. Les bactéries peuvent être divisées en deux groupes (Gram négatif et Gram positif) basé sur la différence de la structure et de la composition chimique de la paroi cellulaire mise en évidence grâce à la coloration de Gram.

1.1. Bacille à gram négatif (-) :

Il n'y a qu'une seule ou au plus deux couches de peptidoglycane qui ne représente que 5 à 20 % des constituants de la paroi bactérienne. Mais 3 polymères situés en dehors du peptidoglycane viennent compléter la paroi : des lipoprotéines, une « membrane externe » qui contient du lipopolysaccharide.

Les lipoprotéines sont le lien entre le peptidoglycane et la « membrane externe » : le composant protéine est un polymère de 15 acides aminés qui forme une liaison peptidique avec le tétrapeptide des chaînes latérales du peptidoglycane ; le composant lipide est relié à la « membrane externe ».

La « membrane externe » est constituée d'une double couche de phospholipides dans laquelle tout ou partie des phospholipides de la couche la plus externe sont remplacés par des molécules de lipopolysaccharide. Au sein de cette « membrane externe », qui est une mosaïque fluide, se trouvent associés au moins deux types de protéines spécifiques : certaines sont dites protéines de structure car elles consolident la membrane externe d'autres, appelées « porines » permettent le passage des petites molécules hydrophiles et en particulier, sur le plan médical, des antibiotiques (-lactamines, tétracyclines, quinolones...).

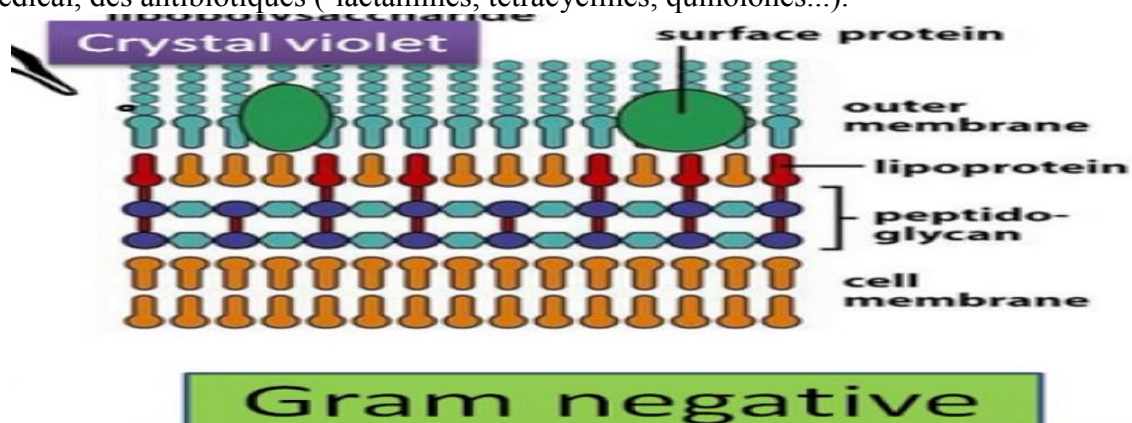


Figure 05 : Paroi des bactéries à Gram –.

1.1.1. *Escherichia coli* (colibacille) ATCC 25922

Escherichia coli est un bacille non encapsulé et mobile par ciliature péritriche à gram négatif aérobies qui appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Appelée communément "colibacille" c.-à-d. "bacille à côlon". *E. coli* se développe sur gélose ordinaire. Indole⁺, urée-fermente le lactose, gazogène, mais ne produit pas d'acétine, elle n'est pas pathogène à l'état

normal, sa taille varie en fonction des conditions de croissance, pesant de 0,5 à 5 pictogrammes, les bactéries en croissance rapide (18 à 24 h) sur les milieux habituels étant plus allongées et donc plus grandes que les bactéries quiescentes. Les colonies ont en moyenne 2 mm de diamètre, elles sont rondes, plastes et à bords réguliers.

Cette bactérie que l'on trouve couramment dans le tube digestif de l'être humain et des animaux à sang chaud qui joue un rôle utile dans l'intestin en participant et à la synthèse de vitamines. C'est un germe pathogène le plus fréquemment responsable d'infections urinaires et qui se transmet par voie orofécale. Cette bactérie est aussi à l'origine de septicémies, méningites (Infection néonatale) chez le nourrisson, génitales, hépatobiliaires ou digestives, cholécystites et appendicites entérites, toxi-infections alimentaires, ainsi que de manifestations intestinales telles que les diarrhées et vomissements [89], ainsi que diverses infections communautaires ou nosocomiales.

Certaines en revanche, comme *E. coli entérohémorragique* (ECEH), peuvent provoquer de graves maladies d'origine alimentaire. La transmission à l'homme passe principalement par la consommation d'aliments contaminés, comme de la viande hachée crue ou mal cuite, du lait cru, des légumes crus et des graines germées contaminés.



Figure 06 : Photographie au microscope optique de bactéries *Escherichia coli*.

[\(http://fr.wikipedia.org/wiki/\)](http://fr.wikipedia.org/wiki/)

1.1.2. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Il s'agit d'un petit bacille à Gram négatif non sporulant, mobile grâce à son flagelle monotriche polaire simple, mésophile à 1 à 5 μm de long et 0,5 à 1 μm de large que l'on retrouve partout dans la nature, dans l'eau, le sol, les plantes, les animaux et l'homme, on le trouve aussi dans l'environnement hospitalier, surtout dans les endroits humides de lavabos, savons liquides, humidificateur, solution d'antiseptiques. Elle se trouve dans le tube digestif et plus rarement dans la saline [90], on la trouve quelquefois au niveau de la peau, de l'appareil respiratoire supérieur, de l'œil, de l'oreille externe, du système nerveux, abcès, endocardites et du tube digestif chez l'individu sain. Ce sont essentiellement les individus qui ont reçu des antibiotiques, qui sont affaiblis sur le plan immunitaire ou qui ont été hospitalisés, qui développent le plus facilement le bacille. En dehors de ces cas, le taux de portage (transmission du germe) est relativement faible.

Elle peut provoquer des infections d'origine nosocomiale parfois sévères chez les sujets dont les défenses sont amoindries (chez les patients immunodéprimés ou atteints de mucoviscidose [91], des infections urinaires, bronchiques [92][93]. Responsable d'infections cutanées, (impétigo, furoncles), d'infection de la sphère ORL (sinusites, otites...) et d'infection divers Septicémie, digestives [93].

Pseudomonas aeruginosa produit deux pigments (colorant) bleu gris : la pyocyanine, d'où il tire son nom de bacille pyocyanique (*Bacillus pyocyaneus*), nom usuel de la bactérie en

France, colorant vert, la pyoverdine. Ce bacille est facilement mis en évidence en laboratoire, il est non sporulé (sans spore) et a une forme droite ou légèrement incurvée, capable de se développer dans des températures allant de +4°C à +45°C. La température optimale de croissance se situe entre 30 et 37°C (Vasil, 1986), pH optimal 6,5-8.

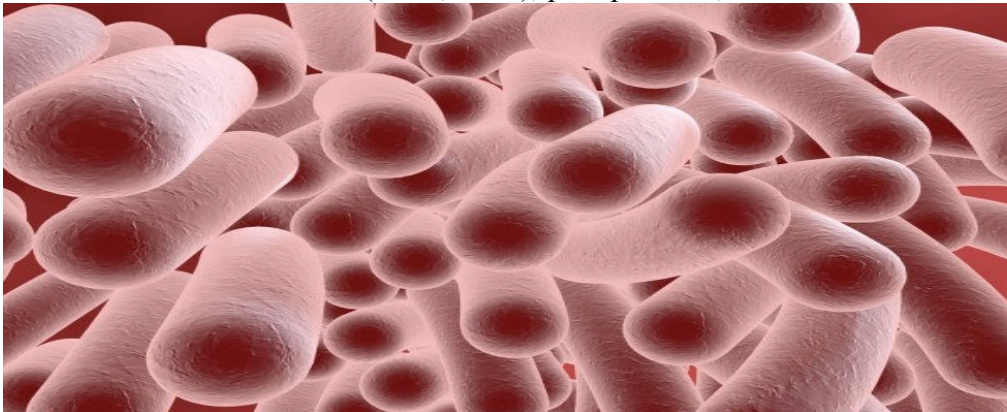


Figure 07 : *Pseudomonas Aeruginosa* sur gélose de Cétrimide

1.2. Cocci Gram positif (+) :

Il y a de nombreuses couches de peptidoglycane qui représentent jusqu'à 90 % des constituants de la paroi bactérienne. Celle-ci contient aussi un feutrage (10 à 50 % du poids sec de la paroi) d'acides teichoïques (polymères du glycérol ou du ribitol phosphate) associés étroitement au peptidoglycane et faisant parfois saillie à la surface de la bactérie.

Certains, les acides lipoteichoïques, sont placés transversalement. Et s'enfoncent jusqu'à la membrane cytoplasmique. En général il n'y a pas ou peu de protéines dans la paroi des bactéries à Gram positif. Parmi les exceptions, notons la protéine A de *Staphylococcus aureus*.

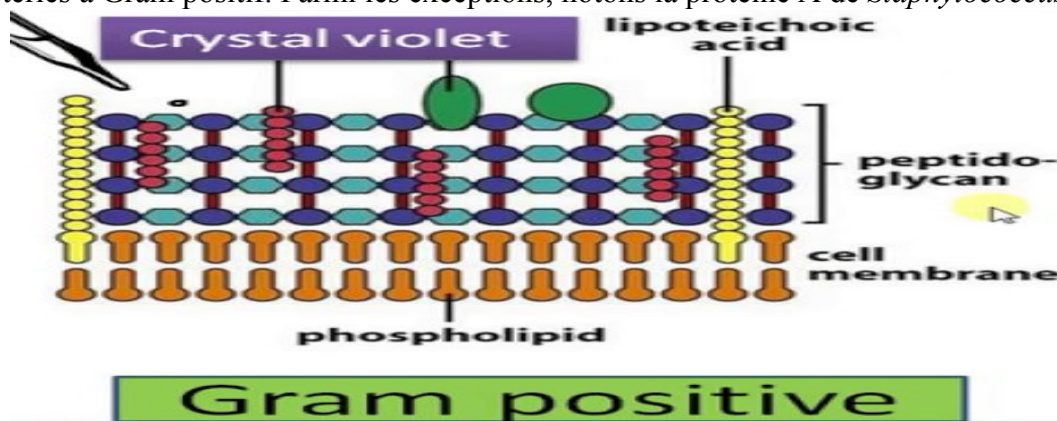


Figure 08 : Paroi bactéries à Gram +

1.2.1. *Staphylococcus aureus*

Le genre *Staphylococcus* est une coque en amas (grappes de raisin), à gram et catalase positif de 0,5 à 1 um de diamètre appartenant à la famille des *Staphylococcus* : non sporulé, immobile, aéro-anaérobie facultatif, fermentant le glucose. Sa teneur en caroténoïdes lui confère une couleur dorée à l'origine de son nom, température optimal à 37°C, PH optimal: 7.2-7.4.

C'est un germe ubiquitaire, retrouvé dans tous les milieux naturels (air, poussière, sol, eau, égouts, vêtements) mais également chez les animaux et chez les hommes. C'est l'espèce la plus pathogène du genre, d'origine humaine, animale (peau, muqueuses, volaille, bovin, ovin, caprin...), environnementale ou non spécifique. Elle est responsable d'intoxications alimentaires, d'infections localisées suppurées, nécrotiques ou entériques et, dans certains cas extrêmes, de septicémies physiques (greffe, prothèses cardiaques, manifestations digestives,

syndrome de choc toxique, 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). Infections urinaires et syndromes gastro-intestinaux de types crampes abdominales, vomissements, nausées, diarrhées. Il est trouvé chez 15 à 30 % des individus sains à l'état normal dans l'oropharynx, les fosses nasales, dans les selles au niveau du Périnée ou des aisselles [90].

Staphylococcus aureus possède un pouvoir. Il est susceptible de sécréter différentes toxines et des enzymes qui entraînent des liaisons suppuratives et nécrotiques [94].



Figure 09 : Photographie au microscope optique de bactéries *Staphylococcus aureus*. (<http://fr.wikipedia.org/wiki/>)

1.2.2. *Bacillus subtilis*

C'est un bacille à Gram positif (+) à spore de 1 à 1.2 um de large sur 3 à 7 um de long de la famille des Bacillacées, mobile, aéro-anaérobies facultatifs ou parfois aérobies stricts. Il vit sur divers substrats organiques (les poussières, le sol, le lait, l'eau, Et les plantes sèches). Il n'est pas considéré comme pathogène pour l'homme, mais il peut contaminer des aliments et peut exceptionnellement provoquer des intoxications alimentaires, vomissements et diarrhées, septicémie (rare)[95].



Figure 10 : Photographie au microscope optique de bactéries *Bacillus subtilis*.

→L'activité antifongique a été évaluée sur deux (02) champignons sont présentés dans (**Tableau 15**) :

2. Les moisissures :

Les moisissures sont omniprésentes dans notre environnement. La plupart sont phytopathogènes et se développent en saprophytes dans la terre et sur les plantes et débris végétaux en voie de putréfaction.

L'humidité favorise leur survie et leur développement. Elles sont retrouvées dans l'air, sur le sol et les surfaces (verticales ou horizontales), dans l'alimentation et parfois dans l'eau.

Elles sont donc également présentes dans l'air ou sur les surfaces à l'hôpital, notamment par remise en suspension en cas de travaux (petits travaux ou gros œuvres), et véhiculées par les systèmes de ventilation.

2.1. *Candida albicans*

C'est un organisme vivant à l'état normal de la bouche, le vagin et le tube digestif de l'être humain [96].

C'est l'espèce de levure la plus connue. Au laboratoire médical, la culture en boîte pétri donne des colonies qui sont grandes, rondes, de couleur blanche ou crème, elles poussent bien sur milieu de sabouraud ou sur gélose au sang [97].

Le principal agent pathogène est *Candida albicans* (Candidose) responsable d'infections superficielles aussi bien que systémiques. Ces dernières ne sont souvent que chez des individus immunodéprimés. Il fait partie de la flore normale de l'intestin, les infections superficielles comprennent le muguet (sur la muqueuse buccale), des vulvo-vaginites. La pathogénicité de *Candida albicans* est liée à la phase de filamenteuse. Cette levure peut provoquer des infections du vagin, de la bouche ou des poumons.

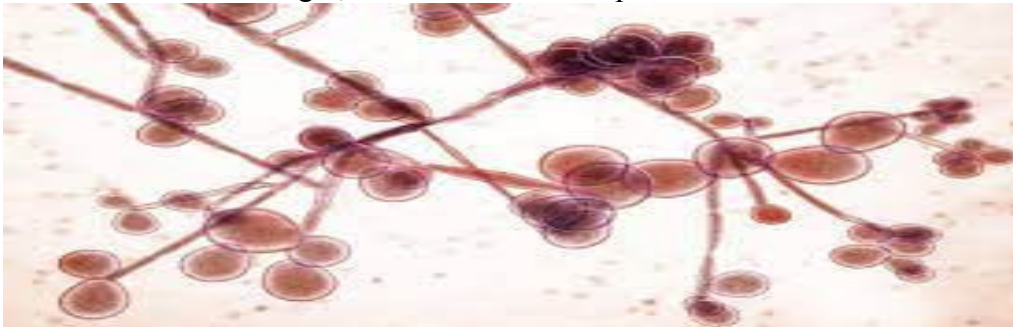


Figure 11 : *Candida albicans*.

2.2. *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae (ou levure de bière, levure de boulanger) est un champignon très courant. Il est aussi un organisme eucaryote le plus simple étudié dans les laboratoires de biologie pour étudier les eucaryotes. Elle présente l'avantage de se reproduire rapidement et peut également être transformée pour exprimer de nouveaux gènes, tester des molécules...mais elle peut aggraver l'inflammation intestinale la maladie de Crohn.

Elle prend la forme d'une cellule ronde ou ovale de 5 à 10 micromètres de diamètre. Elle possède un génome à ADN double brin linéaire. Elle se réplique assez rapidement à 30 °C, environ toutes les deux heures. Elle peut vivre dans deux milieux différents :

- en milieu aérobie, en présence d'oxygène, où elle se reproduit rapidement grâce au processus de respiration ;
- en milieu anaérobie, où elle fermente, c'est-à-dire qu'elle convertit le sucre en alcool. C'est une levure communément utilisée en cuisine (pour faire monter la pâte) et pour la fabrication d'alcool

Dans le cas de *Saccharomyces cerevisiae*, on ne parle pas de mâles ou de femelles mais de cellules a et α (alpha). Après échange des génomes, la fécondation donne naissance à deux spores a et deux spores α .

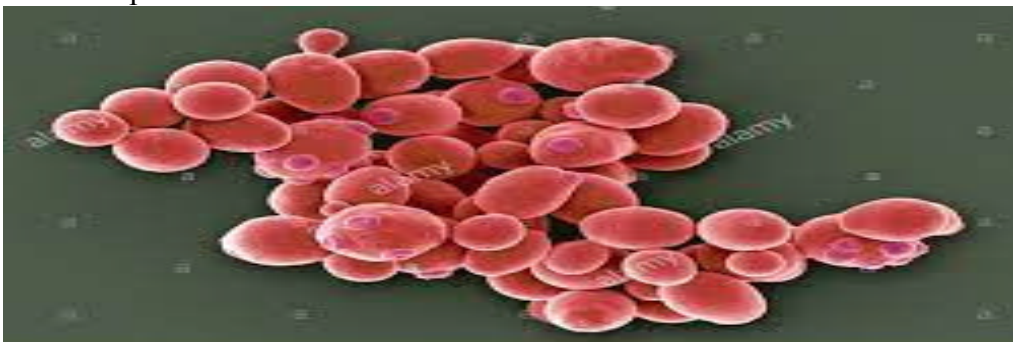


Figure 12 : *Saccharomyces cerevisiae*.

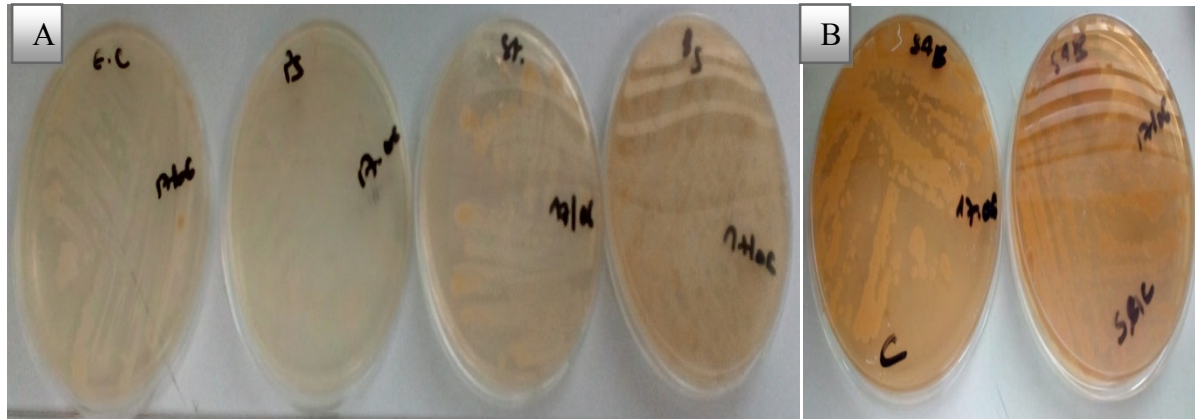


Figure 13 : Les colonies. A : bactériennes ; B : fongiques

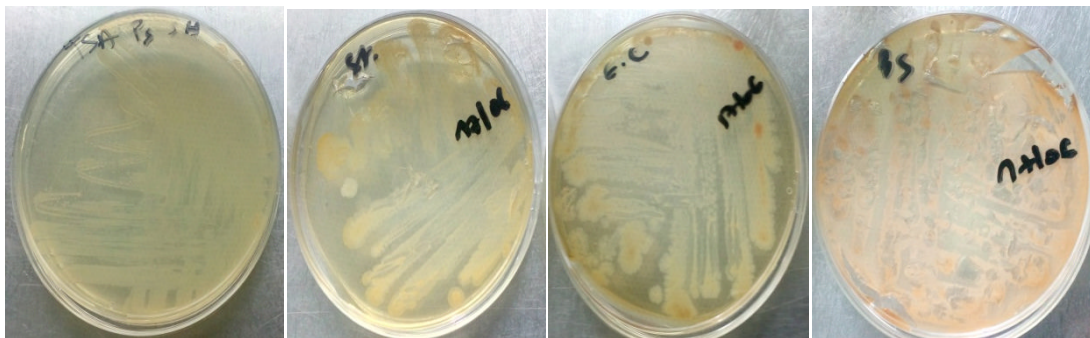


Figure 14 : Les colonies bactériennes pour la CMI

B.2. Caractéristique des milieux de cultures utilisés

1. Gélose Sabouraud-Base :

C'est un milieu recommandé pour l'isolement des champignons à partir des prélèvements cliniques.

Principe : La présence des peptones et du glucose favorise le développement des souches fongique.

Composition : Formule théorique en g/l d'eau purifiée

Peptones de viande « Bovin » 3g
 Peptones de caséine « Bovin » 3g
 Peptones de Soja 3g
 Extrait de levure 2g
 Extrait de malt 1g
 Glucose 19g
 Phosphate mono- potassique 0.5g
 Phosphate disodique 0.5g
 Agar 13 g

Préparation :

Mettre 65g de poudre en suspension dans un litre d'eau purifiée bien mélangé. Chauffer sous agitation et laisser bouillir pendant 1 minute.
 Autoclaver à 118 °C pendant 15 minutes.

2. Gélose Mueller-Hinton :

C'est un milieu destiné à la réalisation d'antibiogramme par diffusion

Principe :

Sa faible teneur en thymine-thymidine « élément inhibiteur de l'activité des sulfamides. » diminue les phénomènes de repousse autour des disques et permet une meilleure détermination des diamètres d'inhibitions.

Composition : Formule théorique en g/l d'eau purifiée :

Peptones de viande « Bovin » 10
Peptones de caséine « Bovin » 10
Fécule de pomme de terre « amidon » 10 ml
Glycérol 15.0g
Magnésium sulfate 1.5
Agar 18
Eau distillé qsp1L
PH=7,4

Préparation :

Mettre 46.4 g de poudre en suspension dans un litre d'eau purifiée contenant 10 g de glycérol, bien mélanger. Chauffer sous agitation et laisser bouillir pendant 1 minute. Autoclaver à 121 °C pendant 15 minutes.



Figure 15 : Les milieux de cultures Gélose Saburraux (SB) et Gélose Müller –Hinton (MH)

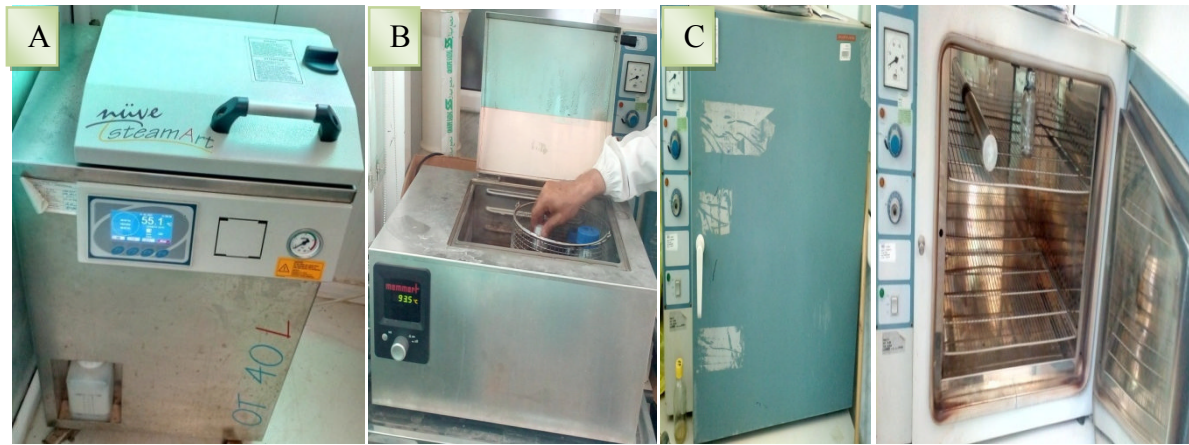


Figure 16 : A- Etuve B-Bain marie (liquéfié les milieux de cultures); C-Autoclave (stérilisé les verreries).

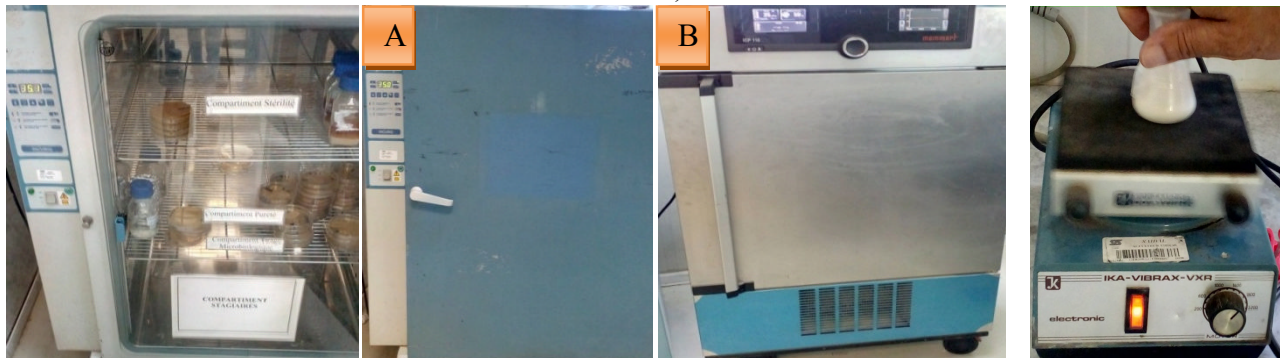


Figure 17 : Incubateur à 37°C/24hles bactéries (A) et à 30°C/48H levure(B). **Figure 18 :** Agitateur vortex

A photograph of a white Nigella flower in a field of green grass. The flower is the central focus, with its petals and stamens clearly visible. The background is a soft-focus green field.

Nigelle

**Références
bibliographiques**

Références Bibliographiques

- [1] **Sommer A.P., Forsterling H.D., Naber K.G., (2020).** Thymoquinone: shield and sword against SARS-CoV-2. The official Journal of CLINAM. **3(3):** 541-548. ISSN:2639-9431 (online).
- [2] Rapporté par Ibn Al Hamami et authentifié par Cheikh Albani dans la (Silsila Sahiha n°2873). Hadith traduit par Hadith du jour.
- [3] **Athamena S., Chalghem I., Kassah-Laouar A., Laroui S., Khebri S., (2010).** Activite antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. Lebanese Science Journal. **11:** 69-80.
- [4] **Saidi B., (2010).** La Graine de nigelle: remède sacré ou sacré remède? Habba Sawda. Paris: Ed.Iqra. Les Quatre Sources.
- [5] **Ghedira K., & Le Jeune R., (2010).** Huile de nigelle cultivée, *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae). *Phytothérapie.* **8(2):** 124-128.
- [6] **Ghedira K., (2006).** La nigelle cultivée : *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae). *phytothérapie.* **4:** 1-7.
- [7] **Mansour M.A., Ginawi O.T., El-Hadiyah T., EL Khatib A.S., Al-Shabana O.A., Al-Sawaf H.A., (2001).** Effects of volatile oil constituents of *Nigella sativa* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice : evidence for antioxidant effect of thymoquinone. Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol. **110:** 239-251.
- [8] **Aggarwal B.B., et Kunnumakkara A.B., (2009).** Molecular targets and therapeutic uses of spices: Modern uses for ancient medicine. World Scientific Publishing Co. DOI: **10:** 1142/7150.
- [9] **Moussaoui M., (2014).** La nigelle. Ed. Sabil.
- [10] **Dioscorides P., (2002).** *De materia medica.* (M. AUFMESSER, Trad.) Hildesheim: Olms-Weidmann.
- [11] **Ghedira K., (2006).** La Nigelle Cultivée : *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae). *Phytothérapie.* **5:** 220-226.
- [12] **El-Bernaoui O.,** La nigelle, *Nigella sativa* L. La culture des plantes médicinales, condimentaires et aromatique dans les régions Arides. Centre de recherche scientifique et technique sur les régions arides (C.R.S.T.R.A) – Biskra.
- [13] **Abdesselam B.E., (2015).** *Approche ethno-pharmacologique de Nigella sativa: de ses utilisations traditionnelles ancestrales aux études cliniques actuelles de ses principes actifs.* editeur inconnu.
- [14] **Bechegaoui L., & Zerzi F., (2019).** Contribution à l'étude des substances bioactives et de l'activité antioxydante des deux extraits des graines de *Nigella sativa*. *Thèse master* UNIVERSITE LARBI BEN M'HIDI OUM EL-BOUAGHI.
- [15] **Bonnier G., (1990).** La grande flore en couleur. Thèse de magister d'université : Belin, Paris. Tome 1. 17 p.
- [16] **Guignard J.L., (2001).** Botanique systématique moléculaire. 12^{ème} édition Masson (Paris), 304p.
- [17] **Lim., (2013).** *Nigella sativa* : T.K Lim (ed). Edible medicinal and Non-medicinal plants . Springer Dordrecht Heidelberg New York London .springer, fruit. **5:** pp.506-555.
- [18] **Mokkedem A., (2004).** Guide pratique des cultures en secs de quelques plantes médicinales, condimentaire et aromatiques. *INRAA. El-harrach.* pp : 10.

Références Bibliographiques

- [19] **Bousbia N., (2004).** Extraction et identification de quelque huile essentielles (nigelle, coriandre, origan, thym, romarin) : étude de leur activité antimicrobienne. Thèse de magister en science alimentaires, (INA), El harrah. 130 p.
- [20] **Benkaci A., (2007).** Etude de la composition chimique de la *nigelle sativa* originaire d'Algérie. Thèse de doctorat d'état en chimie organique appliquée, USTHB. 216 p.
- [21] **Özel, A., et al., 2009.** *Farklı Sıra Aralığı ve Tohumluk Miktarlarının Çörek Otunda (Nigella sativa L.) Verim ve Bazı Tarımsal Karakterlere Etkisi.* Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. **13(1):** pp. 17-25.
- [22] **Zahoor A., Ghafoor A., Aslam M., (2004).** *Nigella sativa*: A potential commodity in crop diversification traditionally used in healthcare. In introduction of medicinal herbs and spices as crops. *Ministry of Food, Agriculture and Livestock, Pakistan.* 5-31.
- [23] **Salem M.L., (2005).** Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. Seed. *International Immunopharmacology.* **5:** 1749-1770.
- [24] **Sultan M.T. (2009).** Nutritional profile of indigenous cultivar of black cumin seeds and antioxidant potential of its fixed and essential oil. *Pakistan Journal of Botany.* **41(3):** 1321-1330.
- [25] **Lautenbacher L.M., (1997).** Schwarzkümmelöl. *Dtsch Apoth Ztg.* **137:** 68-69.
- [26] **Aljassir M., (1992).** Chemical composition and microflora of black cumin (*Nigella sativa*) seeds growing in Saudi Arabia. *Food Chemistry.* **45:** pp. 239-242.
- [27] **Ansari A., Hassan S., Kenne L., Atta-U-Rahman., & Wehler J., (1988).** Structural studies on a saponin isolated from *Nigella sativa*. *Phytochemistry.* **27:** pp. 3977-3979.
- [28] **Babayan V., Kootungal D., & Halaby G., (1978).** Proximate analysis, Fatty acid and amino acid composition of *Nigella sativa* seeds. *Food Sciences.* **43:** 1314-1315.
- [29] **Hashim F., & El-Kiey M., (1982).** *Nigella sativa* seeds of Egypt. *J Pharm Sci UAR.* **3:** 121-133.
- [30] **Rathee P., Mishra S., & Kaushal R., (1982).** Antimicrobial activity of essential oil, fixed oil and unsaponifiable matter of *Nigella sativa*. *Indian J Pharm Sci.* **44:** 8-10.
- [31] **Maarouf A., (2000).** Dictionnaire botanique. pp 129.
- [32] **Macheix J.J., Flieriet A., et Christian A., (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaire d'importance économique. PPTUR Lausanne.
- [33] **Hanhineva K., Törrönen R., Bondia-Pons I., Pekkinen J., Kolehmainen M., Mykkänen H., et Poutanen H., (2010).** Impact of Dietary Polyphenols on Carbohydrate Metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* **11:** 1365-1402.
- [34] **Canonica L., Jommi G., Scolastico C., & Bonati A. (1963).** The pharmacologically active principle in *Nigella sativa*. *Gazzetta chimica italiana.* **93:** 1404-1407.
- [35] **Pak J., (2011).** *Nigella sativa*: the miraculous herb. *Biochem.* **44:** 44-48.
- [36] **Kremers E., Wakeman N., & Hixon R., (1941).** *Thymoquinone.* *Organic Syntheses.* **1:**
- [37] **Greenish H., (1880).** Contribution to the Chemistry of *Nigella sativa*. *Pharmacol J Trans.* **10:**
- [38] **Bruneton J., (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 2^{ème} edit. Technique et Documentation. Lavoisier, Paris. pp : 784- 958.
- [39] **Merfort I., Wray V., Barakat H., Hussein S.A.M., Nawwar M.A.M., Willuhn G., (1997).** Flavonol triglycosides from seeds of *Nigella sativa*. *Phytochemistry.* **46:** 359-363.

Références Bibliographiques

- [40] **Zenk M.H., et Juenger M., (2007).** Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compound. *Phytochemistry Review*. **68**: 2757 – 2772.
- [41] **Atta-ur-Rahman., Malik S., Cun-Heng H., et Clardy J., (1985).** Isolation and structural determination of nigellidine, a novel alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Tetrahedron Lett.* **26**: pp. 2759-2762.
- [42] **Atta-Ur-Rahman, M., Hassan S., Coudhary M., N.I., C., & CLARDY J., (1995).** Nigellidine: a new indazole alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Tetrahedron letters*. **36**: pp. 1993-1996.
- [43] **Atta U.R, Malik. S, Zaman. K., (1992).** Nigellimine, a new isoquinoline from the seeds of *Nigella sativa*. *Journal of natural products*. **55**: pp. 676-678.
- [44] **Morikawa T., Xu F., Ninomiya K., Matsuda H., Yoshikawa M., (2004).** Nigellamines A3, A4, A5 and C, new dolabellane-type diterpene alkaloids, with lipid metabolism promoting activities from the Egyptian medicinal food black cumin. *Chemical & pharmaceutical bulletin*. **52**: pp. 494-497.
- [45] **Paige. K.N, Whitham.T.G. (1985).** Individual and population shifts in flower color by scarlet gila : a mechanism for pollinator tracking. *Science*. **227**: pp. 315-317.
- [46] **Harborne, J.B., (1988).** *Introduction to ecological biochemistry*. Academic Press, London.
- [47] **Sévenet T., (1994).** Plantes, molécules et médicaments. *CNRS Édition, Paris*.
- [48] **Bryant J.P, Reichardt P.B, Clausen T.P, Provenza F.D, Kuropat P.J., (1992).** Woody Plant-Mammal Interactions. In Rosenthal, G.A., Berenbaum, M.R. (Eds), *Herbivores : their interactions with secondary plant metabolites*, 2E, volume 2. *Ecological and Evolutionary Processes*, New York Academic Press.
- [49] **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.
- [50] **El-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. *Journal of ethnopharmacology*. **81** (2): 161-164.
- [51] **Shuid, A. N., Mohamed, N., Mohamed, I. N., Othman, F., Suhaimi, F., MohdRamli, E.S. Soelaiman, I. N., (2012).** *Nigella sativa*: A potential antiosteoporotic agent. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- [52] **Houghton P., Zarka R., DE Las Heras B., & Hout J., (1995).** Fixed oil of *Nigella sativa* and eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation derived thymoquinone inhibit. *Planta medica*. **61**: 33-36.
- [53] **Yaman, I., Durmus, A., Ceribasi, S., & Yaman, M., (2010).** Effects of *Nigella sativa* and silver sulfadiazine on burn wound healing in rats. *Veterinari Medicina*. **55** (12): 619-624.
- [54] **Chakravarty N., (1993).** Inhibition of histamine release from mast cells by nigellone. *Annals of Allergy*. **70**(3): pp. 237-242.
- [55] **Aboul Ela M., El-Shaer, N., & Ghanem, N., (1996).** Antimicrobial evaluation and chromatographic analysis of some essential and fixed oils. *Die Pharmazie*. **51**(12): pp. 993-994.
- [56] **Degryse A., Delplala I., et Voinier M., (2008).** Risque et bénéfices possibles Huiles essentielles. *École des hautes études en santé publique*, P. 2-44.

Références Bibliographiques

- [57] **Burits M., & Bucar F., (2000).** Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapyresearch*. **14**(5): 323-328.
- [58] **Ali B., & Blunden G., (2003).** Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytotherapy Research: An international journal devoted to pharmacological and toxicological evaluation of natural product derivatives*. **17**(4): 299-305.
- [59] **Noctor G., Foyer CH., (1998).** Ascorbate and glutathion : keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **49**: 249-279.
- [60] **Stadtman E.R., (1993).** Oxydation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu. Rev. Biochem.* **62**:797-821.
- [61] **Willcox I. K., Ash S. L., Catignani G. L., (2004).** Antioxidants and prevention of chronic disease. *CrU RevFood Sei Nutr.* **44**: 275-295.
- [62] **El-Dakhakhny M., et al., (2000).** Effect of *Nigella sativa* oil on gastric secretion and ethanol induced ulcer in rats. *J Ethnopharmacol.* **72** (1/2): pp. 299-304.
- [63] **Reiter M., & Brandt W., (1985).** Relaxant effects on tracheal and ileal smooth muscles of the guinea pig. *Arzneimittel Forschung.* **35** (1A): pp. 408-414.
- [64] **Akhtar M., & Aslam M., (1997).** Anticestodal principles of *Nigella sativa* Linn. (Kolanji) seeds. *Pak J Pharmacol.* **14**(2): pp. 7-14.
- [65] **Aggarwal R., Kharya M., & Shrivastava R., (1979).** Antimicrobial and anthelmintic activities of the essential oil of *Nigella sativa* Linn. *Indian J Exp Biol.* **17**(11): pp. 1264-1265.
- [66] **Akhtar M., & Riffat S., (1991).** Field trial of *Saussurea lappa* roots against nematodes and *Nigella sativa* seeds against cestodes in children. *J Pak Med Assoc.* **41**(8): pp. 185-187.
- [67] **Meziti A., (2009).** Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativ*. Mémoire Pour l'obtention du Diplôme de magister en biochimie appliquée. Université El-Haj Lekhder (Batna), p. 21-32.
- [68] **Ramadhan., (2021).**
- [69] **Ulasli M., Gurses S.A., Bayraktar R., Yumrutas O., Oztuzcu S., Igci M., Igci Y.Z., Cakmak E.A., Arslan 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. *Mol Biol Rep.* **41**(3):1703-11.
- [70] **Badary O., (1999).** Thymoquinone attenuates ifosfamide-induced Fanconi syndrome in rats and enhances its antitumor activity in mice. *J Ethnopharmacol.* **67**: 135-142.
- [71] **Salomi M., Nair S., & Panikkar K., (1991).** Inhibitory effects of *Nigella sativa* and saffron (*Crocus sativus*) on chemical carcinogenesis in mice. *Nutr Cancer.* **16**: pp. 67-72.
- [72] **El-Dakhakhny M., et al., (2000).** Effect of *Nigella sativa* oil on gastric secretion and ethanol induced ulcer in rats. *J Ethnopharmacol.* **72**(1/2): pp. 299-304.
- [73] **Kachetel L., Sahmi A., (2016).** Étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle extraite des fruits de *Coriandrum sativum* L. Université UMMTO.
- [74] **Rota M.C., Herrera A., Martinez R.M., Sotomayor J.A., Jordan M.J., (2008).** Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hymnals* essential oils- *Food control*, **19**: 681-687.
- [75] **OMS., (2008).** standarisation de l'antibiogramme à l'échelle national selon les recommandations de l'OMS. 5^{ème} édition.

Références Bibliographiques

- [76] **Dzomba P., et Muchanyreyi N., (2012).** Potential antimicrobial plants extract based therapeutic from temnocalyxobovatus roots. *European Journal of Medicinal Plants.* **2(3):** 209-215.
- [77] **Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C., (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebenson Wiss Technol-Food science and Technology.* **28:** 25-30.
- [78] **Sohal R.S., Mockett R.J., Orr W.C., (2002).** Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis, *Free Rad. Biol. Med.* **33(5):** 575p.
- [79] **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.
- [80] **Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M., (2001).** Antioxydants in food, Practical applications.
- [81] **Kacem R., et Meraihi Z., (2006).**-Effects of essential oil extracted from *Nigella Sativa L* seeds and it main components on human neutrophil elastase Activity. Departement of biologicalsciences, Faculty of sciences, Ferhat Abbas University, 79000 Stif,Algeria, and Departement of Biological sciences faculty of sciences university of Mensouri 25000 Constantine, Algeria, P. 2-3.
- [82] **Mutaii C., Bii C., Vagias C., Abatis D., Roussi V., (2009).** Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupine triterpenes. *Journal of ethno pharmacology*, doi: 10.1016/j.jep.02.007.
- [83] **Ali-Shtayeh M.S., Reem M.R.Y., Faidi Y.R., Khalid S. and AlNuri M.A., (1998).** Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *J. Ethnopharmacol.* **60:** 265-271.
- [84] **Yakhlef G., Laroui S., Hambaba L., Aberkane M.-C., Ayachi A., (2011).** Évaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* et de *Laurus nobilis*, plantes utilisées en médecine traditionnelle. *Phytothérapie.* **9:** 209-218.
- [85] **Afnor., (2000).** Association Française de Normalisation, Recueil de normes Française Huiles essentielles ». AFNOR, Paris. AFNOR NF T 75-006.
- [86] **Bekhechi, C., Atik-Bekkara, F., Abdelouahid, D.E., (2008).** Composition et activité des huiles essentielles d'*Organum glandulos* d'Algérie-Phytothérapie. **6:** 153-159.
- [87] **Majhenic L., Kerget M.S., et Knez Z., (2007).** Antioxydant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food chemistry.* **104:** 1258-1268.
- [88]
- [89] **Evans W. J., (2000).** Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am J Clin Nutr.* **72:** 647S-652S.
- [90] **Fauchère J.L., et Avril J.L., (2002).** Bactériologie générale et médicale. Elle ipses édition Marketing, ISBN: 2-7298-0747-0.
- [91] Centre national de la recherche scientifique [CNRS], (2011).
- [92] **Auciel et Vildé., (2005).**
- [93] **Delarras C., (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Lavoisier, ISBN: 2-7430.476p.

Références Bibliographiques

- [94] Singh G., Marimuthu P., de Heluani C. S., Catalan C. (2005). Chemical constituents and antimicrobial and antioxidant potentials of essential oil and acetone extract of *Nigella sativa* seeds. *J Sci Food Agric.* **85**: 2297–2306.
- [95] Michiko M.N., Peter Z., (1998). ANAEROBIC GROWTH OF “STRICT AEROBE“ (BACILLUS SUBTILIS). *Annual Review of Microbiology.* **52**: 165-190.
- [96] Tony H., Paul S., (1997). Atlas de poche de microbiologie. 1^{ère} éd Flammarion médecines sciences-75006, Paris : 117-240.
- [97] Chakou M., & Bassou K., (2005). Efficacités antibactériennes et antifongique des huiles essentielles obtenues par l'extraction de la menthe verte : *Mentha spicata* Lissue de la région de Ouargla sur quelque germe pathogènes : *E.coli*, *Psudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Candida albicans*. *Memoire de des microbiologie*, Université de Kasdi Merbah Ouargla : 27p.

Résumé

L'objectif de cette étude est d'évaluer *in vitro* quelques activités biologiques telles que : activités anti-inflammatoire, antimicrobienne, antifongique et antioxydante des huiles fixe et essentielle des graines de *Nigella sativa L.* appartenant à la famille des Renonculacée. Les tests phytochimiques réalisés sur des graines de *Nigella sativa* a révélé la présence de molécules biologiquement actives telles que : alcaloïdes, phénols, tannins, composés azotés et saponosides. Parallèlement, une comparaison du taux de réduction de l'œdème des pattes, suite à une inflammation, montre que la plante étudié possède non seulement un pouvoir anti-inflammatoire mais celui-ci est proche que celui d'un produit déjà existant sur le marché. Une étude biologique a été effectuée sur 04 souches bactériennes et 02 souches fongiques, toutes de la collection ATCC du centre de recherche et développement du Groupe Sidal (CRD / SAIDAL). Les résultats obtenus ont montré qu'il y'a une extrême activité vis à vis des souches Gr +. Le pourcentage d'inhibition du radical libre de l'huile végétal est proche de celui de la vitamine C avec des IC₅₀ de l'ordre de 1,282 mg/ml pour l'huile de *Nigella sativa L.* et 1,276 mg/ml pour le Vitamine C, indiquant que la plante étudiée, *Nigella sativa L.* a un très fort pouvoir réducteur du radical DPPH et une remarquable activité antioxydante.

Mots clés : *Nigella sativa L.*, activité biologique, huile fixe, huile essentielle, évaluation.

Abstract

The objective of this study is to evaluate *in vitro* some biological activities such as: anti-inflammatory, antimicrobial, antifungal and antioxidant activities of the fixed and essential oils of the seeds of *Nigella sativa L.*, belonging to the Ranunculaceae family. Phytochemical tests performed on *Nigella sativa* seeds revealed the presence of biologically active molecules Viz. alkaloids, phenols, tannins, nitrogen compounds and saponosides. At the same time, a comparison of the reduction rate of edema of the legs, following inflammation, shows that the plant studied not only has anti-inflammatory power, but it is close to that of a product already on the market. A biological study is carried out on 04 bacterial strains and 02 fungal strains all from the ATCC collection of the Sidal Group research and development center (CRD / SAIDAL). The results obtained showed that there is an extreme activity against the Gr+ strains. In addition, the percentage of inhibition of the free radical for vegetable oil is close to vitamin C with IC₅₀ nearly 1.282 mg/ml for the oil of *Nigella sativa L.* and 1.276 mg/ml for Vitamin C, which indicate that the studied plant, *Nigella sativa L.* has a very strong reducing power of the DPPH radical and a remarkable antioxidant activity.

Keywords : *Nigella sativa L.*, biological activities, fixed oil, essential oil, evaluation.