



République Algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS-MOSTAGANEM
FACULTES DES SCIENCES EXACTES ET DE L'INFORMATIQUE
DEPARTEMENT DE CHIMIE

THESE

Doctorat en sciences

Spécialité : Chimie

Présenté par

Abdelkader BENHELIMA

**ETUDE CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DES SUBSTANCES NATURELLES
EXTRAITES PAR PHYTOCHIMIE ET LEURS EFFETS SUR LES GERMES
ET CRISTAUX OXALO-CALCIQUES**

Soutenu le : 09-02-2017

Les membres de jury :

Pr. Rabah CHADLI	U. Mostaganem	Président
Dr. Aouatef DRIOUCH	U. Mostaganem	Examinatrice
Dr. Nouredine GHALI	U. Saida	Examineur
Pr. Houria MERINE	U. Sidi Bel abbes	Examinatrice
Pr. Zohra KAID-OMAR	U. Sidi Bel abbes	Encadreur
Pr. Fawzi TALEB	U. Mostaganem	Co-Encadreur



Ce travail a été réalisé au laboratoire S.T.E.V.A de l'Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, Institut vétérinaire de l'Université Ibn Khaldoun Tiaret et Laboratoire vétérinaire régional Mostaganem L.V.R.M.

Je tiens à exprimer mes remerciements à toutes les personnes qui ont participé, à titre professionnel et personnel à la réalisation de cette thèse.

*Je tiens à exprimer toutes mes reconnaissances à Madame **Zohra KAID-OMAR**, professeur à l'université de Sidi bel abbes et Directrice de cette thèse, pour sa générosité, sa gentillesse, son encouragement, son soutien et de m'avoir fait confiance tout au long de la préparation de ce travail. Votre culture scientifique, vos compétences professionnelles incontestables, vos qualités humaines, la sympathie ainsi que l'intérêt que vous portez à vos étudiants vous valent l'admiration et le respect et font de vous l'exemple parfait à suivre. Veuillez, Madame la professeur, trouvé dans ce modeste travail l'expression de notre haute considération, notre reconnaissance et notre profond respect.*

*A Monsieur le Professeur **Ahmed ADDOU** pour m'avoir accueilli dans son laboratoire **S.T.E.V.A** et pour toute son aide et ses conseils. Je remercie ainsi tous les membres et techniciens de ce labo.*

*Un grand merci à Monsieur **Rabah CHADLI**, professeur à l'université de Mostaganem, pour l'honneur qu'il ma fait en acceptant de présider ce Jury.*

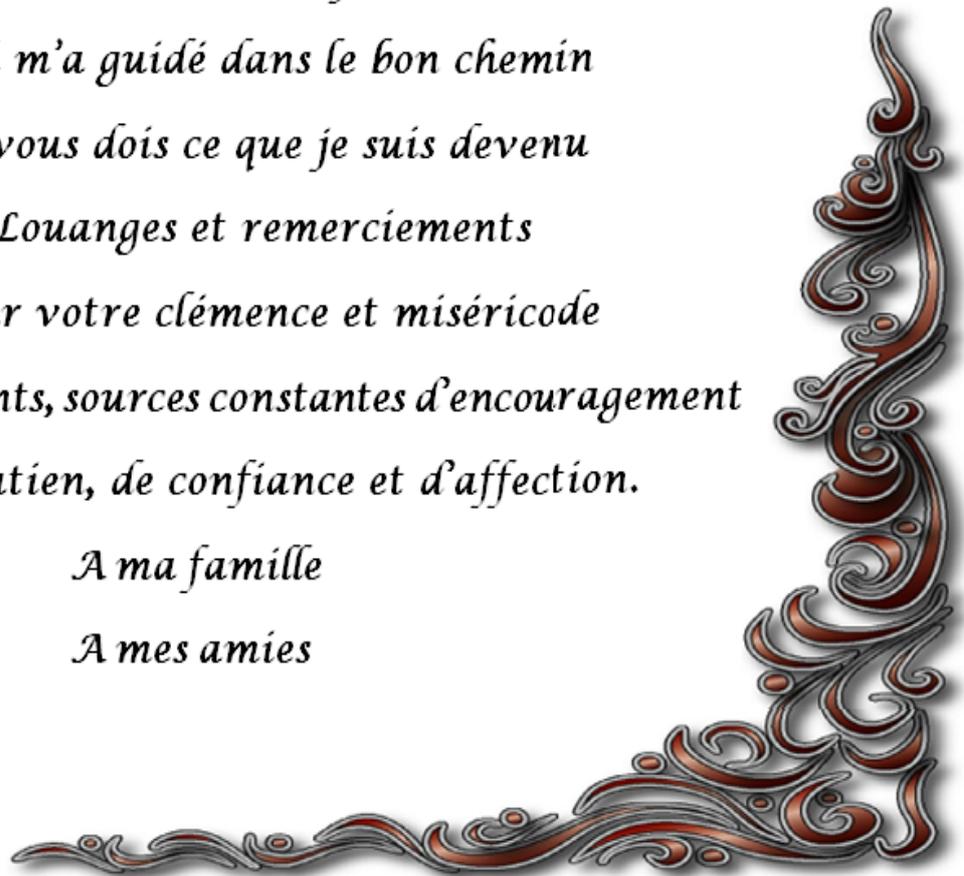
*Mes remerciements les plus vifs et ma profonde gratitude sont adressés aux; Madame **Aouatef DRIOUCH**, docteur à l'université de Mostaganem, Monsieur **Noureddine GHALI**, docteur à l'université de Saïda et Madame **Houria MERINE**, Professeur à l'université de Sidi bel abbes, pour avoir acceptés d'être membres de ce jury.*

*Un remerciement particulier va aux Messieurs **Djamel ait saada** et **Noureddine GHALI**, pour leurs aide qu'ils n'hésitèrent jamais à me proposer dans les moments difficiles. Je les remercie pour cette bienveillance et ces conseils.*

Je suis très reconnaissante envers toute personne, qui ma aider à réaliser ce travail et je témoigne toute mon amitié.



*Au Bon Dieu
Le Tout Puissant
Qui m'a inspiré
Qui m'a guidé dans le bon chemin
Je vous dois ce que je suis devenu
Louanges et remerciements
Pour votre clémence et miséricorde
A mes parents, sources constantes d'encouragement
de soutien, de confiance et d'affection.
A ma famille
A mes amies*



Abréviations et symboles

mm: millimètre

mg: milligramme

µg: microgramme

kg: kilogramme

g: gramme

mol: mole

LDL: lipoprotéines de basse densité (mauvais cholestérol – cholestérol athérogène)

HDL: lipoprotéines de haute densité

IFN-γ: interféron de type II

CD4⁺: lymphocyte T auxiliaire

cm: centimètre

l: litre

H⁺: hydrogène ion

K⁺: potassium ion

Na⁺: sodium ion

ATP: Adénosine Triphosphate

mOsm: milliosmole

pH: potentiel d'hydrogène

HCO₃⁻: bicarbonate

K_{ps}: constante de solubilité de produit

mmol: millimole

°C: degré Celsius

ml: millilitre

dl: décilitre

mn: minute

ONAB: office national d'aliment des bétails

U.V: ultra violée

DO: densité optique

DMSO: diméthyle sulfoxyde

µl: microlitre

CFU: colonie forming unité
ATCC: American Type Culture Collection
h: heure
H₂O: Dihydroxyde
H₂S: Dihydrogène sulfure
J-C.: Jésus-Christ
HCl: Chlorure d'hydrogène
N: Normalité
NADH: Nicotinamide adénine dinucléotide hydrogène
NAD: Nicotinamide adénine dinucléotide
BUN: Blood urea nitrogen
CI₅₀: Concentration inhibitrice 50%
API_{20E}: profil Analytique index 20 entérobactéries
API_{Staph}: profil Analytique index staphylocoque
APICandida: profil Analytique index candida
MH: Muller Hinton
EC₅₀: concentration inhibitrice 50% d'échantillon
NSGH: huile essentielle des graines de *Nigella sativa* L
APR: pouvoir antiradicalaire
SD: Standard déviation
pc: poids corporelle
PAM: phospho-ammoniac-magnésien
PM: poids moléculaire
Da: dalton
ATPase : adénosine tri-phosphatase (enzyme)
OMS: organisation mondiale de santé
nm: nanomètre
MH: muller hinton
DO: Densité optique
H & E: Hématoxyline et Eosine

Liste des figures

Figure 1:	<i>Graine de Nigelle cultivée.....</i>	7
Figure 2:	<i>Représentations schématique la plante entière et ses annexes.....</i>	12
Figure 3:	<i>Diagramme floral Nigella.....</i>	13
Figure 4:	<i>Nigella sativa L.....</i>	15
Figure 5:	<i>Représentation chimique de la thymoquinone et de ses dérivés retrouvés dans l'huile essentielle de Nigella sativa L.....</i>	18
Figure 6:	<i>Structure chimique des principaux alcaloïdes de Nigella sativa L.....</i>	20
Figure 7:	<i>Panch phoron.....</i>	23
Figure 8:	<i>Ras el hanout.....</i>	23
Figure 9:	<i>Usages traditionnels de Nigella sativa L.....</i>	24
Figure 10:	<i>Camellia sinensis L.....</i>	31
Figure 11:	<i>Classification des feuilles de thé.....</i>	32
Figure 12:	<i>Principales étapes du traitement des feuilles de théier après récolte.....</i>	33
Figure 13:	<i>Erica multiflora L.....</i>	36
Figure 14:	<i>Les étapes de la lithogénèse.....</i>	52
Figure 15:	<i>Promoteurs, substances cristallisables et espèces cristallines.....</i>	53
Figure 16:	<i>Interactions entre cristaux, inhibiteurs et épithélium tubulaire.....</i>	54
Figure 17:	<i>Exemples de quelques types morphologiques de calculs urinaires.....</i>	58
Figure 18:	<i>Carte géographique montrant les stations de récolte.....</i>	77
Figure 19:	<i>Montage d'hydrodistillation employé pour l'extraction de l'huile essentielle.....</i>	78
Figure 20:	<i>Extraction par décoction de la poudre des différentes parties étudiées.....</i>	79
Figure 21:	<i>Extraction par macération de la poudre des différentes parties étudiées.....</i>	79
Figure 22:	<i>Extraction par digestion de la poudre des différentes parties étudiées.....</i>	80
Figure 23:	<i>Extraction par infusion de la poudre des différentes parties étudiées.....</i>	80
Figure 24:	<i>Extraction par solvants à polarité croissante de la poudre des différentes parties étudiées.....</i>	81
Figure 25:	<i>Forme libre et réduite du DPPH.....</i>	92
Figure 26:	<i>Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI.....</i>	99
Figure 27:	<i>Rendement en huile essentielle.....</i>	105
Figure 28:	<i>Densité d'huile essentielle.....</i>	105

Figure 29:	<i>Chromatogramme HPTLC d'huile essentielle des graines de Nigella sativa L.</i>	107
Figure 30.a:	<i>parenchyme renal normal chez RTN (H&E x40).</i>	115
Figure 30.b:	<i>Tubules entourés par infiltration inflammatoire principalement de lymphocytes (flèche noir); (H&E x40).</i>	115
Figure 30.c:	<i>Rétablissement de parenchyme renal chez les rats traités avec cystone; (H&Ex40).</i>	116
Figure 30.d:	<i>Domages des tubules rénaux et du système collecteur (flèche bleu) chez RLT; (H&E x40).</i>	115
Figure 30.e:	<i>Histologie renal normal avec un glomérule normal et un léger œdème des cellules tubulaires chez les rats traités avec l'huile de Nigella Sativa; (H&Ex40).</i>	116
Figure 30.f:	<i>Epithelium aplati avec dégénération vacuolaire focale; (H&Ex10).</i>	115
Figure 31:	<i>Pouvoir antioxydant d'acide ascorbique</i>	116
Figure 32:	<i>EC₅₀ d'extrait d'Erica multiflora L.</i>	117
Figure 33:	<i>EC₅₀ d'extrait standard (Acide ascorbique), Camellia sinensis L et l'huile essentielle de Nigella sativa L.</i>	117
Figure 34:	<i>(Api 20 E) Caractères biochimiques des bactéries étudient Gram négatif...</i>	120
Figure 35:	<i>(Api Staph) Caractères biochimiques de la bactérie étudiée Gram positif...</i>	121
Figure 36:	<i>(Api Candida) Caractères biochimiques de la levure étudiée</i>	123
Figure 37:	<i>Diamètre de zone d'inhibition en fonction des antibiotiques sur la croissance d'E. coli.</i>	124
Figure 38:	<i>Photo d'activité des antibiotiques sur la croissance d'E. coli ATCC 25922</i>	124
Figure 39:	<i>Photo d'activité des antibiotiques sur la croissance d'E. coli clinique</i>	125
Figure 40:	<i>Diamètre de zone d'inhibition en fonction des antibiotiques sur la croissance de Proteus mirabilis</i>	125
Figure 41:	<i>Photo d'activité des antibiotiques sur la croissance de Proteus mirabilis ATCC 7002</i>	126
Figure 42:	<i>Photo d'activité des antibiotiques sur la croissance de Proteus mirabilis clinique</i>	126
Figure 43:	<i>Diamètre de zone d'inhibition en fonction des antibiotiques sur la</i>	

	<i>croissance de Klebsiella pneumoniae</i>	126
Figure 44:	<i>Photo d'activité des antibiotiques sur la croissance de Klebsiella pneumoniae ATCC 27736</i>	127
Figure 45:	<i>Photo d'activité des antibiotiques sur la croissance de Klebsiella pneumoniae clinique</i>	127
Figure 46:	<i>Diamètre de zone d'inhibition en fonction des antibiotiques sur la croissance de Pseudomonas aerogenosa</i>	128
Figure 47:	<i>Photo d'activité des antibiotiques sur la croissance de Pseudomonas aerogenosa ATCC 27853</i>	128
Figure 48:	<i>Photo d'activité des antibiotiques sur la croissance de Pseudomonas aerogenosa clinique</i>	128
Figure 49:	<i>Diamètre de zone d'inhibition en fonction des antibiotiques sur la croissance de Staphylococcus aureus</i>	129
Figure 50:	<i>Photo d'activité des antibiotiques sur la croissance de Staphylococcus aureus clinique</i>	129
Figure 51:	<i>Diamètre de zone d'inhibition en fonction de l'antifongique sur la croissance de Candida albicans</i>	130
Figure 52:	<i>Diamètre de zone d'inhibition en fonction des extraits de Camellia sinensis L sur la croissance d'E. coli</i>	132
Figure 53:	<i>Diamètre de zone d'inhibition en fonction des extraits de Camellia sinensis L sur la croissance de Proteus mirabilis</i>	133
Figure 54:	<i>Diamètre de zone d'inhibition en fonction des extraits de Camellia sinensis L sur la croissance de Klebsiella pneumoniae</i>	133
Figure 55:	<i>Diamètre de zone d'inhibition en fonction des extraits de Camellia sinensis L sur la croissance de Pseudomonas aerogenosa</i>	134
Figure 56:	<i>Diamètre de zone d'inhibition en fonction des extraits de Camellia sinensis L sur la croissance de Staphylococcus aureus</i>	135
Figure 57:	<i>Diamètre de zone d'inhibition en fonction des extraits de Camellia sinensis L sur la croissance de Candida albicans</i>	136
Figure 58:	<i>Diamètre de zone d'inhibition en fonction des extraits d'Erica multiflora L sur la croissance d'E. coli</i>	137
Figure 59:	<i>Diamètre de zone d'inhibition en fonction des extraits d'Erica multiflora L sur la croissance de Proteus mirabilis</i>	138

Figure 60:	<i>Diamètre de zone d'inhibition en fonction des extraits d'Erica multiflora</i>	
	<i>L sur la croissance de Klebsiella pneumoniae.....</i>	139
Figure 61:	<i>Diamètre de zone d'inhibition en fonction des extraits d'Erica multiflora</i>	
	<i>L sur la croissance de Pseudomonas aerogenosa.....</i>	140
Figure 62:	<i>Diamètre de zone d'inhibition en fonction des extraits d'Erica multiflora</i>	
	<i>L sur la croissance de Staphylococcus aureus.....</i>	141
Figure 63:	<i>Diamètre de zone d'inhibition en fonction des extraits d'Erica multiflora</i>	
	<i>L sur la croissance de Candida albicans.....</i>	142

Liste des tableaux

Tableau 1:	Différentes espèces et variétés de <i>Nigella</i> L. et leur distribution géographique.....	13
Tableau 2:	Composition des graines de <i>Nigella sativa</i> L.....	16
Tableau 3:	Composition (en pourcentage) des graines <i>Nigella sativa</i> en acides gras selon l'origine de l'échantillon par ordre décroissant.....	17
Tableau 4:	Principaux composés et molécules isolés de <i>Nigella sativa</i> L.....	21
Tableau 5:	Liste des produits à base de Nigelle vendus en France.....	28
Tableau 6:	Cycle naturel du théier.....	32
Tableau 7:	Composition chimique de la feuille de thé, exprimée en pourcentage par rapport au poids sec de la drogue.....	34
Tableau 8:	Concentration totale en éléments minéraux des feuilles de thés verts (TV), thés noirs (TN) et thés Oolong (TO).....	35
Tableau 9:	Composition de la feuille de thé en vitamines du groupe B.....	36
Tableau 10:	Répartition des calculs urinaires selon le composant lithiasique majoritaire.....	50
Tableau 11:	La fréquence des composés lithiasiques dans le noyau définissant l'étiologie.....	51
Tableau 12:	Principaux inhibiteurs urinaires de la cristallisation des sels calciques....	55
Tableau 13:	Situation géographique des stations de récolte.....	76
Tableau 14:	Organes végétaux destinés à l'extraction.....	76
Tableau 15:	Composition de l'aliment des rats.....	84
Tableau 16:	Concentrations testées dans le test DPPH.....	93
Tableau 17:	Source des souches concernées par les tests.....	95
Tableau 18:	Résultats des tests phytochimiques.....	106
Tableau 19:	Caractéristiques chimiques (matière sèche) des graines de <i>Nigella sativa</i> L (mg/g).....	107
Tableau 20:	Variation du poids corporel chez les rats normaux lithiasiques soumis à un gavage intra-gastrique quotidien de 5 ml/kg p.c d'huile essentielle de <i>Nigella sativa</i> L durant 28 jours.....	108
Tableau 21:	Variation du volume urinaire chez les rats normaux lithiasiques soumis à un gavage intra-gastrique quotidien de 5 ml/kg p.c de l'huile	

	essentielle de <i>Nigella sativa</i> L durant 28 jours.....	109
Tableau 22:	L'effet d'huile des graines de <i>Nigella sativa</i> L sur le taux urinaire d'Oxalate, Phosphate, Calcium, Acide urique et Magnesium chez les rats sujets de test (mg/24 h).....	112
Tableau 23:	L'effet d'huile des graines de <i>Nigella sativa</i> L sur le taux des paramètres sériques de Créatinine, Acide urique et Urée sérique (BUN) chez les rats sujets de test (mg/dl).....	114
Tableau 24:	Effet d'huile de <i>Nigella Sativa</i> L sur les paramètres biochimiques rénaux chez les rats normaux et lithiasiques (mg/g).....	114
Tableau 25:	EC ₅₀ et puissance antioxydante (ARP) de <i>Nigella sativa</i> L, <i>Camellia sinensis</i> L, <i>Erica multiflora</i> L et l'extrait standard (Acide ascorbique)....	117
Tableau 26:	Caractères biochimiques (Api 20E) des bactéries étudiées Gram négatif..	119
Tableau 27:	Caractères biochimiques de bactérie étudiée Gram positif.....	122
Tableau 28:	Caractères biochimiques de la levure étudiée.....	123
Tableau 29:	Résultat d'activité antimicrobienne en mm d'huile essentielle de <i>Nigella sativa</i> L.....	131
Tableau 30:	Résultats de la Concentration Minimal Inhibitrice CMI en (mg/ml) d'huile essentielle de <i>Nigella sativa</i> L relatives aux différentes souches microbiennes étudiées.....	142
Tableau 31:	La Concentration Minimal Inhibitrice CMI en (mg/ml) des extraits de <i>Camellia sinensis</i> L relatives aux souches de <i>E. coli</i> ; cliniques et référence ATCC 25922.....	143
Tableau 32:	La Concentration Minimal Inhibitrice CMI en (mg/ml) des extraits de <i>Camellia sinensis</i> L relatives aux souches de <i>Proteus mirabilis</i> ; cliniques et référence ATCC 7002.....	144
Tableau 33:	La Concentration Minimal Inhibitrice CMI en (mg/ml) des extraits de <i>Camellia sinensis</i> L relatives aux souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; cliniques et référence ATCC 27736.....	145
Tableau 34:	La Concentration Minimal Inhibitrice CMI en (mg/ml) des extraits de <i>Camellia sinensis</i> L relatives aux souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; cliniques et référence ATCC 27853.....	146
Tableau 35:	La Concentration Minimal Inhibitrice CMI en (mg/ml) des extraits de <i>Camellia sinensis</i> L relatives aux souches de <i>Staphylococcus aureus</i> ;	

	cliniques et référence ATCC 33862.....	147
Tableau 36:	La Concentration Minimal Inhibitrice CMI en (mg/ml) des extraits de <i>Camellia sinensis</i> L relatives aux souches de <i>Candida albicans</i> ; cliniques et référence ATCC 10231.....	148
Tableau 37:	La Concentration Minimal Inhibitrice CMI en (mg/ml) des extraits d' <i>Erica multiflora</i> L relatives aux souches de <i>E. coli</i> ; cliniques et référence ATCC 25922.....	149
Tableau 38:	La Concentration Minimal Inhibitrice CMI en (mg/ml) des extraits d' <i>Erica multiflora</i> L relatives aux souches de <i>Proteus mirabilis</i> ; cliniques et référence ATCC 7002.....	150
Tableau 39:	La Concentration Minimal Inhibitrice CMI en (mg/ml) des extraits d' <i>Erica multiflora</i> L relatives aux souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; cliniques et référence ATCC 27736.....	151
Tableau 40:	La Concentration Minimal Inhibitrice CMI en (mg/ml) des extraits d' <i>Erica multiflora</i> L relatives aux souches de <i>Pseudomonas aerogenosa</i> ; cliniques et référence ATCC 27853.....	152
Tableau 41:	La Concentration Minimal Inhibitrice CMI en (mg/ml) des extraits d' <i>Erica multiflora</i> L relatives aux souches de <i>Staphylococcus aureus</i> ; cliniques et référence ATCC 33862.....	153
Tableau 42:	La Concentration Minimal Inhibitrice CMI en (mg/ml) des extraits d' <i>Erica multiflora</i> L relatives aux souches de <i>Candida albicans</i> ; cliniques et référence ATCC 10231.....	154

Résumé

La lithiase urinaire est une maladie très fréquente dans le monde entier. Elle est traitée par différentes moyens médicamenteuses et chirurgicales coûteuses, qui peuvent causer des effets secondaires graves. Pour se guérir, les lithiasiques se font recours à la médecine traditionnelle. Le présent travail a pour objectif, la valorisation de quelques plantes médicinales de la flore locale utilisée dans la médecine traditionnelle algérienne comme antilithiasiques et antimicrobiennes.

Dans un premier temps, les analyses phytochimiques sur *Nigella sativa* L, *Camellia sinensis* L. et *Erica multiflora* L dévoilent la présence de plusieurs familles chimiques dont les saponosides, les tannins, les acides aminés, les glucosides cardiotoniques, les alcaloïdes et les flavonoïdes.

Ce pendant, les tests phytochimiques quantitatifs effectués sur la graine de *Nigella sativa* L ont aussi témoigné la présence de certains minéraux tels que (Ca^{2+} , $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$) et de la thymoquinone avec des taux qui varient de (536, 0.031 et 2.7) mg/g respectivement.

L'huile essentielle de *Nigella sativa* L a été étudiée ainsi que ces effets pharmacologiques qui indiquent que l'administration d'huile des graines de *Nigella sativa* L à 5 ml/kg par gavage aux rats rendus lithiasiques par l'éthylène (EG) à 0,75% et chlorure d'ammonium (CA) à 1%, réduit et empêche la croissance des calculs urinaires, soutenant les données et les croyances traditionnelles concernant l'activité antiurolithiasique de la plante.

Il est évidemment clair que les extraits de *Nigella sativa* L, règlent certaines perturbations dû par la lithiase rénale.

Dans un deuxième temps, les extraits aqueux et organiques de *Nigella sativa* L, *Camellia sinensis* L et *Erica multiflora* L. ont révélé une certaine activité antimicrobienne contre quelques souches responsables d'induire une infection urinaire avec des CMI qui varient entre 0.039 et 0.625 mg/ml.

L'évaluation du pouvoir antioxydants par DPPH, a révélé par des tests *in vitro* des capacités antioxydantes modérés avec des extraits organiques et aqueux. Les extraits organiques ont montré des effets antioxydants plus important. Les activités potentielles sur le mécanisme de piégeage direct des radicaux libres par la méthode de DPPH sont prouvées par l'huile essentielle de *Nigella sativa* L. et l'extrait méthanolique de *Camellia sinensis* L. avec des taux (451.09 et 214.41) µg/ml, respectivement.

Mots clés : *Nigella sativa* L., *Camellia sinensis* L., *Erica multiflora* L., antilithiasique, antioxydant, antimicrobien.

Abstract

Urinary lithiasis is a very frequent disease in worldwide. It is treated by various costly medical and surgical means, which can cause serious side effects. To heal themselves, the lithiasics resort to traditional medicine. The aim of this work is the evaluation of some medicinal plants of local flora used in traditional Algerian medicine as antilithiasics and antimicrobial.

Firstly, phytochemical analysis of *Nigella sativa* L., *Camellia sinensis* L. and *Erica multiflora* L reveal the presence of several chemical families, including saponins, tannins, amino acids, cardiotoxic glucosides, alkaloids and flavonoids.

Meanwhile, quantitative phytochemical tests on seeds of *Nigella sativa* L also demonstrated the presence of several minerals as (Ca^{2+} , $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$) and aromatic compound (tyrmoquinone) with levels varying from (536, 0.031 and 1.7) mg/g respectively.

Essential oil of *Nigella sativa* L has been studied as well as those pharmacological effects which indicate that the administration of *Nigella sativa* L seeds oil at 5 ml/kg by gavage to rats rendered lithiasic by ethylene glycol (EG) to 0.75% and 1% of ammonium chloride (CA), reduces and prevents the growth of urinary stones, which supporting traditional data that the plant have antilithiasic activity.

It is evident that the extracts of *Nigella sativa* L regulate certain perturbations of renal lithiasis.

In a second step, the aqueous and organic extracts of *Nigella sativa* L, *Camellia sinensis* L and *Erica multiflora* L revolted some antimicrobial activity against some strains responsible to inducing urinary tract infection with MICs varying between (0.039 and 0.625) mg/ml.

The evaluation of the antioxidant power by DPPH, revealed antioxidant capacities by *in vitro* tests with organic and aqueous extracts. Organic extracts showed greater antioxidant effects. Potential activities on the mechanism of direct trapping of free radicals by the DPPH method are proved by *Nigella sativa* L essential oil and *Camellia sinensis* L methanolic extract with levels (451.09 and 214.41) $\mu\text{g/ml}$, respectively.

Key words: *Nigella sativa* L., *Camellia sinensis* L., *Erica multiflora* L., antilithiasis, antioxidant, antimicrobial.

Sommaire

Introduction	1
Synthèse bibliographique	
Chapitre I. Plantes étudiées	
1. <i>Nigella sativa</i> L.....	7
1.1. Étymologie.....	7
1.2. Histoire de <i>Nigella sativa</i> L., depuis la découverte jusqu'à l'utilisation comme remède.....	7
1.3 Systématique.....	10
1.4. Les différentes espèces.....	13
1.5. Description botanique.....	14
1.6. Production et commerce international.....	15
1.7. Culture.....	16
1.8. Composition chimique.....	16
1.8.1. Lipides et stérols.....	17
1.8.2. Composés aromatiques.....	17
1.8.3. Saponosides.....	18
1.8.4. Polyphénols et flavonoïdes.....	18
1.8.5. Alcaloïdes.....	19
1.8.6. Les protéines.....	20
1.8.7. Les vitamines et sels minéraux.....	20
1.9. Propriétés chimiques.....	22
1.10. Usage à travers le monde.....	23
1.10.1. Usages comme épice.....	23
1.10.2. <i>Nigella sativa</i> L. d'après la médecine traditionnelle.....	24
1.10.3. Indications et mode d'emploi selon Avicenne.....	25
1.10.4. Propriétés reconnues de nos jours.....	26
1.10.5. Produits à base d'huile de nigelle.....	27
2. <i>Camellia sinensis</i> L.	29
2.1. Historique.....	29
2.2. La culture du thé.....	30
2.3. Le milieu de culture.....	31

2.4. Le cycle végétal	31
2.5. Les procédés de traitement des feuilles de thé fraîchement cueillies	32
2.6. Composition des feuilles de thé	34
2.6.1. Les polyphénols	35
2.6.2. Les bases puriques	35
2.6.3. Les composés minéraux	35
2.6.4 Les vitamines	36
3. <i>Erica multiflora</i> L.....	36
3.1. Classification.....	37
3.2. Synonymes	38
3.3. Indication.....	38
3.4. Propriétés Médicinales.....	38
Références	39

Chapitre II. Généralités sur la lithiase rénale.

1. Lithiase rénale.....	47
1.1. Généralités.....	47
1.2. Définition.....	48
1.3. Epidémiologie.....	48
1.4 Classification morphoconstitutionnelle	49
1.5. Répartition des composants lithiasiques	49
1.6. La lithogénèse	51
1.6.1. Régulation de cristallisation	53
1.7. Formes de lithiases.....	56
1.7.1. Lithiase oxalocalcique.....	56
1.7.2. Autres types de lithiases	57
2. Traitements des lithiases.....	59
2.1. La diététique.....	59
2.2. Traitement médical.....	59
2.3. Traitement par phytothérapie	60
2.4. Le traitement chirurgical	60
2.4.1. Lithotritie extracorporelle	60
2.4.2. La chirurgie percutanée	61

2.4.3. L'urétéroscopie	61
Références.....	62

Partie expérimentale

Chapitre III. Matériel et méthode.

1. Objectif.....	76
2. Matériels végétales	76
2.1. Récolte.....	76
2.2. Traitement.....	76
2.3. Les huiles essentielles.....	77
2.3.1. Procédé d'extraction.....	77
2.3.2. Calcul du rendement.....	77
2.3.3. Mesure de la densité.....	78
2.4. Extraction.....	78
2.4.1. Décoction par l'eau	78
2.4.2. Macération par l'eau.....	79
2.4.3. Digestion à 50 °C.....	79
2.4.4. Infusion.....	80
2.4.5. Extration par solvants à polarité croissante.....	80
3. Etude phytochimique.....	81
3.1. Phytochimie qualitative.....	81
3.1.1. Tanins.....	82
3.1.2. Saponosides.....	82
3.1.3. Flavonoïdes.....	82
3.1.4. Glucosides cardiotoniques.....	82
3.1.5. Anthracénosides.....	82
3.1.6. Alcaloïdes.....	83
3.1.7. Acides aminés.....	83
3.2. Phytochimie quantitative.....	83
3.2.1. Dosage de calcium.....	83
3.2.2. Dosage d'Oxalate.....	83
3.2.3. Dosage de tymoquinone.....	83
4. Recherche de l'activité antilithiasique.....	83

4.1. Description de test biologique.....	83
4.2. Induction d'une lithiase urinaire.....	84
4.3. Évaluation d'effet antilithiasique d'huile essentielle de <i>Nigella sativa</i> L.....	85
4.4. Évolution du poids corporel.....	85
4.5. Dosages des paramètres urinaires.....	86
4.5.1. Mesure de volume urinaire.....	86
4.5.2. Dosage de l'Oxalate.....	86
4.5.3. Dosage de Phosphate.....	87
4.5.4. Dosage de Calcium.....	87
4.5.5. Dosage de l'Acide urique.....	88
4.5.6. Dosage de Magnésium.....	89
4.6. Dosages des paramètres biochimiques sériques.....	90
4.6.1. Dosage de l'Acide urique.....	90
4.6.2. Dosage de l'urée sanguine.....	90
4.6.3. Dosage de la Créatinine.....	91
4.7. Dosages des paramètres biochimiques rénaux.....	92
4.8. Etude histologique.....	92
5. Activité antioxydante (test au DPPH).....	92
5.1. Préparation de la solution DPPH.....	93
5.2. Solution d'extrait.....	93
5.3. Test au DPPH.....	93
5.4. Expression des résultats.....	93
6. Activité antibactérienne et antifongique.....	94
6.1. Les souches testées.....	94
6.2. Conservation des souches.....	95
6.3. Les milieux de culture.....	95
6.4. Préparation des précultures.....	96
6.5. Les techniques microbiologiques.....	96
6.5.1. Sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques.....	96
6.5.2. Test de pouvoir antimicrobien des extraits.....	97
6.5.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI.....	98
7. Analyses statistiques.....	99
7.1. La moyenne.....	100

7.2. La variance.....	100
7.3. L'écart-type.....	100
7.4. L'erreur standard de la moyenne (Sm).....	100
7.5. Test de Student.....	100
Références.....	102

Chapitre VI. Résultats et interprétations.

1. Extraction d'huile essentielle.....	105
1.1. Rendement et densité.....	105
2. Etude phytochimique.....	105
2.1. Tests qualitatifs.....	105
2.2. Tests quantitatifs.....	107
3. Evaluation d'effet antilithiasique d'huile essentielle de <i>Nigella sativa L.</i>	107
3.1. Evolution du poids corporel.....	108
3.2. Dosage des paramètres urinaires.....	109
3.2.1. Mesure de volume urinaire.....	109
3.2.2. Dosage d'Oxalate.....	110
3.2.3. Dosage de phosphate.....	110
3.2.4. Dosage de calcium.....	110
3.2.5. Dosage d'acide urique.....	110
3.2.6. Dosage de magnésium.....	111
3.3. Dosages des paramètres biochimiques sériques.....	113
3.3.1. Dosages de créatinine.....	113
3.3.2. Dosages d'acide urique.....	113
3.3.3. Dosages d'urée sanguine (BUN).....	113
3.4. Dosages des paramètres biochimiques rénaux.....	114
3.5. Etude histologique.....	115
4. Test du pouvoir antioxydant.....	116
4.1. Etude comparative d'activité antioxydant.....	117
5. Résultats du test du pouvoir antimicrobien.....	118
5.1. Origine et identification des souches microbiennes.....	118
5.2. Résultats de l'antibiogramme.....	123
5.3. Résultats de l'antifongigramme.....	130

5.4. Résultat de l'activité antimicrobienne d'huile essentielle.....	131
5.5. Résultat de l'activité antimicrobienne des extraits de <i>Camellia sinensis</i> L.....	131
5.6. Résultat de l'activité antimicrobienne des extraits d' <i>Erica multiflora</i> L.....	136
5.7. Résultat de la détermination de Concentration Minimal Inhibitrice CMI.....	142
5.7.1. <i>Nigella sativa</i> L.....	142
5.7.2. <i>Camellia sinensis</i> L.....	143
5.7.3. <i>Erica multiflora</i> L.....	149
Discussion générale	155
Conclusion générale	170
Annexe.....	173

Introduction

Introduction:

La lithiase urinaire, ou formation des calculs dans les voies urinaires, constitue un problème majeur de santé publique pour de nombreux pays du fait de sa fréquence, de ses complications et de son coût très élevé pour son traitement.

Conséquence d'un déséquilibre biologique urinaire parfois permanent, plus volontiers intermittent, ou transitoire, le calcul est le témoin d'une ou plusieurs anomalies lithogènes. La lithogénèse est un phénomène multifactoriel complexe aboutissant à la formation des calculs à partir des cristaux qui naissent, croissent et s'agglomèrent. Evolutive dans le temps et dans l'espace, elle peut débuter dès le tubule rénal mais le développement lithiasique s'effectue essentiellement dans la voie excrétrice urinaire supérieure [1, 2].

De nombreux patients lithiasiques ont donc recours à la chirurgie ou à la lithotritie pour éliminer les calculs urinaires. Cependant, ces moyens sont très coûteux et sont souvent associés à des effets secondaires non négligeables.

Malheureusement, malgré le progrès considérable noté dans le domaine de la thérapie médicale, il n'y a peut des médicaments satisfaisants pour traiter la lithiase urinaire. Des récentes études sur cette maladie dans notre région (Ouest Algérien), menées par notre laboratoire et qui ont fait l'objet de plusieurs publications, ont montré que cette pathologie ne cesse de prendre de l'ampleur avec une prédominance des calculs de type calcique.

Ce pendant, l'emploi des plantes comme remède a son origine dans les plus anciennes civilisations. Mais au début du 20^{ème} siècle, la chimiothérapie, avec les molécules de synthèse, a laissé de côté la médecine par les plantes. Malgré les progrès réalisés en médecine au cours des dernières décennies, de nombreux traitements médicamenteux restent insuffisants face aux fléaux tels que: la malaria, première cause de mortalité dans le monde, le cancer, le diabète, la maladie d'Alzheimer, virales avec l'émergence de nouvelles maladies qui affaiblissent le système immunitaire (SIDA) et les infections bactériennes et l'apparition de souches de microorganismes de plus en plus résistantes aux traitements connus, font qu'on a recours à des traitements de plus en plus agressifs.

C'est pour cela, depuis quelques années, qu'il y a un regain d'intérêt pour la phytothérapie.

Quand elle n'est pas un choix, la phytothérapie est donc une nécessité.

Le développement de nouveaux agents thérapeutiques s'avère indispensable pour lutter contre ces fléaux. Dans ce but, l'investigation des plantes représente un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles molécules candidates (bio-médicaments), sachant

que chacune de ces plantes contient des centaines, voire des milliers de métabolites secondaires possédant des effets pharmacologiques [3].

Elles peuvent avoir une activité anti-inflammatoire [4-6], antibactérienne et antifongique [7-10], analgésique et antipyrétique [6, 7, 11, 12], hypoglycémiant [13-16], antitumorale [17-19] et antilithiasique [20-22].

La valorisation scientifique de la médecine traditionnelle doit conduire notamment à la mise au point de médicaments à base de plantes. Aujourd'hui il a été estimé que les principes actifs provenant des végétaux représentent 25% des médicaments prescrits soit un total de 120 composés d'origine naturelle provenant de 90 plantes différentes [23].

En Algérie, la majorité des malades atteints de maladies chroniques associent à leur traitement des plantes sans aucun avis médical. De plus ces plantes n'ont pas subi aucune étude botanique, biochimique ou physiologique. Un grand nombre est vendu sans aucune règle d'hygiène par des personnes non agréées et pose le problème de l'innocuité des plantes.

C'est pour cela que nous nous sommes intéressés à expérimenter les plantes utilisées dans la tradition algérienne afin de contribuer au développement de la recherche dans ce domaine, d'autant plus que la flore algérienne résulte d'une multitude d'écosystèmes offrant une richesse floristique d'espèces végétales dont plusieurs centaines sont réputées par leur usage traditionnel en thérapeutique humaine. Elles demeurent cependant très peu exploitées scientifiquement.

Notre travail s'est focalisé sur quelques espèces végétales connues avec de vertus médicinales; *Nigella sativa L.*, *Camellia sinensis L.* et *Erica multiflora L.* qui sont utilisées en médecine traditionnelle par la population algérienne contre plusieurs maladies dont la lithiase urinaire.

Ce travail est subdivisé en deux parties distinctes :

- ❖ Une partie d'évaluation pharmacologique et toxicologique d'une plante médicinale algérienne utilisée en médecine traditionnelle comme une plante antilithiasique (*Nigella sativa L.*).
- ❖ Une partie phytochimique et microbiologique en essayons à travers d'évaluer l'activité antibactérienne et antifongique des extraits aqueux et organiques de *Camellia sinensis L.*, *Erica multiflora L.* et *Nigella sativa L.*

La première partie de ce travail sera consacrée à une étude bibliographique sur les espèces végétales objets de cette thèse. Dans cette partie du mémoire, sera abordée ci la description botanique de *Nigella sativa L. (N.S)*, *Camellia sinensis L.* et *Erica multiflora L.*,

suivi par un aperçu générale sur la pathologie de la lithiase rénal. Ensuite, les différents traitements de lithiase rénale.

Dans la partie expérimentale nous nous sommes intéressés à valoriser l'effet antilithiasique d'extrait huileux de *Nigella sativa L* sur un modèle de lithiase expérimentale de type oxalocalcique chez des rats Wistar albinos.

La deuxième partie est consacrée à l'activité antimicrobienne des *Camellia sinensis L.*, *Erica multiflora L.* et *Nigella sativa L.* contre quelques germes responsables d'induire une infection urinaire.

Pour cela nous nous sommes fixés sur les objectifs suivants :

1. Procéder à un inventaire, identification, authentification (classification taxonomique), des plantes utilisées pour le traitement du la lithiase urinaire par la population algérienne dans les régions ouest, et Sud algérien, à l'aide d'une enquête ethnopharmacologique;
2. Réaliser un screening phytochimique des extraits des plantes sélectionnées: *Nigella sativa L.*, *Camellia sinensis L.* et *Erica multiflora L.*
3. Evaluer leurs activité antiradicalaire ou antioxydant;
4. Evaluer l'effet antilithiasique de *Nigella sativa L.*, à moyen terme (4 semaines), après l'administration orale quotidien de 5 ml/Kg p.c d'huile essentielle de *Nigella sativa L.* aux rats Wistar rendus lithiasique.
5. Suivre l'évolution de quelques paramètres biochimiques urinaires et sériques: Oxalate, Phosphate, Calcium, Créatinine, acide urique, magnésium et BUN après l'introduction orale d'huile des graines de *Nigella sativa L* aux rats Wistar dès le premier et quinzième jour d'induction d'une lithiase urinaire;
6. Evaluer l'activité antibactérienne et antifongique de *Nigella sativa L.*, *Camellia sinensis L.* et *Erica multiflora L.*

Références :

- [1]. M. Daudon, O. Traxer, P. Jungers, Lithiase Urinaire, 2ème ed., Lavoisier, Médecine Sciences, Paris, 2012, 672 pages.
- [2]. M. Daudon, C.A. Bader, P. Jungers, Urinary calculi : review of classification methods and correlations with etiology, *Scan. Microsc.* 1993 ; 7 : 1081-1106.
- [3]. Graham, G., Russell, R., Bisphosphonates: Mode of Action and Pharmacology. *Pediatrics*, 2007. 119 (Supplement 2):150-162.
- [4]. Maia, S., Paycha, F., Métastases osseuses et médecine nucléaire: Mécanismes de fixation des bisphosphonates-(^{99m}Tc) : matrice organique, minérale ou cellulaire ? *Eurocancer. John Libbey Eurotext*, Paris, 2007: 151-158.
- [5]. Frith, J.C., Mönkkönen J, Auriola S, Mönkkönen H, Rogers MJ. The molecular mechanism of action of the antiresorptive and antiinflammatory drug clodronate: evidence for the formation in vivo of a metabolite that inhibits bone resorption and causes osteoclast and macrophage apoptosis. *Arthritis Rheum*, 2001. 44 (9): 2201-2210.
- [6]. Rogers, M., From molds and macrophages to mevalonate: a decade of progress in understanding the molecular mode of action of bisphosphonates. *Calcif Tissue Int*, 2004. 75: 451-61.
- [7]. Shipman, C.M., Croucher, P. I., Russell, R. G., Helfrich, M. H., and Rogers, M. J., The bisphosphonate incadronate (YM175) causes apoptosis of human myeloma cells in vitro by inhibiting the mevalonate pathway. *Cancer Res.*, 1998. 58: 5294-5297.
- [8]. Denoyelle, C., Hong, L., Vannier, J. P., Soria, J., and Soria, C., New insights into the actions of bisphosphonate zoledronic acid in breast cancer cells by dual RhoA dependent and -independent effects. *Br. J. Cancer*, 2003. 88: 1631-1640.
- [9]. Lee, M.V., Fong, E. M., Singer, F. R., and Guenette, R. S., Bisphosphonate treatment inhibits the growth of prostate cancer cells. *Cancer Res.*, 2001. 61: 2602-2608.
- [10]. Tassone, P., Tagliaferri, P., Viscomi, C., Palmieri, C., Caraglia, M., D'Alessandro, A., Galea, E., Goel, A., Abbruzzese, A., Boland, C. R., Venuta, S., Zoledronic acid induces antiproliferative and apoptotic effects in human pancreatic cancer cells in vitro. *Br J Cancer*, 2003. 88: 1971-1978.
- [11]. Fromiguet, O., Kheddoumi, N., Body, J. J. Bisphosphonates antagonise bone growth factors' effects on human breast cancer cells survival. *Br J Cancer*, 2003. 89: 178-184.

- [12]. Senaratne, S.G., Mansi, J. L., Colston, K. W., The bisphosphonate zoledronic acid impairs Ras membrane [correction of impairs membrane] localisation and induces cytochrome c release in breast cancer cells. *Br. J. Cancer.*, 2002. 86: 1479-1486.
- [13]. Neville-Webbe, H.L., Rostami-Hodjegan, A., Evans, C. A., Coleman, R. E., Holen, I., Sequence- and schedule-dependent enhancement of zoledronic acid induced apoptosis by doxorubicin in breast and prostate cancer cells. *Int. J. Cancer*, 2005. 113: 364-371.
- [14]. Coxon, J.P., Oades, G. M., Kirby, R. S., Colston, K. W., Zoledronic acid induces apoptosis and inhibits adhesion to mineralized matrix in prostate cancer cells via inhibition of protein prenylation. *BJU. Int.*, 2004. 94: 164-170.
- [15]. Fisher, J.E., Rogers MJ, Halasy JM, Luckman SP, Hughes DE, Masarachia PJ, Wesolowski G, Russell RG, Rodan GA, Reszka AA., Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci., U S A*, 1999. 96 (1): 133-138.
- [16]. Oades, G.M., Senaratne, S. G., Clarke, I. A., Kirby, R. S., Colston, K. W., Nitrogen containing bisphosphonates induce apoptosis and inhibit the mevalonate pathway, impairing Ras membrane localization in prostate cancer cells. *J. Urol.*, 2003. 170: 246-252.
- [17]. Sato, K., Yuasa, T., Nogawa, M., Kimura, S., Segawa, H., Yokota, A., Maekawa, T., A third-generation bisphosphonate, minodronic acid (YM529), successfully prevented the growth of bladder cancer in vitro and in vivo. *Br. J. Cancer.*, 2006. 95: 1354-1361.
- [18]. Cheng, K.W., Lahad, J. P., Kuo, W. L., Lapuk, A., Yamada, K., Auersperg, N., Liu, J., Smith- McCune, K., Lu, K. H., Fishman, D., The RAB25 small GTPase determines aggressiveness of ovarian and breast cancers. *Nat. Med.*, 2004. 10: 1251-1256.
- [19]. Evdokiou, A., Labrinidis, A., Bouralexis, S., Hay, S., Findlay, D. M., Induction of cell death of human osteogenic sarcoma cells by zoledronic acid resembles anoikis. *Bone*, 2003. 33: 216-228.
- [20]. Clézardin, P., Ebetino, F. H., Fournier, P. G., Bisphosphonates and cancer-induced bone disease: beyond their antiresorptive activity. *Cancer Res.*, 2005. 65: 4971-4974.

- [21]. Stresing, V., Daubine, F., Benzaid, I., Monkkonen, H., Clezardin, P., Bisphosphonates in cancer therapy. *Cancer Lett.*, 2007. 257: 16-35.
- [22]. Hiraga, T., Williams, P. J., Mundy, G. R., Yoneda, T., The bisphosphonate ibandronate promotes apoptosis in MDA-MB-231 human breast cancer cells in bone metastases. *Cancer Res.*, 2001. 61: 4418-4424.
- [23]. Peyruchaud, O., Winding, B., Pecheur, I., Serre, C. M., Delmas, P., Clezardin, P., Early detection of bone metastases in a murine model using fluorescent human breast cancer cells: application to the use of the bisphosphonate zoledronic acid in the treatment of osteolytic lesions. *J. Bone. Miner. Res.*, 2001. 16: 2027-2034.

Première Partie:
Synthèse
Bibliographique

Chapitre I.

Plantes étudiées

1. *Nigella sativa* L.

1.1. Étymologie

Le genre *Nigella* L. a été nommé d'après les graines noires caractéristiques retrouvées dans la plupart des espèces de *Nigella* (figure 1). Le terme Latin « *nigellus* » est le diminutif de « *niger* », qui signifie noir [1].

Les grecs nommaient *Nigella sativa* « μελάνθιον » melanthion, de « melas » qui veut dire noir et « anthos » fleur, donc l'étymologie tire du même attribut [2].

L'espèce *Nigella damascena* tire son nom de la capitale Syrienne en référence à son origine géographique. Pour les autres espèces, il a été tenu compte de leur utilisation (*Nigella sativa*), notamment comme condiment, ou bien de leur morphologie.

Nigella sativa est connue sous d'autres noms en France comme, le cumin noir, le faux cumin, la poivrette, le sésame noir, la nielle, les cheveux de Vénus ou encore la nigelle.

La multitude de noms commerciaux fait référence aux appellations internationales, on peut retrouver la nigelle sous le nom de *kalonji* dans les épiceries indiennes. Le nom *çörek otu*, qui veut dire littéralement « l'herbe à pain », fait référence à son utilisation traditionnelle en Turquie. En kurde, *reşreşik* fait référence à la couleur noire de la graine, tout comme l'appellation en anglais *black seed* ou *schwarzku'mmel* en allemand. En arabe, on connaît la nigelle sous le nom de *habba sawda*. On retrouve donc *Nigella sativa* L. sous ces différentes dénominations dans le commerce.



Figure 1 : Graine de Nigelle cultivée, d'après [3]

1.2. Histoire de *Nigella sativa* L., depuis la découverte jusqu'à l'utilisation comme remède

L'usage des plantes à des fins thérapeutiques remonte à des temps très anciens. Des fossiles du début du Crétacé (-250 millions d'années) prouvent l'existence des nigelles à la fin de l'Ère secondaire [4].

Tout d'abord la civilisation sumérienne, première civilisation véritablement « urbaine » ayant marqué la fin de la préhistoire au Moyen-Orient, serait à l'origine de l'utilisation des plantes comme sources de « médicaments ». Les Sumériens étaient établis dans la région de la Mésopotamie de part et d'autre du Tigre et de L'Euphrate, lieux propices au développement agricole. Un recueil, sous forme de tablettes d'argile, contenant des formules végétales gravées en caractères cunéiformes et datant de 5000 ans avant J.-C., a été découvert à Nippur (ancienne ville mésopotamienne) en 1948. Près de 250 plantes y sont répertoriées, dont la *Nigelle*. Puis des milliers de tablettes, datant de 2000 ans avant J.-C. ont été découvertes en 1973 dans les ruines d'Elba en Syrie [5].

Par ailleurs, la civilisation égyptienne n'est pas en reste en termes de plantes médicinales. En effet, le papyrus découvert par Edwin Smith en 1862 dans les ruines de Louksor, rédigé entre 1500 et 1600 avant J.-C. et déchiffré par l'égyptologue allemand Georg Ebers, constitue l'un des plus anciens traités médicaux qui nous soit parvenu. Il fait état de la pharmacopée égyptienne où plus de 700 substances, tirées pour la plupart du règne végétal, sont répertoriées. Il s'intitulait « Livre de préparation de médicaments pour toutes les parties du corps humain ». *Nigella* est citée comme médicament pour traiter la toux et les maladies pulmonaires. Et des archéologues ont trouvé une fiole d'huile de cumin noir dans le tombeau du Pharaon Toutânkhamon (v.-1353 à -1343). Selon certaines sources, cette huile était utilisée comme produit de beauté par Cléopâtre et Néfertiti. C'était aussi l'un des précieux remèdes prodigués par les médecins personnels des pharaons qu'ils exploitaient pour son action digestive après les repas copieux et aussi contre les maux de tête, de dents, les infections diverses, les inflammations et allergies en tous genres.

La civilisation gréco-romaine a également excellé en terme de thérapie par les plantes, notamment grâce à Hippocrate (460-377 av. J.-C.), surnommé le père de la médecine. Son *Corpus Hippocratum*, un ensemble de textes, mentionne près de 400 remèdes à base de plantes dont la nigelle. Claude Galien (né vers 131 après J.-C.), médecin attitré de l'Empereur Marc Aurèle, à l'origine de la « pharmacie galénique », a amélioré en termes de précision et de qualité les connaissances fournies par Hippocrate. Il conseille de brûler les graines de nigelle pour tuer les moucheron et les moustiques; et Tragus les employait comme antihelminthiques [6].

Pedanius Dioscoride né vers 40 après J.-C. en Cilicie (le sud de la Turquie actuelle) et mort vers 90 après J.-C., d'après la préface de son traité *De materia medica*, aurait été médecin militaire sous les règnes de Claude I^{er} et de Néron. Il préconisait l'usage des graines de

Nigella sativa contre les maux de tête, les affections des yeux, les maux de dents et les morsures d'araignées.

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

Au 8^{ème} siècle, la médecine occidentale est surtout pratiquée par les moines. Dans le capitulaire de Villis, datant de l'an 795 environ, on note des recommandations sur la nigelle.

On crédite à l'excellence des arabes en médecine l'élargissement du champ d'application de cette plante en thérapeutique.

« Soignez-vous en utilisant la graine de nigelle, c'est un remède contre tous les maux à l'exception de la mort », telle est la recommandation faite par le prophète Mohammed au 7^{ème} siècle. L'un de ses disciples, Ibn Atîq, avait utilisé les graines de *Nigella sativa* macérées dans l'huile d'olive. On instillait trois gouttes de cette huile dans chaque orifice nasal pour traiter la grippe qui s'accompagnait d'éternuements en salves [7].

Né près de Boukhara en Perse (actuel Ouzbékistan), Abu Ali Al-Hussein Ibn Abdallah Ibn Sina, connu sous le nom d'Avicenne (980-1037), traite de la nigelle dans son ouvrage « le Livre de la guérison de l'âme » ou « *Kitab Al-Chifâ* ». Il conseillait de griller les graines et de les réduire en poudre, puis de placer cette préparation dans une bourse en tissu et d'inhaler quotidiennement pour désobstruer les voies nasales, selon le même principe qu'un vaporisateur [8]. Avicenne préconisait aussi la nigelle dans la dyspnée et dans le traitement de l'asthme et des bronchites. Cette même préparation, prise avec de l'eau bouillie, possède des actions diurétiques et dissolvantes des calculs rénaux [9]. D'autre part, la prise de l'huile de nigelle avec de l'huile d'olive était très réputée comme aphrodisiaque. À la nigelle on reconnaît aussi des propriétés emménagogues, galactagogues, abortives, vermifuges et ténicides.

Les graines de *Nigella sativa*, pulvérisées et utilisées en cataplasme avec du vinaigre, auraient une action résolutive dans les pustules et la gale surinfectée et auraient une action verrucide, si on ajoute du miel [10]. Enfin, les médecins arabes connaissaient la toxicité de *Nigella sativa* à forte dose. De ce fait, ils recommandaient de ne pas dépasser une dose unitaire d'un demi-*Dirham* (1,62 g) et une dose journalière de deux *Dirhams* (6,48 g).

1.3. Systématique

La classification des végétaux permet de distinguer les procaryotes (bactéries et cyanobactéries) des eucaryotes eux-mêmes divisés en trois groupes en fonction de l'évolution de leur appareil végétatif :

- Les *Thallophytes* avec un appareil végétatif peu différencié, ou encore, un thalle, regroupent algues, lichens et champignons.
- Les *Bryophytes* dont l'appareil végétatif commence à se différencier en tige et feuilles comportent mousses, hépatiques et anthocérotes.
- Les *Trachéophytes* sont les « végétaux supérieurs », leur appareil végétatif est bien différencié en tige, feuilles et vaisseaux conducteurs de sèves. Ils sont constitués par les Ptéridophytes (fougères) et Spermaphytes (plantes à graines).

De plus avec l'évolution de l'appareil végétatif et reproducteur, les végétaux se sont adaptés à la vie terrestre depuis leur vie aquatique en passant par le milieu terrestre humide.

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

- L'embranchement des Spermaphytes :

Ils se distinguent par la production de graines et par une fécondation réalisée par l'intermédiaire d'un tube pollinique et indépendante de l'élément liquide [11].

- Le sous-embranchement des Angiospermes (Magnoliophyta, plantes à fleurs) :

Elles ont la particularité d'avoir une double fécondation, des organes reproducteurs se groupant en fleurs, bisexuées et des écailles ovulifères ou carpelles entourant complètement les ovules qui, après la fécondation, se transforment en fruits [12].

- La classe des Dicotylédones (Magnoliopsida) :

Elles sont caractérisées par un embryon à deux cotylédons latéraux, rarement réduits à un seul, une embryogenèse à deux plans de symétrie, des feuilles comportant un pétiole et un limbe à nervation réticulée et un appareil végétatif où la racine principale n'avorte pas, et où les feuilles sont complètes [13].

- La sous-classe des Magnoliidae :

Caractérisée par des pièces florales primitivement nombreuses et disposées en hélice sur un réceptacle floral bombé, ou thalamus. Cette hésitation architecturale, signe d'une évolution qui en est encore à ses débuts, est accompagnée d'autres caractères primitifs, parmi lesquels la constitution du gynécée, généralement unicarpellé libre de toute condescence:

chez la plupart de ces plantes, chaque fleur produit ainsi, après la fécondation, de nombreux fruits séparés, et non le fruit composite, mais unique, qui est celui de la plupart des Angiospermes [14].

- L'ordre des Ranunculales :

Leurs fleurs sont acycliques, hémicycliques ou cycliques avec verticilles trimères. Les fleurs deviennent unisexuées, les étamines se soudent en synandres, le gynécée se réduit. Les concrescences périanthaires et les soudures carpellaires sont exceptionnelles. La différenciation du périanthe en calice et corolle s'affirme, avec une organisation pentamère.

Enfin, l'actinomorphie générale de la fleur des Ranunculales met en évidence la très forte zygomorphie constatée dans quelques genres. Les graines sont albuminées ou exalbuminées [14].

- La famille des Ranunculaceae :

Elles sont pour la plupart des plantes herbacées, plus rarement grimpantes et ligneuses.

Presque toutes sont des herbes terrestres, vivaces ou annuelles, certaines sont aquatiques.

Les feuilles sont généralement alternes, simples, entières ou découpées, ou même composées, habituellement dentées, ou crénelées, à nervation pennée palmée, sans stipules et les fleurs sont spiralées ou spiralo-cycliques.

L'androcée comporte de nombreuses étamines libres, centripètes, avec anthères à déhiscence longitudinale. Le gynécée est constitué d'un ovaire supère à carpelles libres, parfois soudés.

Le fruit est soit un akène, soit un follicule, ou bien une capsule pour la nigelle.

Les Ranunculaceae représentent le type même de la famille par enchaînement, mais avec diverses directions évolutives, d'où une grande variation dans la structure florale: la gamocarpellie (*Nigella*), l'apparition de la zygomorphie (*Aconitum*), la cyclisation par fragmentation de la spirale (*Helleborus*), et enfin la différenciation du périanthe en sépales et pétales selon deux voies, par sépalisation de l'involucre de bractées (*Anemone*), et par pétalisation des nectaires ou des étamines (*Ranunculus*) [13].

Le seul caractère véritablement commun est l'embryon qui est de petite taille et entouré d'un albumen charnu.

- Le genre *Nigella* :

Originaire d'Europe méridionale, d'Asie Mineure et centrale et d'Afrique du nord.

Il s'agit de plantes herbacées annuelles, aux feuilles basales et caulinaires, alternes, bi à tri pennatiséquées, composées de segments linéaires.

Les fleurs actinomorphes et bisexuées, généralement solitaires et terminales, sont axillées par un verticille de 5-6 bractées sépaloides et involucrales, pennatiséquées. Elles se composent de:

- 5 à 25 sépales persistants, libres et pétaloïdes
- 5 à 10 pétales nectarifères libres, de taille réduite et de forme bilabée caractéristique, avec une partie inférieure sécrétrice de nectar et une partie supérieure agissant comme un casque protecteur
- 15 à 75 étamines libres
- un ovaire supère constitué de 5 à 10 carpelles libres (*figure 3*)

Le fruit est un follicule ou une capsule, sessile et fréquemment renflé (*figure 2*).

Selon la classification moléculaire et cladistique, la systématique phylogénétique version 2009, basée sur deux gènes chloroplastiques et un gène nucléaire du ribosome:

Le genre *Nigella* appartient aux Angiospermes, au clade des Dicotylédones vraies ou Eudicotylédones, à l'ordre des Ranunculales, à la famille des Ranunculaceae et à la sous-famille des Ranunculoideae [15].



Figure 2 : Représentation schématique de la plante entière et ses annexes, d'après [16]

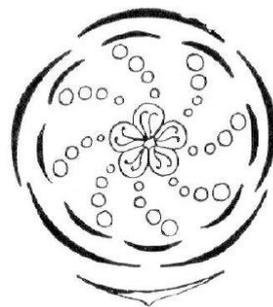


Figure 3 : Diagramme floral de *Nigella*, d'après [14]

1.4. Les différentes espèces

Différentes approches taxonomiques ont abouti à un assemblage de nombreux synonymes. À la première description de ce genre seulement six espèces ont été enregistrées par Linné en 1753, et maintenant on voit plus de quatre-vingt noms selon Zohary en 1983.

Les espèces sont divisées en trois groupes : *Erobathos*, *Nigellaria* et *Nigellastrum*.

Le **tableau 1** regroupe les différentes espèces connues à ce jour, avec les données taxonomiques et géographiques [17, 18].

Tableau 1 : Différentes espèces et variétés de *Nigella* L. et leur distribution géographique

Nom de l'espèce	Synonyme courant	Distribution
Subsect. <i>Erobathos</i> (DC.) Zoh		
<i>N. damascena</i> L. <i>N. elata</i> Boiss.	<i>Erobathos coarctatus</i> (Gmel.) Spach <i>N. bithynica</i> Azn	Medit.; cultivated N.E. Medit
Subsect. <i>Nigellaria</i> (DC.) Terracc		
<i>N. arvensis</i> L. var. <i>anatolica</i> Zoh var. <i>arvensis</i>	<i>N. arvensis</i> subsp. <i>arvensis</i> sensu Fl. Europ.	W. Irano-Turanian N. Medit. - Pontic – central European
var. <i>assyriaca</i> (Boiss.) Zoh var. <i>beershevensis</i> Zoh var. <i>glauca</i> (Schkuhr) Boiss	<i>N. deserti</i> Boiss <i>N. carpatha</i> Strid, <i>N. degenii</i> Vierh., <i>N. doerfleri</i> Vierh. <i>N. divaricata</i> Moris	W. Irano-Turanian Saharo-Arabian E. Medit., W. Irano-Turanian
var. <i>glaucescens</i> Guss var. <i>involutrata</i> Boiss var. <i>iranica</i> (Zoh.) var. <i>longicornis</i> (Zoh.) Townsend	<i>N. arvensis</i> subsp. <i>aristata</i> (Sm.) Nyman <i>N. assyriaca</i> var. <i>longicornis</i> Zoh.	W. Medit E. Medit W. Irano-Turanian W. Irano-Turanian
var. <i>microcarpa</i> Boiss var. <i>multicaulis</i> Zoh var. <i>negevensis</i> Zoh	<i>N. taubertii</i> Brand <i>N. deserti</i> var. <i>latilabris</i> Zoh <i>N. arvensis</i> subsp. <i>negevensis</i> (Zoh.) W. Greuter & Burdet	E. Medit Medit. - Saharo-Arabian Saharo-Arabian
var. <i>palaestina</i> (Zoh.) Zoh. & Feinbr var. <i>simplicifolia</i> Zoh var. <i>mutica</i> Bornm	<i>N. divaricata</i> var. <i>palaestina</i> Zoh. <i>N. arvensis</i> var. <i>submutica</i> Bornm.	E. Medit W. Irano-Turanian E. Medit
<i>N. fumarifolia</i> Kotschy <i>N. hispanica</i> L. var. <i>hispanica</i> var. <i>intermedia</i> Coss	<i>N. amoena</i> Salisb. <i>N. papillosa</i> subsp. <i>atlantica</i> (Murb.) Amich ex G. Lopez	N.E. Medit N.W. Medit S.W. Medit
var. <i>parviflora</i> Coss	<i>N. gallica</i> Jord	N.W. Medit

<i>N. sativa</i> L. var. <i>hispidula</i> Boiss var. <i>sativa</i>	<i>N. truncata</i> Viv <i>N. indica</i> Roxb	N.E. Medit.; cultivated widely cultivated
<i>N. segetalis</i> Marsch. Bieb. var. <i>armena</i> (Stev.) Boiss var. <i>segetalis</i>	<i>N. verrucosa</i> C. Koch <i>N. bicolor</i> Boiss	N.E. Medit. - W. Irano-Turanian W. Irano-Turanian W. Irano-Turanian
<i>N. stellaris</i> Boiss	<i>N. cilicica</i> Boiss. et Bal. in Boiss	N.E. Medit
Subsect. <i>Nigellastrum</i> (DC.) Zoh		
<i>N. ciliaris</i> DC. <i>N. orientalis</i> L. <i>N. oxypetala</i> Boiss	<i>N. oxypetala</i> subsp. <i>ciliaris</i> Terracc. <i>Nigellastrum flavum</i> Moench <i>N. lancifolia</i> Hub.-Mor., <i>N. latisecta</i> P.H.Davis	S.E. Medit N.E. Medit., W. Irano-Turanian N.E. Medit., W. Irano-Turanian

1.5. Description botanique

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

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

La plante est hermaphrodite à reproduction autonome.

Le fruit correspondant à l'ensemble des follicules soudés forme la capsule contenant plusieurs graines triangulaires blanchâtres qui, lorsque la capsule s'ouvre à maturité, exposées à l'air deviennent noires (*figures 4*).

Les graines sont ovoïdes et mesurent 2 à 3,5 mm ; elles présentent 3 ou 4 angles avec une face supérieure finement granuleuse et réticulée [19, 20].

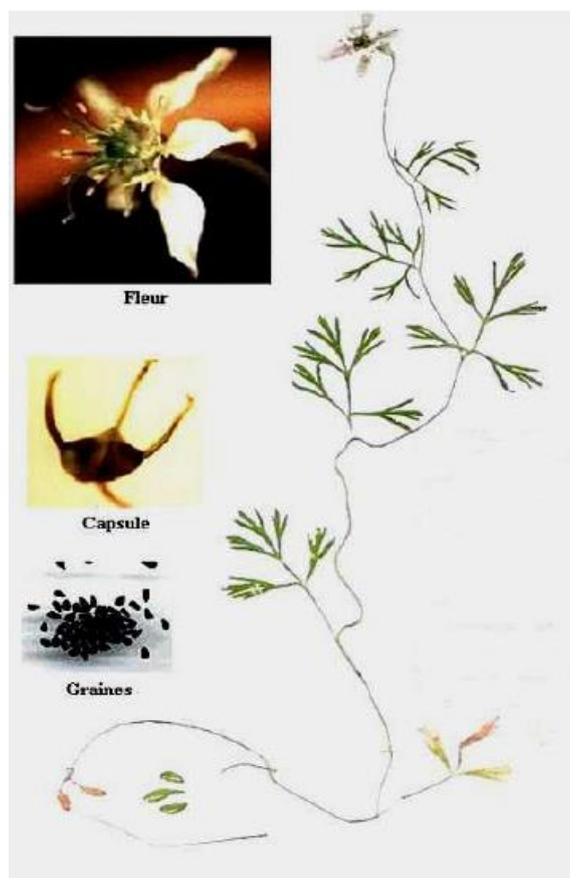


Figure 4 : Nigella sativa L., d'après [21]

1.6. Production et commerce international

Originnaire des régions méditerranéennes et d'Asie occidentale, la nigelle est cultivée jusqu'en Inde, en passant par le Soudan et l'Éthiopie.

Les pays producteurs sont surtout consommateurs des graines de nigelle comme épice, mais les utilisent de plus en plus comme complément alimentaire et remède.

La production de plantes aromatiques et médicinales ne fait qu'augmenter au fil des années.

Certains pays, à la base exclusivement producteurs-consommateurs, sont devenus exportateurs. On peut citer comme exemple la Turquie qui produisait seulement pour sa population jusqu'en 2001, puis qui a commencé à exporter, mais surtout à importer le cumin noir depuis l'Inde notamment. En moyenne elle exporte 125 tonnes, contre 430 tonnes importées [22].

1.7. Culture

La plante est très peu exigeante et pousse sur des terrains argileux ou sablonneux, dans des endroits chauds et peu humides.

Les graines sont semées en général au printemps, elles commencent leur germination dans les trois à quatre semaines. Après environ six mois de croissance végétative, la floraison apparaît et les graines continuent leur maturation pendant un bon mois encore. Dès le jaunissement des feuilles, le brunissement des follicules, la récolte peut être faite à l'automne pour séchage à l'ombre [23].

Dans les régions chaudes, avec un hiver doux, comme en Inde, les graines sont semées en automne-hiver pour une récolte au printemps-été.

1.8. Composition chimique

Les recherches sur la composition des graines de *Nigella sativa L.* ont débuté en 1880 avec Greenish, qui publia le premier rapport mentionnant la présence de 37% d'huiles et 4,1% d'éléments minéraux [24].

Par la suite, des études ont montré la présence d'une diversité de substances naturelles regroupant des lipides, des dérivés terpéniques, des flavonoïdes, des alcaloïdes et des saponines. *Nigella sativa L.* constitue également une importante source de protéines et de sels minéraux: phosphore, calcium, potassium, magnésium et sodium [25]. Les valeurs et proportions fournies par la littérature diffèrent d'un auteur à l'autre; la variété et l'origine des 19 échantillons peuvent en être partiellement responsables. Une approximation de la composition est donnée dans le **tableau 2**.

Tableau 2 : Composition des graines de *Nigella sativa*, d'après [26-31]

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

1.8.1. Lipides et stérols

Les graines de *Nigella sativa* renferment environ 0,4-2,5% d'huile essentielle, plus de 30%

d'huiles fixes [32, 29] et 38% de lipides totaux dont les phospholipides [33]. Les acides oléique et linoléique sont les deux acides gras majeurs de l'huile de *Nigella sativa* L., ils constituent 75% des acides gras totaux [34]. D'autres auteurs fournissent des valeurs différentes: les graines contiendraient 26,6% d'huiles dont 64,6% d'acide linoléique et 20,4% d'acide palmitique [35].

Le **tableau 3** représente la composition d'huile fixe des graines de *Nigella sativa* L. selon l'origine.

Tableau 3 : Composition (en pourcentage) des graines *Nigella sativa* L. en acides gras selon l'origine de l'échantillon par ordre décroissant, d'après [36].

Acide gras	Origine des graines		
	Ethiopie	Inde	Syrie
Linoléique	58	54,68	54,13
Oléique	23,46	25,67	24,51
Palmitique	12,07	13,15	14,64
Stéarique	2,7	2,97	2,6
Eicosadiénoïque	2,87	2,39	3,02
Linoléinique	0,47	0,68	0,69
Arachidique	0,2	0,25	0,2
Myristique	0,21	0,2	0,22
Saturés totaux	15,18	16,57	17,66
Insaturés totaux	84,82	83,43	82,34

Les stérols représentent environ 2% de l'huile fixe. La plupart sont retrouvés sous forme estérifiée et libre.

Le stérol majeur, le β -sitostérol représente à lui seul environ 60% des stérols, puis arrive le stigmastérol à environ 20%. On peut rencontrer le cholestérol à l'état de traces, c'est-à-dire environ 1% [37, 38].

1.8.2. Composés aromatiques

Il a été considéré que la plupart des activités pharmacologiques attribuées à *Nigella sativa* L. provenaient de son huile essentielle. C'est pourquoi dès 1960 des études ont été entreprises sur les constituants de cette huile volatile [39].

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 [40]. Burits et Bucar en 2000, ont identifié par GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectroscopy*), 32 constituants dont la majorité sont des monoterpènes : *p*-cymène (38%), thymoquinone (30%), carvacrol (5-11) %, α -pinène (5-14) %, β -pinène (5%), limonène (4%), longifolène (1,2-8) %, 4-terpinéol (1,98-6,59) % et *t*-anéthol (0,25-4,28) % [41].

La présence de thymohydroquinone, de thymol, de produits d'oxydation de la thymoquinone, comme la dithymoquinone sont également été signalés (*figure 5* et tableau 4).

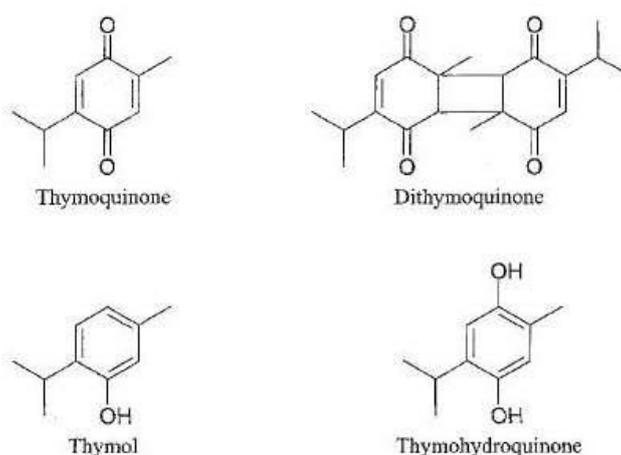


Figure 5 : Représentation chimique de thymoquinone et de ses dérivés retrouvés dans l'huile essentielle de *Nigella sativa* L., d'après [42]

1.8.3. Saponosides

Les saponosides sont des hétérosides de stérols ou de triterpènes. Ce sont des composés très répandus dans le règne végétal. Solubles dans l'eau, ils libèrent par hydrolyse un ou plusieurs oses et une génine (sapogénine). La première saponine isolée par Greenisch en 1882 à partir des graines de *Nigella sativa* L. est la mélianthine, dont l'aglycone est l'hédéragénine [24].

Récemment, d'autres saponosides ont pu être isolés à partir d'un extrait éthanolique des graines de *Nigella sativa* L. dont le 3-O-[beta-D-xylopyranosyl-(1-3)-alpha-L-rhamnopyranosyl -(1-2)- alpha-L-arabinopyranosyl]-2 [43], alors que de nombreux autres saponosides ont pu être déterminés à partir des huiles de *Nigella sativa* L. [34].

1.8.4. Polyphénols et flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés aromatiques dont la biosynthèse constitue l'un des processus fondamentaux de la phytochimie. Ils font partie de ce que l'on appelle les composés phénoliques. Les flavonoïdes sont des substances généralement colorées très répandues chez les végétaux. Les Renonculacées sont un groupe riche en flavonols et en flavones. En 1997,

trois nouveaux flavonoïdes triglycosylés ont été isolés à partir des graines de *Nigella sativa* L. et leurs structures ont été déterminées [44] :

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.

En 2008, quatorze composés phénoliques ont été isolés à partir d'un extrait méthanolique de pousses et de racines de *Nigella sativa* L. Ceux-ci sont: l'acide gallique, l'acide parahydroxybenzoïque, l'acide chlorogénique, l'acide vanillique, l'acide *para*-coumarique, l'acide férulique, l'acide *trans*-2-hydroxycinnamique, l'acide *trans*-hydroxycinnamique, l'épicatéchine, la catéchine, la quercétine, l'apigénine, l'amentoflavone et la flavone [45].

1.8.5. Alcaloïdes

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

Les plus importants alcaloïdes de *Nigella sativa* L. (figure 6 et tableau 4), ont été isolés à partir des graines entre 1985 et 1995 :

1. Nigellicine, à noyau indazole [46]
2. Nigellimine, une isoquinoléine [47]
3. Nigellimine N-oxyde, dérivé N-oxyde de la nigellimine [48]
4. Nigellidine, également un indazole [49].

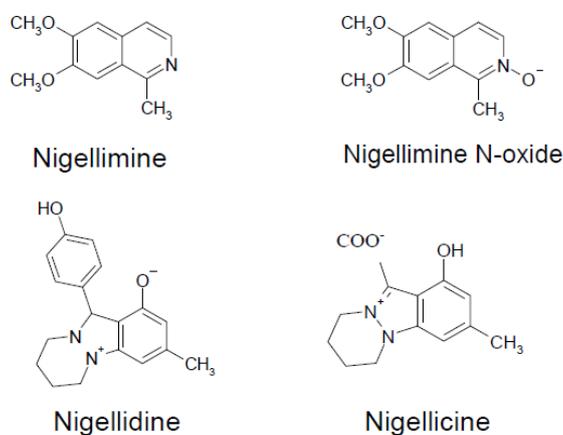


Figure 6 : Structure chimique des principaux alcaloïdes de *Nigella sativa* L., d'après [49]

1.8.6. Les protéines

Les graines de *Nigella sativa* L. sont très riches en protéines (environ 20 %), avec dominance d'acide glutamique (22,4%), d'acide aspartique (10,05%) et d'arginine (9,18%) [50].

La protéine la plus étudiée jusqu'à maintenant est la lipase qui catalyse des réactions de trans-estérification [51]. L'analyse des acides aminés de l'hydrolysate de ces protéines révèle la présence de 17 acides aminés y compris les 8 acides aminés essentiels (tableau 4) [26, 52].

1.8.7. Les vitamines et sels minéraux

La composition en vitamines a été déterminée et révèle la présence des vitamines A, B1, B2, B6 et de l'acide folique [53].

Les tocophérols totaux constituent (0,05%) d'huile, et sont constitués majoritairement de l' α -tocophérol (48%) et du γ -tocophérol (28%). D'autres vitamines liposolubles comme le β -carotène (0,05%) et la vitamine K1 (0,1%), sont présentes (tableau 4).

Des travaux sur la composition minérale de la graine de *Nigella sativa* L. ont rapporté que sa teneur en potassium est importante (1,18%) de poids total de la graine et que le calcium, le fer, le sodium représentent (0,188 ; 0,0575 et 0,0853) % respectivement [53]. La teneur des graines en sélénium a été également déterminée, elle représente (0,27 à 0,54) mg/kg de graines [54].

Tableau 4: Principaux composés et molécules isolés de *Nigella sativa* L., d'après [55]

Composé	Nature	Partie de la plante
Alanine	AA	Graine
β -Amyrin	Triterpène	Huile de graine
Acide Arachidique	AG	Huile de graine
Acide Arachidonique	AG	Huile de graine
Acide Ascorbique	Vitamine	Feuille
Acide Aspartique	AA	Graine
5-déhydro-Avenastérol	Stéroïde	Huile de graine
7-déhydro-Avenastérol	Stéroïde	Huile de graine
Butyrospermol	Triterpène	Huile de graine
Campestanol	Stéroïde	Huile de graine
Carvacrol	Monoterpène	Huile de graine
Campestérol	Stéroïde	Huile de graine
Carvone	Monoterpène	Huile essentielle
Cholestérol	Stéroïde	Huile de graine
Citrostadienol	Triterpène	Huile de graine
Cycloartanol	Triterpène	Huile de graine
Cycloarténol	Triterpène	Huile de graine
Cycloeucalénol	Triterpène	Huile de graine
Cystine	AA	Graine
Damascenine	Alcaloïde	Plante entière
Méthyl-Damascenine	Alcaloïde	Graine
Dithymoquinone	Monoterpène	Huile de graine
Dna	Alcaloïde	Racine
Acide Eicosadiénoïque	AG	Huile de graine
Huile Essentielle	Terpènes	Graine
Huile Fixe	Lipides	Graine
Flavonoïdes		Graine
Glucose	Osc	Graine
Acide Glutamique	AA	Graine
Gramistérol	Stéroïde	Huile de graine
Hederagénine	Triterpène	Graine
Acide Indole-3-acétique	Auxine	Tissu du calice
Leucine	AA	Graine
Acide Linoléique	AG	Huile de graine
Acide Linoléinique	AG	Huile de graine
Lysine	AA	Graine
Melanthine	Saponoside	Graine
Acide Myristique	AG	Huile de graine
Nigellicine	Alcaloïde	Graine
Nigellidine	Alcaloïde	Graine

Nigellimine	Alcaloïde	Graine
Nigellimine-N-Oxide	Alcaloïde	Graine
Nigelline	Alcaloïde	Huile essentielle
Nigellone	Polymère de thymoquinone	Graine
Obtusifoliol	Stéroïde	Huile de graine
Acide Oléique	AG	Huile de graine
Acide Palmitique	AG	Huile de graine
Acide Palmitoléique	AG	Huile de graine
Protéines	Protides	Graine
Saponine	Triterpènes	Graine
β Sitostérol	Stéroïde	Huile de graine
α Spinastérol	Stéroïde	Huile de graine
Acide Stéarique	AG	Huile de graine
Stigmastanol	Stéroïde	Huile de graine
Stigmastérol	Stéroïde	Huile de graine
Taraxérol	Triterpène	Huile de graine
Acide Telfarique	AG	Huile de graine
Thymol	Monoterpène	Huile de graine
Thymoquinone	Monoterpène	Huile de graine
Tirucallol	Triterpène	Huile de graine
Tryptophane	AA	Graine
Valine	AA	Graine

1.9. Propriétés chimiques

On extrait l'huile essentielle de *Nigella sativa* L. par hydro-distillation, obtenue par première pression à froid. La plupart des vertus thérapeutiques d'huile de nigelle sont dues à la thymoquinone qu'est une molécule incontournable. Le constituant majeur d'huile volatile a été synthétisé en 1941 par Kremers et son équipe à partir du thymol [56].

La thymoquinone ou 2-isopropyl-5-méthyl-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 C₁₀H₁₂O₂, et son poids moléculaire de 164,2 g/mol [57, 58].

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.

La polymérisation de la thymoquinone permet d'obtenir la nigellone, elle retiendrait la plupart

des propriétés pharmacologiques de la thymoquinone et serait dénuée de tout effet toxique [59].

1.10. Usage à travers le monde

1.10.1. Usages comme épice

Les graines de nigelle entières ou moulues sont utilisées comme épice. Elles servent à saupoudrer le pain, le *Naan* (pain de régions d'Asie centrale et du sud) et les pâtisseries, les plats sucrés, les fromages, les sauces et les soupes pour les rendre plus appétissants. Elles sont également utilisées en accompagnement des graines de sésame dans la cuisine traditionnelle d'Asie, et sont ajoutées à différents plats selon les envies [60].

Dans la région du Bengale, entre l'Inde et le Bangladesh, le cumin noir entre dans les recettes de légumes secs et dans la composition de certains mélanges d'épices comme le *panch phoron*, composé de cinq épices: le cumin, le fenouil, la moutarde, le fenugrec et la nigelle (*figure 7*) [61].



Figure 7 : *Panch phoron*, d'après [61]

En Afrique du nord, la graine de nigelle moulue entre dans la composition du *ras el hanout*, un mélange de 24 à 27 épices (*figure 8*). En Égypte, les graines pulvérisées aromatisent le café à raison de 6 cuillères à café pour une cuillère de nigelle. En France, on l'utilise comme le poivre [60].



Figure 8 : *Ras el hanout*, d'après [62]

1.10.2. *Nigella sativa* L. d'après la médecine traditionnelle

Dans la médecine Ayurvédique, le *kalonji* est utilisé en cas d'indigestion, de douleurs menstruelles, d'inflammation bronchique et comme anthelminthique.

En médecine *Unani*, la graine de nigelle est considérée comme abortive et diurétique, elle est utilisée pour les ascites, la toux, la douleur oculaire, l'ictère, la paralysie, les hémorroïdes et la fièvre tierce [63].

En Indonésie, les graines sont ajoutées à des médicaments astringents pour lutter contre les désordres intestinaux [63].

En Malaisie, des cataplasmes de graines sont utilisés pour les maux de tête, les abcès, les ulcères nasaux, l'orchite et le rhumatisme. Les femmes Arabes utilisent la graine de *Nigella sativa* L. comme galactogène [63].

En Égypte, elle est utilisée contre l'asthme [64].

En usage externe sous forme de pommade, les graines sont utilisées dans le traitement d'abcès, d'hémorroïdes, d'inflammation des testicules et de pédiculose [63, 65].

En Arabie Saoudite, l'huile est utilisée en usage externe en cas de raideur et de douleurs articulaires, ainsi qu'en cas d'asthme et d'eczéma [36].

En Turquie, l'huile de graine est employée par voie orale pour ses vertus carminatives, bronchodilatatrices, expectorantes, antihypertensives, diurétiques, diaphorétiques, stomachiques et pour lutter contre l'indigestion; en friction elle est préconisée contre les spasmes musculaires, la sciatique et les rhumatismes [66].

La graine et l'huile de cumin noir, prises seules ou en plus d'autres médicaments, sont efficaces contre l'alopecie, le vitiligo et d'autres problèmes dermatologiques [45].

La *figure 9* résume bien toutes les indications médicales traditionnelles.

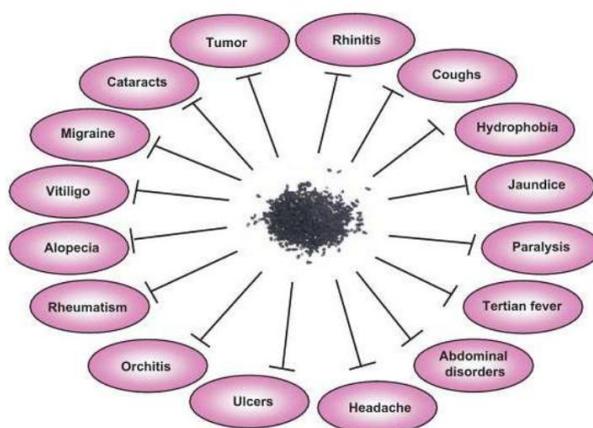


Figure 9 : Usages traditionnels de *Nigella sativa*, d'après [63]

1.10.3. Indications et mode d'emploi selon Avicenne

Les médecins Musulmans et Arabes se sont doublement préoccupés de la graine de nigelle après l'avoir connue dans la Tradition Prophétique. Avicenne a consacré un chapitre à la nigelle, « *chounèse* », dans son *Canon de la médecine*, « *Kitab Al Qanûn fi Al-Tibb* ». Voici quelques indications et utilisations de *Nigella sativa* L. à cette époque.

➤ Vertus médicinales :

La graine est âcre et élimine la lymphe, elle sert à éliminer les flatulences et à purifier le corps.

➤ Maladies superficielles :

Elle traite les verrues et le vitiligo. Mélangée au vinaigre, la graine est appliquée sur la peau pour traiter les « pustules lactées », les « tumeurs pituitaires » et la gale ulcéreuse.

➤ Organes de la tête :

En cas de fièvre grippale, la graine est broyée, cuite, puis mise dans un chiffon de lin et appliquée sur le front des malades. Trempées pendant une nuit dans du vinaigre puis concassées, les graines sont données sous forme d'électuaire, ancienne forme galénique pâteuse, à respirer par le malade, pour guérir les douleurs chroniques de la tête et les paralysies faciales. C'est également un remède qui permet de désobstruer les voies aériennes supérieures. Quand la graine est cuite dans du vinaigre, la solution peut être utilisée en gargarisme pour lutter contre les douleurs dentaires.

➤ Organes de l'œil :

La drogue pulvérisée mélangée à l'huile d'iris, utilisée sous forme d'électuaire guérit des écoulements oculaires.

➤ Organes respiratoires :

Absorbée avec le carbonate de sodium cristallisé, la graine dégage les voies respiratoires.

➤ Organes sécrétoires :

Elle est vermifuge, même utilisée sous forme liquide en massant l'abdomen. La graine ingérée pendant quelques jours est emménagogue. Mélangée au miel et à l'eau chaude, la graine traite les calculs rénaux.

➤ Les fièvres :

La graine traite les fièvres « flegmatiques et atrabilaires ».

➤ Les cas d'intoxication :

Sa fumée fait fuir les insectes, mais certaines personnes ont prétendu que son utilisation fréquente ou excessive est mortelle. En outre, la graine de nigelle guérit la piqûre de tarentule,

une fois absorbée sous forme de boisson au poids d'un « drachme » (3,24 grammes) [9].

1.10.4. Propriétés reconnues de nos jours

Comme nous avons pu le remarquer, la nigelle a été délaissée en Occident pendant de nombreuses années, mais l'utilisation marquée en Orient a suscité un intérêt non négligeable des équipes de recherche médicale.

Durant les 20 dernières années, plusieurs travaux ont porté sur l'étude de *Nigella sativa* L., notamment sur les effets dus aux extraits de la graine de cette espèce ainsi qu'aux principaux constituants (notamment la thymoquinone) sur divers systèmes *in vitro* et *in vivo*.

La nigelle étant une épice aromatique, elle régule l'appétit et possède des propriétés digestives.

➤ **Propriétés gastroprotectrices :**

L'huile de nigelle réduit la formation d'ulcères gastriques induits par l'éthanol chez le rat [67].

➤ **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 [68].

➤ **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 [67, 69].

➤ **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 [67].

➤ **Propriétés analgésiques et anti-inflammatoires :**

Des recherches sur l'activité anti-inflammatoire de la thymoquinone et d'huile de nigelle sur des lymphocytes isolés du péritoine de rat, ont montré l'activité inhibitrice des cyclo-oxygénases et de la 5-hydroxy lipoxigénase [36]. Des propriétés antihistaminiques ont été observées avec la nigellone [70]. Une activité analgésique a été observée chez des souris absorbant l'huile des graines, ou de thymoquinone [71].

➤ **Propriétés anthelminthiques :**

Les graines et la fraction hétérosidique sont de très puissants anti-cestodes, contrairement aux

saponosides qui sont inactifs [67, 72]. 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 [73].

➤ **Propriétés immunostimulantes :**

Une diminution de la charge virale et une augmentation simultanée du taux sérique en IFN- γ et en cellules CD4⁺ ont été observées après injection d'huile de nigelle chez une souris infectée par un cytomégalo virus. Les souris traitées ont dix fois moins de virus que celles non traitées [74].

➤ **Propriétés antimicrobiennes :**

L'huile végétale, l'huile essentielle et la thymoquinone ont des activités antimicrobiennes vis-à-vis de nombreuses bactéries résistantes aux antibiotiques et vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Shigella spp.*, *Vibrio cholerae* et *Escherichia coli*, entre autres [64, 75-77].

➤ **Propriétés antitumorales :**

La thymoquinone potentialise les fonctions détoxifiantes du foie, de ce fait elle augmente le taux de glutathion et réduit les tumeurs [78]. 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 [79].

➤ **Autres propriétés :**

Des études ont montré l'effet diurétique et l'effet antihypertenseur qui en découle avec l'huile essentielle et thymoquinone [80].

Les graines sont galactogènes et l'huile essentielle est un bon antioxydant [41].

1.10.5. Produits à base d'huile de nigelle

Bien que toutes ces potentialités ne se soient pas encore concrétisées, de nombreux travaux soutiennent l'utilisation possible de *Nigella sativa* L. en thérapeutique. En effet, cette plante présente déjà des applications, notamment sous forme de gélules à base d'huile fixe revendiquant l'allégation « complément alimentaire à activité immunomodulatrice » (en Allemagne).

La plupart des produits à base d'huile de nigelle sont trouvés sur internet, le tableau 5 montre un aperçu des formes disponibles, les graines quant à elles sont trouvées dans toutes les épiceries.

Tableau 5 : Liste des produits à base de Nigelle vendus en France, d'après [20]

Huiles végétales biologiques de nigelle	
Abiessence	Flacon 50 et 100 ml
Centiflor	Flacon 100 ml
Centifolia	Flacon 100 ml
Emma Noel	Flacon vaporisateur de 50 ml, enrichie en vitamine E
Ferme des peupliers	Flacon en verre 250 ml
Herbes et Tradition	Flacon 50 ml
Hevea	Flacons 50 et 200 ml, composition : acide linoléique, acide oléique, acide palmitique, acide stéarique
Huiles et baumes	Flacon 30 ml
Hyteck	Flacons de 100 et 250 ml, et en berlingot de 10 ml
Karawan	Flacon 50 ml, composition : huile de nigelle, tocophérol
Melvita	Flacon 50 ml
Natessance	Flacon de 50 ml, huile de nigelle, vitamine E naturelle
Pranarom	Flacons 50, 100 m et 1 l
Sophery	Flacon 50 ml
Terrocean	Flacon 200 ml
Formes solides, capsules	
Abc de la nature	Boîtes de 60, 100 et 200 capsules en gélatine de poisson, d'huile végétale vierge première pression à froid dosées à 500 mg
Bioluxe	Pilulier de 120 capsules huileuses dosées à 500 mg d'huile de nigelle (procédé de la tunique de la gélule : aqua-marine exclusivement)
Biovedas	Boîte de 200 capsules dosées à 500 mg d'huile de nigelle, gélatine et glycérine : 200 mg
Boutique nature	Pilulier de 90 capsules d'origine marine dosées à 500 mg d'huile de nigelle, tunique : gélatine de poisson, glycérine, eau, amidon
Chifa	Pilulier de 60 capsules dosées à 500 mg d'huile de nigelle
Dieti Natura	Boîtes de 60 et 200 capsules dosées à 500 mg d'huile de nigelle, capsule gélatine et glycérine (200 mg)
Emma Noel	Capsules 515 mg comprenant 73,25 % d'huile vierge de nigelle biologique, 17,23 % de gélatine de poisson, 7,34 % de glycérol végétal, 1,08 % d'eau, 0,74 % d'huile vierge de germe de blé de première pression à froid, auxiliaire technologique : lécithine de soja
Floralpina	Capsules d'huile de nigelle
Ombelle Nature	Boîtes de 60 et 200 capsules dosées à 500 mg d'huile de nigelle
Terrocean	Boîtes de 200 capsules de 782 mg

2. *Camellia sinensis* L.

2.1. Historique

L'histoire du thé, boisson obtenue par infusion des feuilles du *Camellia sinensis* L., littéralement « Camellia Chinois », remonterait au III^{ème} millénaire avant J.C. selon la légende

chinoise.

Cependant, les premiers écrits faisant référence de manière indiscutable au thé datent de la dynastie des Han (206 avant J.C. – 220 après J.C.). De plus, à cette époque, l'usage du thé est confiné à la province actuelle du Sichan dans le sud-ouest de la Chine. Le thé se répand dans le pays parallèlement au bouddhisme avant de s'ancrer dans la culture du pays durant la dynastie Tang (618-907) grâce au célèbre Cha King ou « Classique du thé » du Maître Lu Yu. Durant cette dynastie, apparaît le caractère Cha encore utilisé de nos jours pour désigner le thé. Ce sinogramme possède deux prononciations différentes: « ch'a » en mandarin et cantonais, qui vient du verbe « cueillir », et « t'e » en dialecte chinois Minnan pratiqué dans la région d'Amoy (actuelle Xiamen), au sud-est de la Chine. Ces deux prononciations sont à l'origine des différences observées dans l'appellation du thé au travers le monde. Le thé a voyagé soit par la voie de la soie terrestre soit par la voie maritime. Les pays ayant découvert le thé par la voie terrestre, comme l'Afghanistan, le Tibet et le Japon par exemple, se servent du « tch » ou « ch » provenant du mot cantonais. Les pays d'Europe n'ont, eux, connu le thé que bien plus tard par la voie maritime mise en place par les Hollandais (XVII^{ème} siècle), voie qui partait de la région d'Amoy. Dans ces pays, le thé est désigné par un mot commençant par « t » : tea, tee, thé. Ainsi le thé n'apparaît en Europe qu'au cours du XVII^{ème} siècle, d'abord en Hollande puis en France et enfin en Angleterre [81].

A cette époque, les émigrants anglais et hollandais emportent également avec eux le thé vers le nouveau monde. L'enjeu économique est tel qu'il donne alors lieu à des courses de vitesse entre les tea-clippers, voiliers légers utilisés pour le transport du thé sur les grandes routes maritimes entre l'Europe et l'Amérique. En 1773, les colons installés à Boston décident de boycotter ces importations trop lourdement taxées et le 16 décembre, jettent à la mer une cargaison de thé venant d'Angleterre; cet acte, appelé « Boston tea party », marque la première étape de la guerre d'indépendance. Au milieu du XIX^{ème} siècle, pour faire face à une demande occidentale croissante, les Anglais développent des plantations en Inde puis dans l'île de Ceylan (Sri Lanka). A la fin du XIX^{ème} siècle, le thé est implanté dans de nombreux pays d'Asie, dans les pays d'Afrique Noire anglophones tel que le Kenya puis en Amérique du Sud.

Actuellement, le thé est la boisson la plus consommée dans le monde après l'eau plate. La production mondiale a atteint 3 459 000 tonnes en 2005 [82], répartie principalement entre la Chine et l'Inde. Ces deux pays sont aussi les premiers pays consommateurs ce qui rend le marché du thé assez singulier. En effet, le plus grand pays exportateur est le Kenya, 3^{ème} pays

producteur avec seulement 9 % de la production mondiale.

Par ailleurs, les pays producteurs consomment en moyenne moins de thé par an et par habitant que les pays importateurs.

Malgré une consommation moyenne par an et par habitant plus faible et étant donné le nombre d'habitants, l'Inde est restée, le plus grand consommateur de thé au monde avec 22 % de la consommation mondiale, devant la Chine (20 %), la Russie (5 %), le Japon (4,5 %), le Pakistan et le Royaume-Uni (3,8 %) et les États-Unis (3 %) [83]. La consommation mondiale a augmenté en moyenne de 2,25 % par an durant la dernière décennie. Ceci est en partie dû aux nombreuses études vantant les bienfaits du thé pour la santé.

Ainsi, l'empereur Chen-Nung disait « Le thé éveille les humeurs et les pensées sages. Il rafraîchit le corps et apaise l'esprit. Si vous vous sentez abattus, le thé vous rendra force. » [84]. D'après les études récentes, le thé semble réduire le taux de cholestérol, soigner les problèmes d'hypertension, empêcher la formation de caries dentaires, posséder des propriétés antioxydantes et anti-microbiennes et protéger contre les maladies cardio-vasculaires et les cancers [85-87].

2.2. La culture du thé

Le théier ou *Camellia* (L.) (*Figure 10*). O. Kuntze (espèce) appartient au genre *Camellia* L. de la famille des *theaceae* de l'ordre des *Theales* [88]. Il existe deux variétés principales, la variété *sinensis* (de Chine) utilisée plus particulièrement pour la production de thés verts avec des feuilles petites et vert olive et la variété *assamica* (d'Assam) utilisée pour les thés noirs à la pousse large, claire et charnue. Le théier est un arbre à feuilles persistantes pouvant atteindre 10 à 15 m voire 30 m pour des arbres plusieurs fois centenaires.

Dans les plantations appelées « *gardens* » (jardins) ou « *estates* » (propriétés), les arbres sont taillés à environ 1 m du sol pour former la « *table de cueillette* » qui facilite la récolte manuelle et favorise la croissance des bourgeons [89]. Grâce aux différentes méthodes d'hybridation comme le greffage ou le bouturage, de nombreux croisements, appelés « *jats* » ou « *clonal* » sont apparus.



Figure 10: *Camellia sinensis* (L.)

2.3. Le milieu de culture

Le théier croît entre le 42^{ème} degré de latitude nord dans l'hémisphère nord et le 31^{ème} degré de latitude sud dans l'hémisphère sud. Le sol des plantations a une influence sur la qualité des feuilles. Il ne doit être ni calcaire ni argileux mais de préférence alluvionnaire ou volcanique [89]. Le sol doit également être meuble pour permettre à la racine centrale de descendre jusqu'à 6 m de profondeur et plutôt acide (entre pH 3,9 et 7,1). Il doit être en pente car le théier ne supporte pas l'eau stagnante. Le deuxième élément important est le climat qui doit être sans nuage et offrir des nuits fraîches, des vents réguliers et secs. La température doit être comprise entre 10 et 30 °C. Si celle-ci passe en dessous de -5 °C, le théier meurt. Les besoins en eau sont de l'ordre de 2000 à 3000 mm par an et de préférence la nuit. Une hygrométrie de l'air située entre 70 et 90 % et un ensoleillement de 5 h par jour sont recommandés.

La maladie la plus redoutée est une maladie touchant les feuilles : *Exobasidium vexans* (Masse) ou Blister blight (cloque). Elle est due à un champignon et est caractérisée par l'apparition de taches circulaires. Lorsque ces cloques éclatent des milliers de spores sont dispersés dans l'air, contaminant ainsi les plantes alentours.

2.4. Le cycle végétal

Camellia sinensis L. étant un arbre, sa pousse dépend des conditions climatiques. Les périodes de récolte, « flush », alternent avec des périodes de dormance (tableau 6). Les périodes de récolte sont divisées en cycles durant entre 4 et 14 jours. Le plus souvent, ces cycles durent 7 jours. Dans certains pays comme l'Inde et l'Indonésie, les récoltes peuvent avoir lieu toute l'année.

Tableau 6: Cycle naturel du théier [89].

Janv.	Fév.	Mar.	Avr.	Mai	Juin	Juil.	Août	Sept.	Oct.	Nov.	Déc.
Dormance	Première récolte			Récolte de printemps		Dormance			Récolte d'automne		Dormance

La cueillette s'effectue manuellement ou mécaniquement. Les feuilles récoltées à la main sont pincées entre le pouce et l'index puis envoyées dans une hotte tressée. La qualité du thé ou « grade » dépend du type de cueillettes. Elle est définie par ordre décroissant à partir du type de feuilles en partant de l'extrémité de la tige. Ainsi se trouve en premier lieu sur la table de cueillette un bourgeon appelé « pekoe » ou « Flowery Orange Pekoe », signifiant « duvet blanc ». Il s'agit en réalité d'une feuille non développée. Puis, plus éloignées de l'extrémité de la tige, se trouvent des feuilles de plus en plus mûres qui portent des noms différents (*figure 11*). Les types de cueillettes dépendent du nombre de feuilles ramassées avec le Flowery Orange Pekoe.

Ainsi, en règle générale, les cueillettes sont :

- la cueillette impériale : Pekoe + 1 feuille
- la cueillette fine : Pekoe + 2 feuilles
- la cueillette classique : Pekoe + 3 feuilles ou plus.

La dénomination peut varier suivant les régions

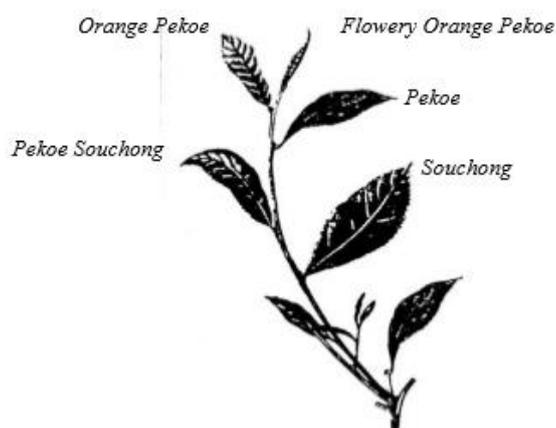


Figure 11: Classification des feuilles de thé [81]

2.5. Les procédés de traitement des feuilles de thé fraîchement cueillies

Les feuilles de thé sont commercialisées sous trois formes principales : les thés verts (25 % de

la production mondiale en 2005), noirs (70 % de la production mondiale en 2005) et semi fermentés ou Oolong (5 %). La différence est due aux traitements subis par les feuilles fraîchement cueillies (*figure 12*).

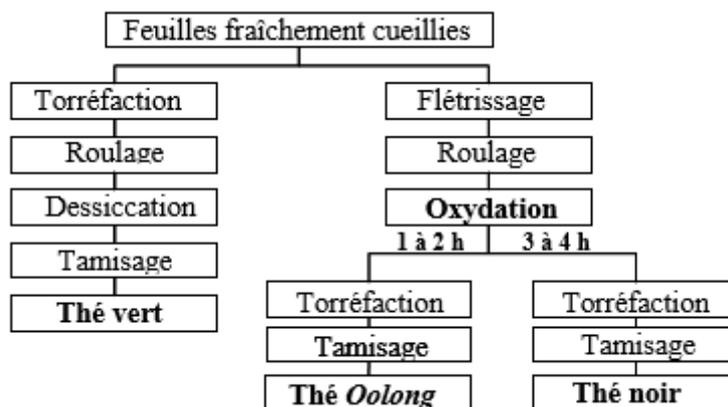


Figure 12: Principales étapes du traitement des feuilles de théier après récolte

La torréfaction consiste à chauffer les feuilles quelques minutes à 100 °C en atmosphère humide pour inhiber les enzymes responsables de l'oxydation. Cette phase dure entre 30 s et 5 min pour les thés verts et Oolong et entre 15 et 20 min pour les thés noirs [89].

Durant le flétrissage, qui dure entre 16 et 32 h suivant le procédé utilisé, les feuilles sont exposées à l'air chauffé (< 35 °C) afin de les déshydrater pour les rendre plus souples et permettre de les rouler sans les briser. La teneur en eau des feuilles est réduite de 50 % environ.

Le roulage, dans le cas des thés verts et Oolong, a pour but de donner une forme de bâtonnet aux feuilles. Dans le cas des thés noirs, les feuilles sont roulées afin de rompre la paroi cellulaire et permettre la libération des enzymes polyphénoloxydases et peroxydases qui vont oxyder les polyphénols. Ces enzymes sont des complexes métalloprotéiques contenant généralement un site actif formé de deux atomes de cuivre, l'oxygène jouant le rôle d'accepteur d'électrons. Leur activité est optimale pour un pH compris entre 4,6 et 5,6 [90].

Dans le cas des thés noirs et Oolongs, après le roulage et avant la fermentation, les feuilles peuvent subir deux procédés différents: le procédé orthodoxe ou le procédé Crush Tear Curl (CTC) qui signifie « broyer, déchiqueter, enruler ». Avec le procédé orthodoxe, les feuilles sont roulées dans des machines spécialement conçues pour briser les parois cellulaires sans détruire la feuille. Dans le cas du procédé CTC, les feuilles sont écrasées entre deux rouleaux tournant en sens inverse. Ces deux procédés sont les plus couramment utilisés. Les thés noirs

en sachet sont obtenus le plus souvent par le procédé CTC alors que les thés en feuilles entières subissent le procédé orthodoxe.

2.6. Composition des feuilles de thé

Les feuilles de thé fraîches contiennent en règle générale 36 % de composés polyphénoliques, 25 % de glucides, 15 % de protéines, 6,5 % de lignines, 4 % d'acides aminés, 2 % de lipides, 1,5 % d'acides organiques, 0,5 % de chlorophylles et de caroténoïdes et enfin moins de 0,1 % de substances volatiles [91], ainsi que des éléments minéraux environ 3 % (tableau 7). Les éléments constitutifs de la paroi cellulaire représentent environ 45 % de la matière sèche des feuilles de thé [92].

Tableau 7: Composition chimique des feuilles de thé, exprimée en pourcentage par rapport au poids sec de drogue [93], [94], [95]

Composés de la feuille de thé fraîche	Pourcentage de la matière sèche
Polyphénols	20 à 36%
Flavonols	25%
Acides phénols	3%
Bases puriques	
Caféine	2 à 4% ou plus
Théophylline	0.02 à 0.04%
Théobromine	0.15 à 0.2%
Glucides	5 à 25%
Protéines	15%
Acides aminés	3 à 4%
Lipides	2 à 3%
Minéraux	3 à 5%
Cellulose	7%
Caroténoïdes	<0.1%
Chlorophylle	0.5%
Composés volatils	0.01 à 0.02%
Cendres	5%

2.6.1. Les polyphénols

Il s'agit d'une classe très vaste, regroupant plusieurs familles chimiques.

- les flavonoïdes : catéchines ou flavanols, flavonols
- les acides-phénols
- les tanins

2.6.2. Les bases puriques

- la caféine, le composant majeur de cette famille chimique
- la théophylline et la théobromine en concentrations nettement inférieures

2.6.3. Les composés minéraux

L'analyse de feuilles de thé d'origine diverses a montré la présence d'un minimum de quarante éléments minéraux différents dont les ordres de grandeurs des concentrations varient du nanogramme au milligramme par gramme de matière sèche [96-98]. Les teneurs moyennes des feuilles en ces éléments sont reportées dans le tableau 8.

Tableau 8: Concentration totale en éléments minéraux des feuilles de thés verts (TV), thés noirs (TN) et thés Oolong (TO)

Thé étudié	Concentrations (µg/g)						Concentrations (µg/g)				Réf
	K	Ca	Mg	Al	Mn	Fe	Na	Zn	Cu	Ni	
1 TN^(a)	17±	4,6±	2,07±	0,81±	0,50	0,13	37± 4	36,6	27,7	8,1±	(1)
	1	0,1	0,03	0,06	±	±		± 0,7	± 0,7	0,2	
					0,01	0,05					
1 TN	n.m.	4,5±	2,28±	0,90±	0,73	0,13	n.m. ^(c)	28±	19±	6±	(2)
	. ^(d)	0,2	0,02	0,01	±	±	d)	2	1	1	
					0,02	0,01					
21 TV^(b)											
8 TN	20±	3,4±	n.m. ^(c)	n.m. ^(c)	0,7±	0,3±	n.m. ^(c)	39±	18±	8±	(3)
	3	0,9	d)	d)	0,3	0,2	d)	9	7	4	
5 TO^(c)											

(a): Thé noir (1): Matsuura et coll. (2001)

(b): Thé vert (2): Odegard et coll. (1997)

(c): Thé Oolong (3): Xie et coll. (1998)

(d): Non mesuré

L'élément majoritaire est le potassium avec des teneurs de l'ordre de 20 mg/g puis viennent le calcium, le magnésium, l'aluminium, le manganèse et le fer. Les teneurs en zinc, cuivre et

nickel sont de l'ordre du $\mu\text{g/g}$.

Les feuilles de thé contiennent également des anions comme les fluorures, les chlorures, les sulfates et les phosphates présents respectivement à des concentrations de l'ordre de 2 mg.L^{-1} , 20 mg.L^{-1} , 30 mg.L^{-1} et 20 mg.L^{-1} [99, 100].

2.6.4. Les vitamines

La feuille de thé vert est plus riche en vitamines que celle de thé noir, la fermentation à une température supérieure à $30 \text{ }^\circ\text{C}$ en dégradant une grande partie; la vitamine C sera notamment absente dans la feuille de thé noir. [101] Parmi ces vitamines (tableau 9) on peut citer la vitamine C ou acide ascorbique, avec une teneur de (2 à 2,5) g/kg de feuilles desséchées de thé vert, et en moindre quantité pour celles du thé Oolong [102], la vitamine E, ainsi que certaines vitamines du groupe B. Le thé vert protégeait les équipages des clippers du scorbut pendant le transport maritime de cette denrée au 16^{ème} et 17^{ème} siècle.

Tableau 9: Composition de la feuille de thé en vitamines du groupe B [101]

Quantité en microgrammes (μg) par 100 g de feuille de thé noir, vert et oolong	
Thiamine (vitamine B1)	135
Riboflavine (vitamine B2)	1266
Niacine (vitamine B3)	7500
Acide panthoténique (vitamine B5)	1260
Inositol (vitamine B7)	1000
Biotine (vitamine B8)	82.5
Acide folique (vitamine B9)	76

3. *Erica multiflora* L.



Figure 13: *Erica multiflora* L

3.1. Classification

Règne	Plantes
Embranchement	Spermaphytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Ordre	Ericales
Famille	Ericacées
Genre	<i>Erica</i>
Espèce	<i>Erica multiflora</i> L.

La Bruyère, appelée aussi Callune, est un arbuste commun en Écosse et en Angleterre, pouvant atteindre 60 cm de haut. Ses branches portent de petites feuilles écailleuses sessiles disposées à plat et des grappes de fleurs blanc vif en forme de clochettes. Les sommités fleuries permettent d'obtenir une teinture jaune ou verte.

Par son aspect décoratif, elle donne aux lieux où elle pousse un charme particulier; falaises maritimes, landes, bois clairs aux sols pauvres comme la forêt de Sologne, se colorent en fin d'été des tonalités violettes de ces fleurs.

Certains gibiers comme le coq de bruyère, du genre tétras, vivent dans cette végétation. La plante est un excellent nectarifère, fournissant aux abeilles l'abondante matière d'un miel brun recherché pour la fabrication du pain d'épice.

Les racines sont employées à la confection des pipes, et les ramures, en Bretagne, servent en guise de chaume à recouvrir les granges.

Pour la culture de plantes délicates, les jardiniers utilisent la terre de bruyère formée par la décomposition de ce végétal dans les couches superficielles du sol [103].

Les feuilles sont simples, généralement alternes (c'est à dire qu'une seule feuille est insérée sur chaque nœud de la tige) et souvent recourbées pour mieux résister à la sécheresse. Les fleurs présentent des couleurs variables allant du blanc ou rose pâle à des nuances plus soutenues. Les 4 ou 5 sépales sont soudés à la base et la corolle est constituée de 4 à 5 pétales, généralement soudés, formant un tube à l'origine. Les étamines sont nombreuses. Le fruit est une capsule sèche ou une baie.

Les bruyères sont nombreuses dans les landes, sur les tourbières et autres terrains acides. La plus grande partie des 400 espèces de bruyères se rencontre dans les régions proches de l'Himalaya, de la Nouvelle-Guinée et en Afrique du Sud. Certaines espèces sont cultivées,

pour les jardins, à des fins décoratives. D'autres sont utilisées en phytothérapie pour leurs vertus diurétiques et antiseptiques [104].

3.2. Synonymes

Calluna erica Dec., *Erica vulgaris* L, Béruee, brande, breuvée, bucane, grosse, pétrolle.

3.3. Indication

Comme la busserole et comme beaucoup d'autres plantes de la famille des Ericacées, la Bruyère renferme de l'*arbutine* qui se dédouble dans l'économie en sucre et en hydroquinone: ce principe y est associé à de fortes proportions de tanin, à une matière résineuse, l'*éricoline*, et à une huile d'odeur désagréable, l'*éricinol*.

Si l'on croit les étymologistes, le nom latin de la bruyère (*erica*) dérivé du verbe grec **ἐρείχαιν** (briser), contiendrait une allusion à la vertu qu'on lui attribue, de temps immémorial, de briser les calculs urinaires [103].

3.4. Propriétés Médicinales

On utilise principalement les sommités fleuries avec les feuilles. L'application de compresses imbibées de décoction se révèle efficace contre les douleurs rhumatismales. Plus courant, surtout en montagne, le produit de la macération alcoolique de bruyère et de rhododendron est utilisé en liment dans les cas d'arthrites et de rhumatismes. Les compresses bouillantes de bruyère étaient utilisées pour soigner les engelures [105].

➤ Usage Interne

En usage interne, on utilise la Bruyère pour soigner les cystites avec pyurie, la colibacillose, la phosphaturie, l'albuminurie, les pyélonéphrites, les oliguries, les rhumatismes et les pertes blanches.

➤ Usage Externe

En usage externe, on utilise la Bruyère pour traiter la goutte, les névralgies rhumatismales, les paralysies, les dartres et les tâches de rousseur.

Références :

- [1].Hegi, G. *Illustrierte Flora von Mitteleuropa* (éd. 2nd edn., Vol. III). Berlin: Parey, 1975.
- [2].Dioscorides, P. *De materia medica*. (M. AUFMESSER, Trad.) Hildesheim: Olms-Weidmann, 2002.
- [3].The Goblin. *Nigella sativa*. Sur Wikipedia:
http://en.wikipedia.org/wiki/File:Nigella_Sativa_Seed.jpg
- [4].Bittkau, C., & Comes, H.-P. Evolutionary processes in a continental island system: molecular phylogeography of the Aegean *Nigella arvensis* alliance (Ranunculaceae) inferred from chloroplast DNA. *Molecular Ecology*, 2005. (14): 4065-4083.
- [5].Saidi, B. *La graine de Nigelle : remède sacré ou sacré remède?* Paris: Iqra et Les Quatres Sources, 2010.
- [6].Chamseddine, A. *La curation par la graine noire d'après la sunna prophétique et la médecine antique et moderne* (3e éd.). (A. ABBOUD, Trad.) Beyrouth: Dar-Al-Kotob Al-Ilmiyah, 2006.
- [7].Alami, S. *La phytothérapie ancestrale actuelle et d'avenir*. Thèse de Médecine, Casablanca, 1989.
- [8].Al-nassimi, M. *La médecine moderne et la science du prophète* (éd. 3^e édition). Damas: Acharika, 1984.
- [9].Ibn-sina. *La loi de la médecine, le livre des médicaments et des plantes*. Beyrouth: Maktab Attollab, 1972.
- [10]. Ibn al-qaîm, A. *La médecine du prophète*. Beyrouth: Al fikr, 1957.
- [11]. Mabberley, D. *The plant-book. A portable dictionary of the vascular plants*. New York: Cambridge University Press, 1987.
- [12]. Dupont, F., & Guignard, J.-L. *Botanique : systématique moléculaire*. Elsevier Masson, 2007.
- [13]. Spichiger, R.-E. *Botanique systématique des plantes à fleurs: une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tropicales*. PPUR presses polytechniques, 2002.
- [14]. Plantes et Botanique. *Botanique*. Sur PLANTES ET BOTANIQUE:
http://www.plantes-botanique.org/sousclasse_magnoliidae
- [15]. The angiosperm phylogeny group. *An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III*.

Botanical Journal of the Linnean Society, 2009.

- [16]. *Botaniske undervisningstavler*. Sur BIOLOGISK INSTITUT - KØBENHAVNS UNIVERSITE: <http://www.bi.ku.dk/tavler/thumb.asp?ID=79>
- [17]. Tutin, T. G., Heywood, V. H., Burges, N. A., Valentine, D. H., Walters, S. M., & Webb, D. A. *Flora Europaea* (2nd éd. 1993, Vol. I). Cambridge: Cambridge University Press, 1964.
- [18]. Zohary, M. *The genus Nigella (Ranunculaceae)-a taxonomic revision*. Springer-Verlag, 1983.
- [19]. Bonnier, G. *La grande flore en couleur*. Paris: Belin. (1990).
- [20]. Ghedira, K. La Nigelle cultivée : *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae). *Phytotherapie*, 2006. 4: 1-7.
- [21]. Guignard, J.-L. *Botanique systématique moléculaire* (éd. 12^e édition). Paris: Masson, 2001.
- [22]. Bayramoğlu, M. M., Toksoy, D., & Şen, G. *TÜRKİYE'DE TIBBİBİTKİ TİCARETİ*. Isparta, 2009.
- [23]. Anton, R., Teuscher, E., Lobstein-guth, A., Bauermann, U., Werner, M., Rohrner, C., et al. *Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles*. Paris: Médicales internationales, 2005.
- [24]. Greenish, H. *Contribution to the Chemistry of Nigella sativa*. Pharmac J Trans, 1880. Vol. 10.
- [25]. Aboutabl, E., El-azzouny, A., & Hammerschmidt, F. *Aroma volatiles of Nigella sativa L. seeds. Progress in Essential Oil Research*. Berlin, New York: Walter de Gruyter & Co, 1986.
- [26]. Aljassir, M. Chemical composition and microflora of black cumin (*Nigella sativa*) seeds growing in Saudi Arabia. *Food Chemistry*, 1992. 45: 239-242.
- [27]. Ansari, A., Hassan, S., Kenne, L., Atta-U-Rahman, & Wehler, J. Structural studies on a saponin isolated from *Nigella sativa*. *Phytochemistry*, 1988. 27: 3977-3979.
- [28]. Babayan, V., Kootungal, D., & Halaby, G. Proximate analysis, Fatty acid and amino acid composition of *Nigella sativa* seeds. *Food Sciences*, 1978. 43: 1314-1315.
- [29]. Hashim, F., & El-kiey, M. *Nigella sativa* seeds of Egypt. *J Pharm Sci UAR*, 1982. 3: 121-133.
- [30]. Menounos, P., Staphylakins, K., & Gegiou, D. The sterols of *Nigella sativa*

- seed oil. *Phytochemistry*, 1986. 25: 761-763.
- [31]. Rathee, P., Mishra, S., & Kaushal, R. Antimicrobial activity of essential oil, fixed oil and unsaponifiable matter of *Nigella sativa*. *Indian J Pharm Sci*, 1982. 44: 8-10.
- [32]. Dominiczak, A., Lazar, D., Das, A., & Bohr, D. Lipid Bilayer in genetic Hypertension. *Hypertension*, 1991. 18: 748-757.
- [33]. Martin, G., Duez, H., Blanquart, C., V, B., Poulain, P., Fruchart, J., et al. Statin-induced inhibition of the Rho-signaling pathway activates PPARalpha and induces HDL apoA-I. *J Clin Invest*. 2001. 107: 1423-1432.
- [34]. Abdel-aal, E., & Attia, R. Characterization of Black cumin (*Nigella sativa*) seeds. *Alexandria Sci Exch J*, 1993. 14: 497-482.
- [35]. Sener, B., Kusmenoglu, S., Mutlugil, A., & Bingol, F. A study with seed oil of *Nigella sativa*. *Gazi Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi*, 1985. 2: 1-7.
- [36]. Houghton, P., Zarka, R., de Las Heras, B., & Houlst, J. Fixed oil of *Nigella sativa* and eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation derived thymoquinone inhibit. *Planta medica*. 1995. 61: 33-36.
- [37]. Cheikh-Rouhou, S., Besbes, S., Lognay, G., Blecker, C., Deroanne, C., & H, A. Sterol composition of black cumin (*Nigella sativa*) and Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) seed oils. *J Food Comp Analysis*. 2008. 21: 162-168.
- [38]. Hamrouni-Sellami, I., Kchouk, M., & Marrzouk, B. Lipid and aroma composition of black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds from Tunisia. *J Food Biochem*, 2008. 32: 335-352.
- [39]. Mahfouz, M., & El-Dakhakhny, M. The isolation of a crystalline active principle from *Nigella sativa* seeds. *J Pharm Sci UAR*, 1960. 1: 9-19.
- [40]. Canonica, L., Jommi, G., Scolastico, C., & Bonati, A. The pharmacologically active principle in *Nigella sativa*. *Gazzetta chimica italiana*. 1963. 93:1404-1407.
- [41]. Burits, M., & Bucar, F. Antioxydant activity of *Nigella sativa* L. essential oil. *Phytother Res*, 2000. 14 (5): 323-328.
- [42]. *Orient bien-être, composition chimique de la graine de Nigella sativa*. Sur Orient bien-être: http://www.orient-bien-etre.com/cgibin/prog/pform.cgi?langue=fr&TypeListe=showdoc&Mcenter=galeriephoto&mot_cle=show=&ID_document=31
- [43]. Ansari, A., Osman, S., & Subbaram, R. Component acids of minor seed oils. *J*

Oil Technol Assoc India, 1975. 7: 26-27.

- [44]. Merfort, I., Wray, V., Barakat, H., Hussein, S., Nawwar, M., & Willuhn, G. Flavonoid triglycerides from seeds of *Nigella sativa*. *Phytochemistry*, 1997. 46: 359-363.
- [45]. Bourgou, S., Ksouri, R., Bellila, A., Skandrani, I., Falleh, H., & Marzouk, B. Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *C. R. Biologies*, 2008. 331: 48-55.
- [46]. Atta-Ur-Rahman, M., Cun-Heng, H., & Clardy, J. Isolation and structure determination of nigellicine, a novel alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Tetrahedron letters*, 1985b. 23: 2759-2762.
- [47]. Atta-Ur-Rahman, M., & Zaman, K. Nigellimine: a new isoquinoline alkaloid from *Nigella sativa*. *J Nat Prod*, 1992. 55: 676-678.
- [48]. Atta-Ur-Rahman, M., Ahmed, S., Choudhary, M., & Habib-Ur-Rahman. Nigellimine-N-oxide-a new isoquinoline alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Heterocycles*, 1985a. 23: 953-955.
- [49]. Atta-Ur-Rahman, M., Hassan, S., Choudhary, M., Ni, C., & Clardy, J. Nigellidine: a new indazole alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. *Tetrahedron letters*, 1995. 36: 1993-1996.
- [50]. Al-Gaby, A. Amino acid composition and biological effects of supplementing broad bean and corn proteins with *Nigella sativa* cake protein. *Die Nahrung*, 1998. 42: 290-294.
- [51]. Tuter, M., Aksoy, H., Ustun, G., Riva, S., Secundo, F., & Ipekler, S. Partial purification of *Nigella sativa* L. seed lipase and its application in hydrolytic reactions. Enrichment of γ -linolenic acid from borage oil. *J Am Chem Soc*, 2003. 80: 273-241.
- [52]. El-Obeid, A., Al-Harbi, S., Al-Jomah, N., & Hassib, A. Herbal melanin modulates tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 6 (IL-6) and vascular endothelial growth factor (VEGF) production. *Phytomedicine*, 2006. 13: 324-333.
- [53]. Nergiz, C., & Otlis, S. Some characteristics of *Nigella sativa* L. seed cultivated in Egypt and its lipid profile. *Food Chemistry*, 2003. 83: 63-68.
- [54]. Al-Saleh, I., Billedo, G., & El-Doush, I. Levels of selenium, DL- α -tocopherol, DL- γ -tocopherol, all-trans-retinol, thymoquinone and thymol in different brands of *Nigella sativa* seeds. *J Food Comp Analysis*, 2006. 19: 167-175.
- [55]. Benhaddou Andaloussi, A. Étude des propriétés antidiabétiques de *Nigella*

sativa L.: sites d'action cellulaires et moléculaires. Thèse de doctorat, Université de Montréal, Département de pharmacologie, Montréal, 2009.

- [56]. Kremers, E., Wakeman, N., & Hixon, R. *Thymoquinone* (Vol. 1). Organic Syntheses, 1941.
- [57]. Akram Khan, M. Chemical composition and medicinal properties of *Nigella sativa* Linn. *Inflammopharmacology*, 1999. 7 (1): 15-35.
- [58]. *Chemical compounds database*. Sur ChEMBASE: http://www.chembase.com/cbid_10281.htm
- [59]. Mahfouz, M., & El-Dakhkhny, M. Chemical and pharmacological properties of the new antiasthmatic drug, nigellone. *Egyptian Pharmaceutical Bulletin*, 1960. 42: 411-424.
- [60]. Vonarburg, B. *Natürlich*, 1998. 18: 65-68.
- [61]. *Panch phoron*. Sur Wikipedia, The Free Encyclopedia: http://en.wikipedia.org/wiki/Panch_phoron
- [62]. *Recettes de cuisine d'Afrique*. Sur Ras el hanout: <http://www.recettes-cuisine-afrique.info/?Ras-el-hanout>
- [63]. Aggarwal, B. B., & Kunnumakkara, A. B. *Molecular Targets and Therapeutic Uses of Spices, Modern Uses for Ancient Medicine*. Singapore: World Scientific Publishing, 2009.
- [64]. El-Fatry, H., & El-Alfy, T. Isolation and structure assignment of an antimicrobial principle from the volatile oil of *Nigella sativa* L. seeds. *Die Pharmazie*, 1975. 30 (2): 109-111.
- [65]. Akhtar, M., & Aslam, M. Anticestodal principles of *Nigella sativa* Linn. (Kolanji) seeds. *Pak J Pharmacol*, 1997. 14 (2): 7-14.
- [66]. Baser, K., Honda, G., & Miki, W. *Herb drugs and herbalists in Turkey*. Institute for the study of languages and cultures of Asia and Africa, Tokyo, 1986.
- [67]. El-Dakhkhny, M. et al. Effect of *Nigella sativa* oil on gastric sécrétion and ethanol induced ulcer in rats. *J Ethnopharmacol*, 2000. 72 (1/2): 299-304.
- [68]. Reiter, M., & Brandt, W. Relaxant effects on tracheal and ileal smooth muscles of the guinea pig. *Arzneimittel Forschung*, 1985. 35 (1A): 408-414.
- [69]. Al-Gharably, N., Badry, O., Nagi, M., Al-Shabanah, O., & Albekairi, A. Protective effect of thymoquinone against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice. *Res Comm Pharmacol Toxicol*, 1997. 2 (1/2): 41-50.

- [70]. Chakravarty, N. Inhibition of histamine release from mast cells by nigellone. *Annals of Allergy*, 1993. 70 (3): 237-242.
- [71]. Khanna, T. a. CNS and analgesic studies on *Nigella sativa*. *Fitoterapia*, 1993. 64: 407-410.
- [72]. Aggarwal, R., Kharya, M., & Shrivastava, R. Antimicrobial and anthelmintic activities of the essential oil of *Nigella sativa* Linn. *Indian J Exp Biol*, 1979. 17 (11): 1264-1265.
- [73]. Akhtar, M., & Riffat, S. Field trial of *Saussurea lappa* roots against nematodes and *Nigella sativa* seeds against cestodes in children. *J Pak Med Assoc*, 1991. 41 (8): 185-187.
- [74]. Salemal, M., & Hossain, M. Protective effect of black seed oil from *Nigella sativa* against murine cytomegalovirus infection. *Int J Immunopharmacol*, 2000. 22 (9): 729-740.
- [75]. Aboul Ela, M., El-Shaer, N., & Ghanem, N. Antimicrobial evaluation and chromatographic analysis of some essential and fixed oils. *Die Pharmazie*, 1996. 51 (12): 993-994.
- [76]. Ferdous, A., Islam, S., Ahsan, M., Hasan, C., & Ahmed, Z. In vitro antibacterial activity of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds against multiple drug-resistant isolates of *Shigella* species and isolates of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Phytother Res*, 1992. 6 (2): 137-140.
- [77]. Hanafy, M., & Hatem, M. Studies on the antimicrobial activity of Black seed. *J Ethnopharmacol*, 1991. 34 (2/3): 275-278.
- [78]. Badary, O., Al-Shabanah, O., Nagi, M., Al-Rikabi, A., & Elmazar, M. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced forestomach carcinogenesis in mice by thymoquinone. *Eur J Cancer Prev*, 1999. 8 (5); 225-260.
- [79]. Salomi, M., Nair, S., & Panikkar, K. Inhibitory effects of *Nigella sativa* and saffron (*Crocus sativus*) on chemical carcinogenesis in mice. *Nutr Cancer*, 1991. 16: 67-72.
- [80]. ZaouiA, A., Cherrah, Y., Lacaille-Dubois, M., Settaf, A., Amarouch, H., & Hassar, M. Diuretic and hypotensive effects of *Nigella sativa* in the spontaneously hypertensive rat. *Therapie*, 2000. 55 (3): 379-382.
- [81]. Mariage Frères. L'art français du thé, M. Frères, 2003. 104.
- [82]. FAO. Production / ProdStat / Crops. by Food and Agriculture Organisation of

the United Nations from <http://faostat.fao.org/>. 2007.

- [83]. FAO. Situation actuelle du marché du thé et perspectives à moyen terme. Groupe Intergouvernemental sur le thé, Nairobi, 2006. 1-13.
- [84]. Mariage Frères. L'Art du Thé, M. Frères, 1992. 103.
- [85]. Huang, M. T., Ho, C.-T. & Lee, C. Y. Phenolic Compounds in Food and their Effects on Health II: Antioxidants and Cancer Prevention in American Chemical Society Symposium Series 507. Ed. American Chemical Society, Washington DC. 1992. 507: 8-34.
- [86]. Trevisanato, S. I. & Kim, Y. I. Tea and health. *Nutr. Rev.*, 2000. 58 (1): 1-10.
- [87]. Zuo, Y., Chen, H. & Deng, Y. Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta*, 2002. 57 (2): 307-316.
- [88]. United States Department of Agriculture. "National Plant Data Center.", from <http://plants.usda.gov/>. 2007.
- [89]. Delmas, F.-X. & Minet, M. Le guide de dégustation de l'amateur de thé. Les éditions du Chêne, Paris, 2007. 239.
- [90]. Haslam, E. Thoughts on thearubigins. *Phytochem.*, 2003. 64 (1): 61-73.
- [91]. Luczaj, W. & Skrzydlewska, E. Antioxidative properties of black tea. *Prev. Med.*, 2005. 40 (6): 910-918.
- [92]. Selvendran, R. R. & Perera, B. P. M. Chemical composition of tea leaf cell-wall. *Chem. Ind.* 1971. (21): 577-578.
- [93]. Bruneton Jean. Pharmacognosie. *Phytochimie : Plantes médicinales*. 3e édition, Paris: Editions TEC & DOC, Cachan : Editions Médicales Internationales, 1999, p. 239-249, p. 309-327, p. 369-388, p. 1070-1079.
- [94]. Manach Claudine, Azaïs-Braesco Véronique, Remesy C, Morand Christine. Biodisponibilité des polyphénols du thé. *Cah. Nutr. Diét.*, 2000, vol. 35, 1: 1S46-1S55.
- [95]. Mossion Aurélie. Etude de la composition minérale et organique des liqueurs de thé et de leurs caractéristiques organoleptiques : Influence des paramètres physico-chimiques de l'eau, 213 p. Thèse : Sciences de la Matière : Institut National de Polytechnique de Toulouse: 2007.
- [96]. Odegard, K. E. & Lund, W. Multi-element speciation of tea infusion using cation-exchange separation and size-exclusion chromatography in combination with

- inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 1997. 12 (4): 403-408.
- [97]. Xie, M., Von Bohlen, A., Klockenkaemper, R., Jian, X. & Guenther, K. Multielement analysis of Chinese tea (*Camellia sinensis*) by total-reflection X-ray fluorescence. *Z. Lebensm.-Unters. -Forsch., A Eur. food res. technol.*, 1998. 207 (1): 31-38.
- [98]. Matsuura, H., Hokura, A., Katsuki, F., Itoh, A. & Haraguchi, H. Multielement determination and speciation of major-to-trace elements in black tea leaves by ICP-AES and ICP-MS with the aid of size exclusion chromatography. *Anal. Sci.*, 2001. 17 (3): 391-398.
- [99]. Spiro, M. & Lam, P.-L. L. Kinetics and equilibria of tea infusion. Part 12. Equilibrium and kinetic study of mineral ion extraction from black Assam Bukial and green Chun Mee teas. *Food Chem.*, 1995. 54 (4): 393-396.
- [100]. Lu, Y., Guo, W.-F. & Yang, X.-Q. Fluoride Content in Tea and Its Relationship with Tea Quality. *J. Agric. Food Chem.*, 2004. 52 (14): 4472-4476.
- [101]. Garel Emile. Sources et intérêt de la théanine présente dans le thé et ses préparations, p.1-85. Thèse : Pharmacie : Université de Rennes I : 2006.
- [102]. Chassagne Nadine. Le thé : Historique, Composition et Nouvelles Perspectives Thérapeutiques, p. 1-140. Thèse : Pharmacie : Clermont I : 2005.
- [103]. Caroline. R et Pierre. B. Secrets et vertus des plantes médicinales. ISBN. 1985. 26: 85 p.
- [104]. Collection Microsoft Encarta 2006.
- [105]. Henri Leclerc, Précis de phytothérapie. Paris, Masson. 1983. 9: 59-60.

Chapitre II.
Généralités sur
la lithiase urinaire

1. Lithiase rénale

1.1. Généralités

Les calculs urinaires [1-17] sont des calcifications pathologiques, celles-ci se définissant comme toutes formes de dépôts minéraux anormaux, calciques ou non, dans un tissu, un organe ou sur un dispositif médical [18-25]. D'un point de vue médical, au moins trois familles de calcifications pathologiques existent. Une première se réfère aux calculs, qui se définissent comme des concrétions solides formées dans une cavité ou un canal excréteur (calculs rénaux, biliaires, salivaires, vésicaux...). Une deuxième s'associe aux calcifications tissulaires ou ectopiques localisées en dehors des canaux excréteurs (qui peuvent être liées parfois à des pathologies sévères comme les cancers du sein, de la thyroïde, des testicules ou encore de la prostate). Enfin, dans certains cas, des calcifications, au départ physiologiques comme l'os ou la dent, deviennent en partie des calcifications pathologiques suite à une maladie. La lithiase rénale peut être caractérisée soit par des calculs formés dans les voies excrétrices soit par des concrétions initiées à partir de calcifications tissulaires. En effet, les plaques de Randall [26, 27], qui sont des calcifications tissulaires présentes au sommet de certaines papilles servent de centre nucléateur et sont donc à l'origine de certains calculs. Sur le plan physicochimique [23, 24, 28], les calcifications pathologiques sont des biomatériaux complexes comprenant une partie minérale et une partie organique associées à des éléments traces. L'ensemble exhibe une structure hiérarchique pour la partie minérale dans laquelle des nanocristaux s'assemblent pour former des microcristallites, l'agglomération de ces derniers constituant la calcification [29-31]. Les calcifications pathologiques (mais aussi physiologiques) sont issues d'une chimie douce [32-37] c'est-à-dire leur synthèse s'effectue à température et pression ambiantes pour des valeurs de pH qui s'inscrivent dans notre cas entre 5 et 8. On retrouve donc pour les calcifications pathologiques de nombreuses similitudes avec certaines notions de chimie douce (particules Janus, mise en forme par le tissu à l'échelle mésoscopique,...). La cinétique et la thermodynamique ont des rôles clés dans la compréhension des processus de biochimie qui conditionnent la pathogenèse de ces calcifications. Ainsi dans le cas des calculs d'oxalate de calcium, la thermodynamique est prédominante lorsque l'on s'intéresse aux hyperoxaluries avec comme phase chimique générée la whewellite ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Au contraire, la thermodynamique s'efface au profit de la cinétique de la réaction dans le cas des hypercalciuries avec cette fois la weddellite ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) comme phase chimique des calculs. Enfin, deux types de processus de nucléation primaire existent dans une urine sursaturée. Si une proportion limitée de calculs se

forme suivant un processus de nucléation homogène (c'est-à-dire une simple précipitation), on observe de plus en plus leur formation dans le cadre d'un processus de nucléation hétérogène liée notamment à la présence à la surface de l'épithélium papillaire d'une calcification appelée plaque de Randall [26, 27].

1.2. Définition

Du grec "lithos" veut dire pierre. La lithiase urinaire est définie comme un agrégat cristallin survenant dans le système collecteur de l'appareil urinaire (à la différence de la néphrocalcinose où ces agrégats cristallins surviennent dans le parenchyme rénal) et qui a atteint une taille suffisante pour aboutir à des manifestations cliniques ou être visible par l'imagerie. C'est une maladie caractérisée par la présence de calculs dans un organe ou dans son canal excréteur [38].

1.3. Epidémiologie

Une multitude d'études épidémiologiques ont été publiées et l'analyse de cette littérature classée par ordre chronologique [39-140] permet de discerner différents types d'investigations suivant les critères retenus. Les investigations menées en fonction de la géographie concernent soit des continents, l'Europe [130], l'Afrique [48], soit différents pays l'Allemagne [49, 51, 107], l'Angleterre [102], l'Arabie Saoudite [80], l'Arménie [103], les États Unis [77, 108, 132], la France [86, 115, 116], l'Iran [58, 134], le Japon [70, 95], la Jordanie [65], le Pakistan [59], le Soudan [88], Taiwan [106] la Tunisie [111], ou encore des régions spécifiques de certains pays [44, 45, 52, 60, 62, 67, 69, 73, 75, 81, 82, 84, 85, 89, 93, 97, 100, 104, 109, 110, 112, 118, 119, 121, 138]. D'autres facteurs modulant les caractéristiques physicochimiques de la lithiase sont abordés comme la classe d'âge [101, 104, 113] ou encore le sexe [78, 113, 120]. Ainsi de nombreuses études s'intéressent plus particulièrement à la lithiase de l'enfant [41, 46, 57, 74, 80, 91, 93, 105, 116, 121, 123, 137]. Chez l'adulte, comme chez l'enfant, la plupart des études épidémiologiques mettent en évidence des différences significatives en fonction du sexe puisque l'homme et la femme s'avèrent très différents sur ce point [53, 70, 120]. Les hommes sont en effet environ deux fois plus touchés que les femmes (9% contre 4 %) et, chez l'enfant, un rapport garçon/fille élevé est généralement observé durant les premières années de vie, le ratio tendant à se réduire ensuite [41, 84, 96, 116]. Enfin, ces études peuvent aussi établir des liens entre la lithiase et les habitudes nutritionnelles [40, 47, 87] ou encore les conditions socioéconomiques [53]. Quelques points clés se dégagent de l'ensemble de ces études. Ainsi, celles dont le sujet de recherche est la lithiase chez l'enfant soulignent l'importance des

maladies héréditaires, des infections urinaires ou encore des carences nutritionnelles. Les formes héréditaires sont pour la plupart sévères, fréquemment associées à une néphrocalcinose et exposent au risque d'évolution vers l'insuffisance rénale en l'absence d'un traitement étiologique approprié et précocement institué. Chez les jeunes adultes, ces études soulignent l'importance prise par les calculs sur lesquels est présent un dépôt blanc dénommé plaque de Randall durant ces trois dernières décennies. Cette plaque de Randall sert en effet de centre nucléateur du calcul et est responsable d'une grande partie des coliques néphrétiques observées chez les jeunes [141]. Elle est fort probablement liée à une modification des habitudes alimentaires chez les enfants et pose des questions sur la prise de vitamine D [142]. Chez les adultes, les lithiases rénales héréditaires sont moins importantes (2 % des calculs chez l'adulte contre 10 % chez l'enfant) et les habitudes alimentaires deviennent prépondérantes. Le manque d'exercice physique associé à une alimentation riche en sucres (glucose mais surtout de nos jours fructose) et en protéines expliquent un lien étroit entre la lithiase et l'un des problèmes de santé publique majeurs de notre société : le diabète de type 2. Ce lien s'exprime dans une séquence syndrome métabolique, diabète de type 2 et lithiase urique. L'impact sociétal est considérable dans la mesure où chez la moitié des transplantés rénaux dans les pays industrialisés, le diabète de type 2 est impliqué. On retrouve ainsi le fait que la lithiase fasse partie des grandes pathologies comme l'hypertension artérielle ou les maladies cardiovasculaires dans lesquelles les facteurs d'environnement ont un rôle majeur. De nos jours, il est à noter également un retour des lithiases d'origine infectieuse probablement lié à la baisse du niveau socioéconomique de la population qui engendre un accès au soin insuffisant.

1.4 Classification morphoconstitutionnelle

D'après une analyse sur 1354 calculs par Z. Djelloul et *al*, par spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier, ils ont pu les classer dans 7 catégories dont 5 définies par le composant lithiasique majoritaire (whewellite, weddellite, phosphates de calcium, acide urique et cystine), une 6^{ème} catégorie regroupant les calculs d'infection à germes uréasiques (PAM) et une 7^{ème} pour les calculs de structure mixte associant en proportions équivalentes oxalate de calcium et phosphate de calcium [120].

1.5 Répartition des composants lithiasiques

Ces résultats montrent qu'il y a une prédominance des calculs oxalocalciques (53%) suivis par l'acide urique (15%) et les calculs d'infection (la struvite est majoritaire dans 8% des calculs), alors que les phosphates de calcium ne représentent que 5% des cas; en dernier lieu

vient la cystine avec 2%. Les calculs mixtes (OxCa + PhCa) ne représentent que 9% des calculs analysés (tableau 1). Parmi les calculs oxalocalciques, on distingue ainsi la prédominance de la whewellite qui est 4 fois plus fréquente que la weddellite.

Le tableau 10 montre cette répartition des composants lithiasiques pour l'ensemble de la série de calculs analysés par spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier. Selon cette étude la maladie lithiasique touche plus les hommes que les femmes avec un rapport H/F = 1,79.

Tableau 10: Répartition des calculs urinaires selon le composant lithiasique majoritaire

Composant lithiasique	Total Est Algérien Nombre de calculs (%)	Total Ouest Algérien (%)
Calcique	60 (74%)	
Calcium oxalate	50 (61,7%)	67%
Whewellite	40 (49,4%)	50,3%
Weddellite	10 (12,3%)	16,7%
Phosphate de calcium	10 (12,3%)	16,7%
Carbapatite	9 (11,1%)	14,1%
Brushite	1 (1,2%)	0,8%
Autre phosphate	0 (0%)	1,8%
Non calcique	21 (25,9%)	
Struvite	7 (8,6%)	4,8%
Acide Urique	11 (13,5%)	10,6%
Cystine	2 (2,4%)	0,7%
Divers	1 (1,2%)	0,7%

Finalement, si l'on considère les composés lithiasiques dans le noyau définissant l'étiologie (tableau 11), on remarque la diminution très nette de la fréquence de l'apatite au profit des espèces chimiques marqueurs d'infection (struvite, UrAm). L'acide urique est aussi plus abondant (12.9% pour l'Est Algérien contre 7.3% pour l'Ouest Algérien, p=0,05).

Tableau 11: La fréquence des composés lithiasiques dans le noyau définissant l'étiologie.

Composant lithiasique	Est Algérien	Ouest Algérien
Whewellite	24,7	26.1%
Weddellite	16,5	9.5%
CA	21,2 ***	46.5%
Brushite	1,2	0.8%
Struvite (PAM)	11,7 *	4.7%
AU	12,9*	7.3%
UrAm	8,2 **	2%
Protéine	1,2	0%
Cystine	2,4	0.7%
Calcite	0	1,1%
Divers	0	1.4%
Total	100	100%

* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$ vs Ouest Algérien

Si l'on prend en considération simultanément la fréquence des constituants et leur présence comme agent nucléateur, il ressort que les calculs de l'Est Algérien contiennent moins souvent des phosphates et plus souvent des purines que les calculs de l'Ouest Algérien, ce qui oriente vers d'autres facteurs étiologiques que l'infection urinaire, en particulier des déséquilibres nutritionnels et des troubles digestifs.

1.6. La lithogénèse

La figure 14 rassemble les principales étapes de la lithogénèse [143]. Cette figure montre la complexité des processus physicochimiques associés ainsi que différents mécanismes biochimiques mis en action par l'organisme afin d'éviter la formation de calcul: variation du pH urinaire, dilution des urines, complexation de certains ions pour limiter la formation d'espèces moléculaires peu solubles, blocage des sites de croissance cristalline par des ions ou des macromolécules (inhibiteurs), protection de l'épithélium urinaire contre l'adhérence cristalline, etc. De ce fait, les principales causes biochimiques de sursaturation des urines, liées à une concentration excessive de calcium, d'oxalate, d'acide urique ou à une concentration insuffisante de citrate, sont contrebalancées par la présence d'autres substances qui vont exercer des effets sur les cristaux eux-mêmes (inhibition de croissance ou d'agrégation) ou leur interaction potentielle avec l'épithélium.

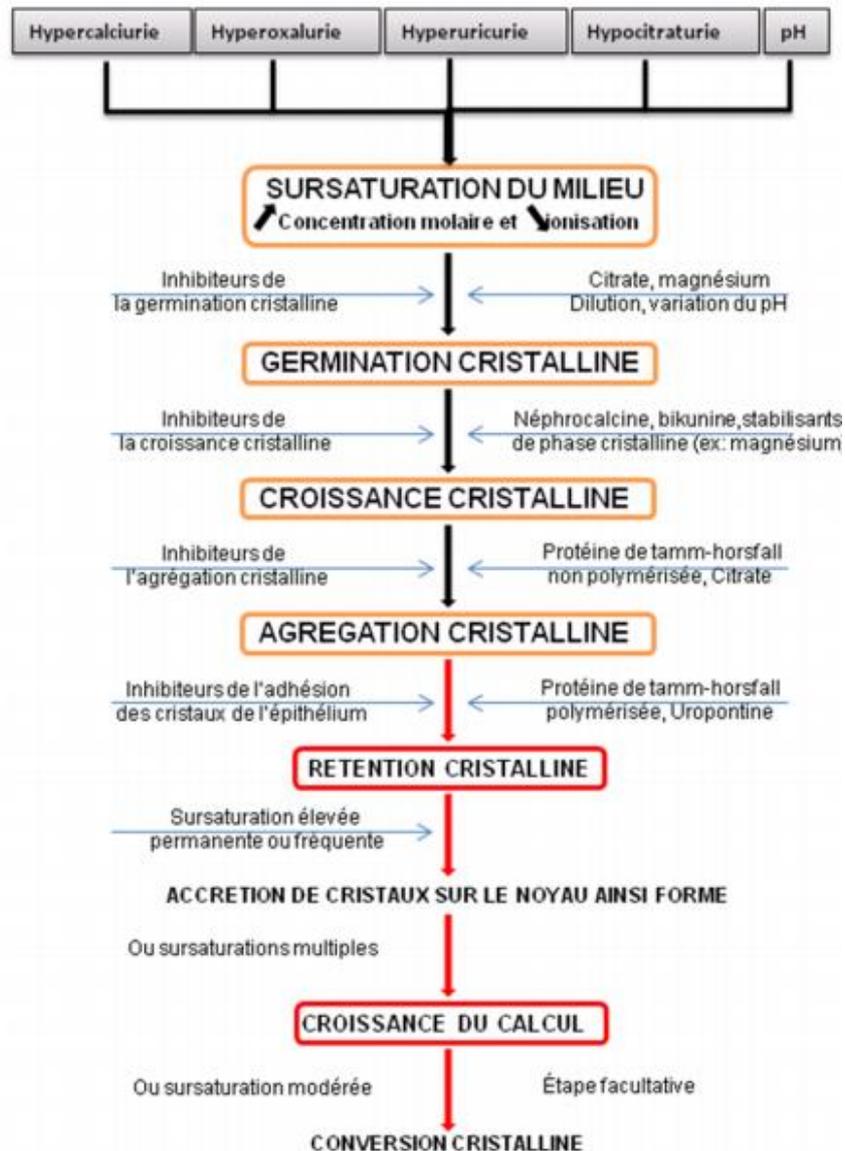


Figure 14: Les étapes de la lithogénèse.

Il existe normalement, dans les urines, un équilibre entre promoteurs et inhibiteurs de cristallisation [143, 144]. Cet équilibre peut être rompu soit par un excès des promoteurs, soit par un déficit des inhibiteurs (figure 15). Les ions qui participent à la formation des espèces insolubles sont appelés promoteurs de la cristallisation. Au nombre d'une dizaine, les promoteurs de la cristallisation peuvent agir conjointement ou isolément. Le plus souvent, 2 ou 3 composés sont mis en œuvre pour aboutir à la formation de ces espèces moléculaires peu solubles qui peuvent alors précipiter sous différentes formes cristallines. Ces dernières se forment dans des environnements biologiques différents dont elles témoignent, d'où l'intérêt de les prendre en considération pour identifier les facteurs étiologiques d'une maladie lithiasique.

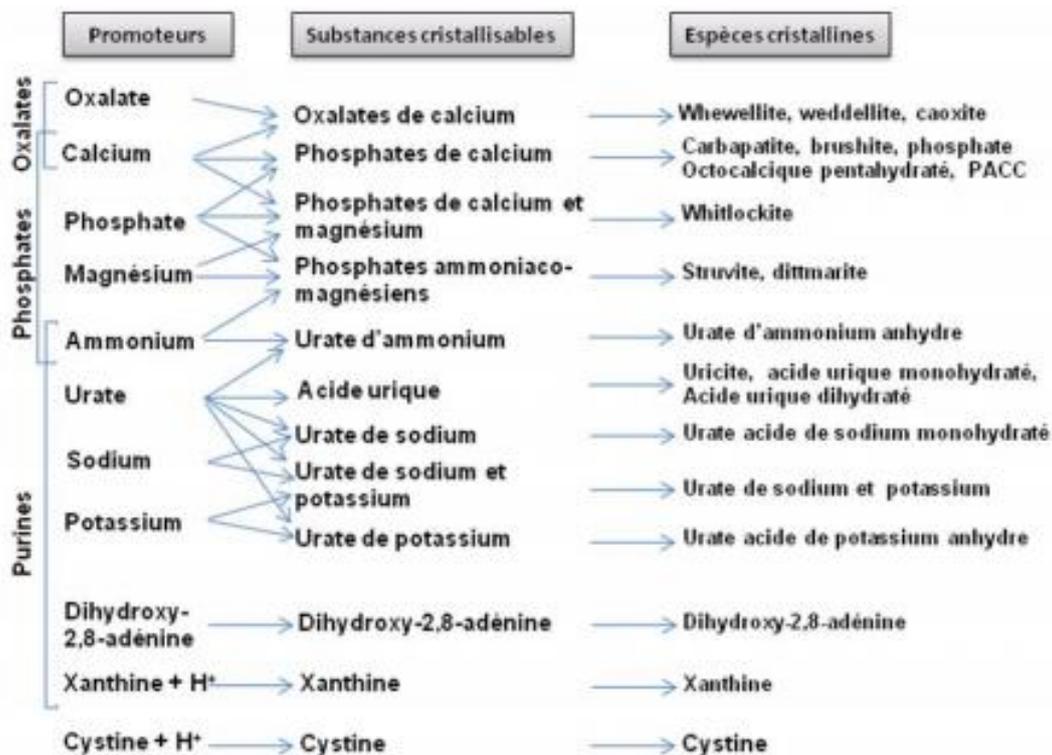


Figure 15: Promoteurs, substances cristallisables et espèces cristallines

1.6.1. Régulation de cristallisation

Face aux substances en état de sursaturation, les urines contiennent de nombreuses molécules capables de s'opposer par divers mécanismes aux différentes étapes de la lithogénèse (figure 16). Les inhibiteurs sont évidemment présents aussi bien chez les sujets normaux que chez les patients lithiasiques. Mais ils sont globalement moins efficaces chez ces derniers pour empêcher la formation des cristaux, soit parce qu'ils sont présents en quantité insuffisante par rapport aux promoteurs de la cristallisation, soit parce qu'ils sont structurellement modifiés ; ce qui altère leurs efficacités [145]. Les inhibiteurs peuvent être classés en deux grandes catégories selon leur mécanisme d'action. Certains agissent en complexant l'un des ions qui entrent dans la composition des espèces cristallisables, par exemple le calcium, l'oxalate ou le phosphate; ces agents complexants sont des ions mono ou polyatomiques de faible poids moléculaire, comme les ions citrate [146]. D'autres macromolécules, avec une activité inhibitrice, qui ont été également trouvées dans l'urine, agissent de différentes manières au niveau de la lithogénèse. (Tableau 12). Ces inhibiteurs peuvent présenter certaines anomalies dans la structure et/ou la fonction chez les lithiasiques. [147] Le pH urinaire exerce une influence considérable sur l'ionisation de plusieurs molécules promotrices ou inhibitrices des calculs. Cet effet a des conséquences très importantes sur l'équilibre urinaire, l'efficacité de

l'inhibition et les risques de nucléation hétérogène de l'oxalate de calcium ainsi que sur le risque de cristallisation spontanée de certaines espèces comme l'acide urique et les phosphates. Plusieurs espèces cristallines ont une faible solubilité en urine acide, c'est le cas de l'acide urique, la cystine et la xanthine. Un pH acide favorise la précipitation de l'acide urique. De plus, la cristallisation de l'acide urique peut faciliter la cristallisation de l'oxalate de calcium et favoriser les processus de nucléation hétérogène. Contrairement à l'acide urique, les phosphates calciques et magnésiens et, à un moindre degré, les urates, ont une solubilité qui diminue considérablement avec l'élévation du pH des urines. [148]

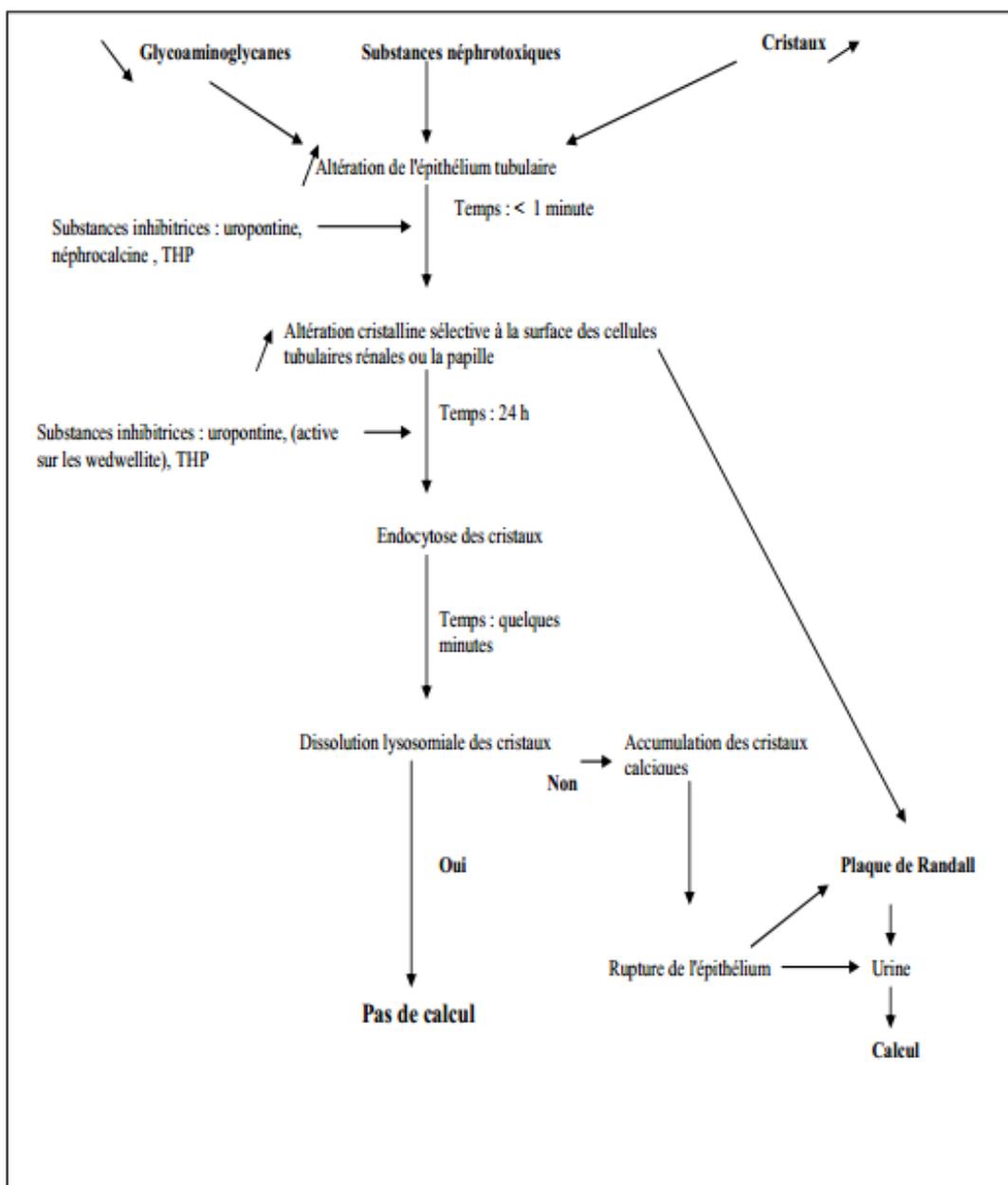


Figure 16: Interactions entre cristaux, inhibiteurs et épithélium tubulaire [148]

Tableau 12: Principaux inhibiteurs urinaires de la cristallisation des sels calciques

Type d'inhibiteur	Effets et caractéristiques
PM=1000 Da) : - Magnésium, Zinc, Citrate, isocitrate, Pyrophosphate, Phosphocitrate.	Complexent l'un des ions de calcul et forment des sels solubles [148]
(P.M > 10 000 Da) :	Effets et caractéristiques
- Glycosaminoglycanes (sulfates de chondroïtine, d'héparane et de dermatane, acide hyaluronique)	- Les glycosaminoglycanes sont des polymères de sucres sulfatés et aminés qui contribuent à préserver l'intégrité de l'épithélium rénal. Filtrés par les glomérules rénaux, mais ils peuvent aussi être produits dans le rein. [149] - Ces glycosaminoglycanes urinaires ont des propriétés inhibitrices qui s'exercent aussi bien au niveau de la croissance et de l'agrégation cristalline qu'au niveau de la nucléation hétérogène, notamment entre acide urique et oxalate de calcium. Un inhibiteur de protéinase a été également trouvé dans l'urine contenant de sulfate de chondroïtine. La protéine empêche la croissance en cristal d'oxalate de calcium. [150]
- Protéoglycanes	-Les protéoglycanes de haut poids moléculaire ont des effets sur la cristallisation d'oxalate de calcium. Elles semblent être des inhibiteurs plus efficaces de l'agrégation en cristal que de la croissance. [151]
- Glycoprotéines	Capables d'interférer avec l'une ou l'autre étape de la lithogénèse. [152]
- Néphrocalcine	La néphrocalcine est une protéine acide, avec un grand nombre de résidus d'acide aspartique. On a noté qu'une variété des protéines riches en acide aspartique a été trouvée dans d'autres tissus minéralisés, ces protéines peuvent empêcher la croissance des sels de calcium. L'inhibiteur de la croissance des cristaux d'oxalate de calcium est une protéine riche en acide uronique nommée (UAP). [153] La présence de l'acide uronique implique que ceci peut être un protéoglycane, contenant une chaîne latérale de glycosaminoglycane liée par covalence. [154]
- Protéine de Tamm-Horsfall	Tamm-Horsfall (THP). Les données récentes suggèrent que THP soit un inhibiteur efficace de l'agrégation du cristal [155] produit uniquement dans le rein, au niveau de la branche ascendante large de l'anse de Henle, et sécrété dans l'urine. Il est fortement inhibiteur de l'agrégation des cristaux d'oxalate de calcium. [156]
- Uropontine	Protéines phosphorylées impliquées dans la lithogénèse et participent à la matrice protéique présente dans de nombreux calculs. Les liens étroits entre les radicaux phosphosérine de l'uropontine et les atomes de calcium des cristaux pourraient expliquer la cohésion très forte des structures cristallines de ces deux types de calculs. [148]
- Bikunine	Semble avoir avec le Fragment1 de la prothrombine des propriétés inhibitrices intéressantes contre la cristallisation de l'oxalate de calcium. Ce sont des molécules plus petites, moins riches en sucres que la protéine de Tamm-Horsfall. Elles sont capables de se fixer sur les germes cristallins urinaires et de s'opposer à leur croissance, ce qui facilite leur élimination dans les urines. [148]

1.7. Formes de lithiases

1.7.1. Lithiase oxalocalcique

La lithiase oxalocalcique représente 80 à 85 % des formes de lithiases. Ces lithiases sont parfois associées à du phosphate de calcium [156]. L'oxalate de calcium (CaOx) se cristallise dans les tubules en tant que oxalate de calcium monohydraté (COM) ou oxalate de calcium dihydraté (COD). Les calculs rénaux sont des agrégats, contenant pour la plupart des microcristaux du type COM comme constituant inorganique primaire. Les calculs contiennent également un peu de protéines incorporées, qui semblent jouer un rôle adhésif pour ces agrégats, et elles sont souvent trouvées attachées au bout de la papille rénale. L'urine, cependant, contient souvent du COD sous forme de simples cristaux de l'ordre de micron. Ceci suggère que la formation de COD protège contre la maladie de lithiase en raison de sa faible capacité de former des agrégats stables et de fortes adhérences aux cellules épithéliales rénales. Une étude a permis, à l'aide d'observation microscopique atomique, de comparer les forces d'adhérence des surfaces morphologiques de COM et de COD. Ces mesures fournissent l'évidence expérimentale de la faible adhérence de COD et explique son caractère bénin. [158]. Il existe différents types de lithiases calciques :

❖ Lithiases avec hypercalciurie

Dans environ 50 % des cas, on retrouve une hypercalciurie favorisant la lithiase oxalocalcique. L'hypercalciurie est définie par une excrétion urinaire de calcium supérieure à 0,1 mmol/kg de poids/jour dans les deux sexes (4mg/kg). Le mécanisme de l'hypercalciurie n'est pas bien connu et celle-ci est donc dite "hypercalciurie idiopathique". L'hypercalciurie idiopathique tend à être familiale, elle est plus fréquente chez l'homme et le premier calcul survient souvent au cours de la troisième décennie. La cause de l'hypercalciurie idiopathique n'est pas bien définie mais elle s'associe à une augmentation de l'activité de l'ATPase calcium magnésium membranaire érythrocytaire. Une augmentation du nombre des récepteurs à la vitamine D a été mise en évidence sur des lymphocytes chez quelques patients avec une hypercalciurie idiopathique. Jusqu'à présent, il n'a cependant pas été retrouvé d'anomalie du gène codant pour la résistance à la vitamine D ou du gène codant pour l'alpha-hydroxylase [159].

L'ensemble des hypercalciuries idiopathiques ont en commun une augmentation de l'absorption nette du calcium intestinal, une augmentation du calcitriol (1,25 dihydroxycholécalférol) et une augmentation relative de l'absorption du calcium pour les taux de calcitriol. La plupart ont également une diminution de la densité minérale osseuse. Le

mécanisme de la formation de lithiase chez ces patients est multifactoriel : augmentation de la calciurie et de la phosphaturie, pH urinaire élevé et diminution de l'excrétion de citrate.

❖ **Lithiases hypercalcémiques**

Dans environ (2 à 5) % des cas de lithiase hypercalciurique, la calcémie est élevée et parfois très modérément.

❖ **Lithiases calciques sans hypercalciurie**

Dans environ la moitié des cas, la lithiase calcique ne s'associe pas à une hypercalciurie franche. Parmi ces lithiases, la lithiase oxalocalcique est caractérisée par une hyperoxalurie et peut être soit génétique, soit acquise [159]. Une hyperoxalurie acquise est retrouvée chez environ 10% des patients et résulte soit d'une augmentation de l'absorption intestinale d'oxalate (hyperoxalurie entérique) soit de la production endogène augmentée. L'absorption intestinale d'oxalate se fait essentiellement dans le colon et elle est augmentée par une diminution du calcium luminal dans la mesure où l'oxalate forme avec le calcium des sels insolubles qui ne peuvent alors être absorbés.

L'oxalate peut être produit par l'oxydation de l'acide ascorbique et l'oxydation du glycolate. La supplémentation alimentaire en acide ascorbique augmente l'excrétion urinaire d'oxalate chez certains patients. Dans un certain nombre de cas, aucune anomalie métabolique n'est retrouvée dans l'évaluation d'une lithiase calcique.

1.7.2. Autres types de lithiases

Des calculs de Struvite, composées de phosphate d'ammonium et de magnésium, représentent (15 à 20) % de tous les calculs. Certaines bactéries, telles que *Proteus mirabilis* et *Ureaplasma urealyticum* sécrètent l'uréase, une enzyme qui hydrolyse l'urée en anhydride carbonique et ammonium qui font monter le pH urinaire et permet à ce type de calcul de précipiter [160]. En plus des erreurs innées dans le métabolisme d'oxalate et de calcium, il existe aussi des erreurs innées du métabolisme des acides aminés (cystine) purines ou des pyrimidines. Les purines sont métabolisées en acide urique, qui existe en tant que sel d'urate ionisé (soluble) ou acide urique non dissocié (insoluble). La dissociation constante pour l'acide urique est à un pH proche de 5,35; plus le pH diminue, plus l'acide urique précipite [160]. La cystinurie est la plus fréquente des maladies lithiasiques héréditaires monogéniques. Les calculs de cystine comptent pour 10 % des calculs de l'enfant et 1 % de ceux de l'adulte. C'est une maladie récessive autosomale, qui affecte 1/20.000 individu. L'âge maximal de l'incidence est de 20-30 ans. Les calculs de cystine sont souvent multiples, grands et radio-opaques. [160] La cystinurie est due à un défaut des mécanismes de transport qui assurent la réabsorption de la cystine et des acides aminés dibasiques au niveau du tube contourné

proximal. Le défaut de réabsorption tubulaire entraîne une excrétion urinaire anormalement élevée de ces aminoacides. La cystine étant très peu soluble, surtout au pH acide de l'urine dans la partie distale des néphrons, il en résulte la formation répétée de calculs cystiniques. [159]

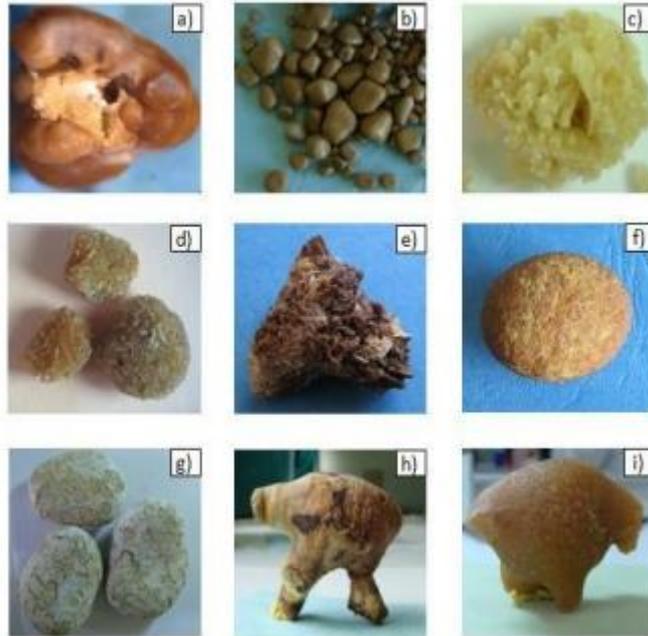


Figure 17: Exemples de quelques types morphologiques de calculs urinaires:

- (a) Calcul d'oxalate de calcium monohydraté (whewellite) de type **Ia** présentant une ombilication d'origine papillaire avec un dépôt de carbapatite de type **IVa1** (plaque de Randall). Dimensions : 6x5x4 mm
- (b) Calcul d'oxalate de calcium monohydraté (whewellite) de type **Id** de surface lisse homogène. Dimensions moyennes : 7x5x5 mm
- (c) Calcul d'oxalate de calcium dihydraté (weddellite) de type **IIa** présentant des cristaux bipyramidaux aplatis. Dimensions : 11x9x8 mm
- (d) Calcul d'oxalate de calcium présentant un début de conversion cristalline weddellite – whewellite par déshydratation in situ des cristaux de weddellite : cristaux aux angles plus ou moins émoussés. Dimensions : 12x10x8 mm (le plus gros)
- (e) Calcul d'oxalate de calcium présentant une conversion cristalline weddellite – whewellite très avancée. Dimensions : 22x20x17 mm
- (f) Calcul d'acide urique de type **IIIa**. Dimensions : 26x24x18 mm
- (g) Calcul présentant en surface un dépôt d'urate d'ammonium de type **IIIc** (sur une structure sous jacente d'acide urique de type **IIIa**). Dimensions moyennes : 32x28x22 mm
- (h) Calcul coralliforme à surface hétérogène de type **IVb** composé de carbapatite et de struvite. Dimensions : 46x42x24 mm
- (i) Calcul coralliforme à surface cristalline homogène de type **Va** composé de cystine pure. Dimensions : 48x42x28 mm

2. Traitements des lithiases

2.1. La diététique

Les principes et l'objectif du traitement diététique sont de diminuer la concentration des solutés promoteurs, calcium, oxalate et à moindre degré l'acide urique. Ceci repose essentiellement sur un réajustement des habitudes nutritionnelles. Les régimes très stricts sont abandonnés, ils aboutissent en effet le plus souvent à leur non respect ou à des phénomènes de carences. [161]

La dilution des urines est fondamentale car elle diminue la concentration de tous les promoteurs. Par exemple, lorsque la diurèse passe de 1 à 2 litres par jour, la concentration du calcium et celle de l'oxalate sont divisées par 2 et le produit oxalocalcique réduit de 4 fois. [160] L'absence de dilution suffisante des urines de nuit, reflétée par une densité élevée des urines du réveil, est une cause fréquente de récurrence lithiasique. L'apport alimentaire en calcium doit être modéré pour éviter l'absorption intestinale de l'oxalate et majorer l'oxalurie. Cette restriction en calcium augmente le risque de négativation du bilan calcique et de déminéralisation osseuse. Inversement, un apport excessif en calcium augmente la calciurie, notamment en cas d'hypercalciurie idiopathique. L'apport optimal en calcium est d'environ 800 mg par jour chez l'adulte, conforme aux recommandations OMS. La teneur en calcium des principaux produits laitiers et des eaux de boisson peut être extrêmement variable et doit être prise en compte pour cet ajustement. L'apport alimentaire en oxalate doit être réduit mais il faut savoir que 80 à 90% d'oxalate urinaire provient du métabolisme endogène intermédiaire. La réduction porte essentiellement sur les aliments très riches en oxalate absorbable en premier lieu le chocolat.

Un apport alimentaire riche en protéines animales et en sel augmente la calciurie; ces apports alimentaires doivent être limités et le suivi de ces mesures peut être apprécié par la quantification d'urée urinaire pour l'apport protidique et la natriurèse pour l'apport en sel. [160]

2.2. Traitement médical

Le traitement médical a pour but de diminuer la fréquence des récurrences et de réduire la morbidité due aux calculs préexistants; ce traitement s'efforce surtout d'empêcher la formation de nouveaux calculs [162]. Il comporte un traitement bien codifié de la colique néphrétique (antispasmodique et anti inflammatoire) [163] et un traitement spécifique. En cas de persistance d'une hypercalciurie, un traitement médicamenteux complémentaire peut s'avérer nécessaire. [164] Les traitements médicamenteux diffèrent selon la nature chimique des calculs en cause: lithiase calcique avec hypercalciurie [165, 166], lithiase calcique avec

hyperoxalurie [167-170]; lithiase urique [160, 163]; lithiase cystinique [160, 162]; lithiase phosphoammoniaco magnésienne [160, 163, 164].

2.3. Traitement par phytothérapie

La phytothérapie, du grec *phytos*: la plante et *thérapie*: cure. Le mot phytothérapie est utilisé dans les milieux scientifiques pour désigner l'utilisation des plantes médicinales à des fins thérapeutiques. [171] En ce qui concerne les lithiases, selon les pays et les traditions, plusieurs espèces végétales sont utilisées. La plupart des plantes médicinales à intérêt diurétique et antilithiasique appartiennent aux groupes des plantes supérieures. Ces espèces sont reconnues par leur capacité de dissoudre les calculs dans le corps humain par le biais de principes actifs synthétisés au sein de ces plantes. Plusieurs plantes sont utilisées dans le monde et spécialement en Algérie dans le traitement des lithiases rénales [172]. Certaines plantes contenant toute une gamme de matières efficaces peuvent avoir des actions très différentes suivant leur préparation [173]. Les principales substances à activité biologique potentielle sont les métabolites primaires et surtout secondaires.

Les métabolites primaires sont souvent employés comme excipients dans la fabrication des formes médicamenteuses (édulcorants, polysaccharides).

Les métabolites secondaires connus sont très nombreux (plusieurs dizaines de milliers ont été décrits). Ils sont le plus souvent classés en trois catégories principales: composés phénoliques; terpènes et stéroïdes; alcaloïdes. Un grand nombre de ces métabolites secondaires présente des propriétés pharmacologiques [174, 175].

2.4. Le traitement chirurgical

Le traitement chirurgical des calculs a été radicalement transformé par l'apparition des techniques de lithotritie extracorporelle et percutanée, et par l'urétéroscopie. [176]

2.4.1. Lithotritie extracorporelle

La lithotritie ou lithotripsie extracorporelle (LEC) est basée sur le principe physique de la génération d'une onde de choc dont il existe deux types de source, ponctuelle ou étendue. [177] Le principe est de fragmenter le calcul (taille entre 20 et 30 mm), les fragments s'éliminant dans les jours ou les semaines qui suivent et pouvant être recueillis par filtration des urines.

2.4.2. La chirurgie percutanée

Il s'agit, après ponction directe des cavités rénales, de dilater le trajet ainsi créé pour pouvoir introduire dans le rein un système optique dont le diamètre est d'environ 1 cm. Ce système permet de voir l'intérieur des cavités et de fragmenter, sous contrôle de la vue, les calculs intra rénaux. Cette technique ne concerne que les calculs volumineux (dont le plus grand diamètre

est supérieur à 30 mm) et la fragmentation se fait le plus souvent à l'aide d'ultrasons. La chirurgie percutanée a permis de réduire la morbidité de la chirurgie ouverte liée aux calculs urinaires. [178]

2.4.3. L'urétéroscopie

La miniaturisation des instruments, et surtout des optiques, a permis de fabriquer des instruments dont le diamètre externe est de 2 à 4 mm et qui peuvent donc être introduits dans l'uretère. Après une éventuelle dilatation du méat urétéral, l'urétéroscopie est montée dans l'uretère jusqu'au niveau du calcul. Les calculs de petit diamètre sont extraits en une pièce à l'aide d'un panier introduit par l'appareil tandis que les calculs plus volumineux (dont le diamètre est supérieur à 7 ou 8 mm) sont fragmentés dans l'uretère avant d'être extraits. Cette lithotritie intra-urétérale peut être faite soit par les ultrasons, soit par le laser pulsé à colorant soit par ondes de choc locales. Cette technique est la plus efficace pour les calculs de l'uretère distal où le taux de succès est de 98%. [179]. Il existe d'autres techniques chirurgicales telles que la chirurgie ouverte [180].

Références:

- [1].P. Jungers, M. Daudon, A. Leduc, Lithiase urinaire, Ed. Médecine-Sciences, Flammarion, 1989.
- [2].M. Daudon, Comment analyser un calcul et comment interpréter le résultat, Eurobiol. 1993; 27: 35-46.
- [3].M. Daudon, L. Estépa, B. Lacour, P. Jungers, Unusual morphology of calcium oxalate calculi in primary hyperoxaluria, J. Nephrol. 1998; 11 : 51-55.
- [4].M. Daudon, F. Cohen-Solal, B. Lacour, Apport de la morphologie des calculs au diagnostic étiologique des lithiases urinaires, Feuilles de Biologie, 2004; 35 : 51-57.
- [5].M. Daudon, Les différents types de calculs: apport de l'analyse morphoconstitutionnelle au diagnostic étiologique de la lithiase, In: Doré B (ed) Les Lithiases Rénales. Paris, Springer, 2004. 49-77.
- [6].P. Conort, B. Dore, Ch. Saussine, Prise en charge urologique des calculs rénaux et urétéraux de l'adulte, Prog. Urol. 2004; 14 : 1095-1102.
- [7].M. Daudon, Pourquoi et comment analyser un calcul urinaire ?, Prog. Urol. - FMC 200 ; 17 : 2-6.
- [8].M. Daudon, Cinq calculs – cinq photos – cinq diagnostics – cinq astuces, Prog. Urol. – FMC, 2012; 22: F87-F93.
- [9].F.L. Coe, J.H. Parks, J.R. Asplin, The pathogenesis and treatment of kidney stones, N. Engl. J. Med. 1992; 327: 1141-1152.
- [10]. P. Jungers, M. Daudon, P. Conort, Lithiase rénale, diagnostic et traitement, Ed. Médecine-Sciences, Flammarion, 1999.
- [11]. F. Grases, A. Costa-Bauza, M. Ramis, V. Montesinos, A. Conte, Simple classification of renal calculi closely related to their micromorphology and etiology, Clin. Chim. Acta. 2002; 322: 29-36.
- [12]. H.G. Tiselius, Epidemiology and medical management of stone disease, B.J.U. Int. 2003; 91: 758-767.
- [13]. F.L Coe, A. Evan, E. Worcester, Kidney stone disease, J. Clin. Invest. 2005; 115: 2598-2608.
- [14]. O.W. Moe, Kidney stones: pathophysiology and medical management, Lancet, 2006; 367 : 333-344.
- [15]. J.C. Williams, Unlock the Mysteries of Stone Analysis, B.J.U. Int. 2009; 104: 8-12.

- [16]. A.P. Evan, Physiopathology and etiology of stone formation in the kidney and the urinary tract, *Pediatr. Nephrol.* 2010; 25: 831-841.
- [17]. S.J. Allison, Stones : ascorbic acid and risk of kidney stones, *Nat. Rev. Nephrology.* 2013; 9: 187-195.
- [18]. S.M. Krasovskaya, L.D. Uzhinova, M.Yu. Andrianova, A.A. Prischenko, M.V. Livantsov, M.V. Lomonosov, Biochemical and physico-chemical aspects of biomaterials calcification, *Biomaterials* 1991 ; 12 : 817-820.
- [19]. E. Bonucci, *Calcification in biological systems*, CRC Press Boca Raton 1992.
- [20]. C.M. Giachelli, Ectopic calcification, gathering hard facts about soft tissue ineralization, *Am. J. Pathology*, 1999; 154: 671-675.
- [21]. S.H. Poggi, K.I. Bostrom, L.L. Demer, H.C. Skinner, B.J. Koos, Placental Calcification: A Metastatic Process ?, *Placenta*, 2001; 22: 591-596.
- [22]. E. Bonucci, *Biological calcification: Normal and pathological processes in the early Stages*, Ed. Springer Berlin Heidelberg, 2007.
- [23]. E. Bauerlein, *Handbook of biomineralization: biological aspects and structureformation*, Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 2007.
- [24]. D. Bazin, M. Daudon, C. Combes, C. Rey, Characterization and some physico-chemical aspects of pathological microcalcifications, *Chem. Rev.* 2012; 112: 5092-5120.
- [25]. D. Bazin, M. Daudon, Pathological calcifications and selected examples at the medicine–solid-state physics interface, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2012; 45: 383001 - 383010.
- [26]. F.J. Schoen, R.J. Levy, *Pathological Calcification of Biomaterials, Biomaterials Science (Third Edition)*, 2013, 739-754.
- [27]. A. Randall, The origin and growth of renal calculi, *Ann. Surg.* 1937; 105: 1009 -1027.
- [28]. A. Randall, An hypothesis for the origin of renal calculus, *N. Engl. J. Med.* 1936; 214: 234-237.
- [29]. <http://www.synchrotron-soleil.fr/Soleil/ToutesActualites/2013/Les-calcifications-Pathologiques>.
- [30]. J.D. Currey, Hierarchies in biomineral structures, *Science*, 2005; 309: 253-260.
- [31]. S. Mann, *Biomineralisation. Principles and concepts in bioinorganic materials chemistry*, Oxford University Press. Oxford 2001.

- [32]. M. Van Meerssche, J. Feneau-Dupont, Introduction à la cristallographie et à la chimie structurale, Ed. Vander 1973. 15
- [33]. J. Livage, M. Henry, C. Sanchez, Sol-gel chemistry of transition metal oxides, Progress in Solid State Chemistry, 1988; 18: 259-341.
- [34]. J. Livage, C. Sanchez, Sol-gel chemistry, J. of Non-Cryst. Solids 1992; 145: 11-21.
- [35]. J. Livage, Sol-Gel Chemistry and Molecular Sieve Synthesis, Studies in Surface Science and Catalysis, 1994; 85: 1-42.
- [36]. J. Livage, Sol-gel processes, Current Opinion in Solid State and Materials Science, 1997; 2: 132-138.
- [37]. C. Sanchez, B. Julian, P. Belleville, M. Popall, Applications of hybrid organic-inorganic composites, J. Mater. Chem. 2005; 15: 3559-3592.
- [38]. D. Avnir, T. Coradin, O. Lev, J. Livage, Recent bio-applications of sol-gel materials, J. Mater. Chem. 2006; 16: 1013-1030.
- [39]. Larousse médicale. Collection Antoine. 2009.1113P.
- [40]. T. Inada, Research on urolithiasis. Japan J. Urol. 1966; 57: 917-929.
- [41]. D.A. Andersen, Historical and geographical differences in the pattern of incidence of urinary stones considered in relation to possible aetiological factors. In: Hodgkinson A, Nordin BEC (eds.), Renal stone research symposium, London, Churchill, 1969, 7-31.
- [42]. J. Nahlovsky, M. Farhat, S. Gharbi, Fréquence extraordinaire de la lithiase chez les enfants en Tunisie et leurs causes probables. J. Urol. Néphrol. 1969; 75: 539-541.
- [43]. A. Norlin, B. Lindell, P.O. Granberg, N. Lindvall, Urolithiasis. A study of its frequency. Scand. J. Urol. Nephrol. 1976; 10: 150-153.
- [44]. A. Hesse, H.J. Schneider, S. Schroder, R. Wegner, Ergebnisse der AIV-gerechten Auswertung von 10000 Harnsteinanalysenbelegen. Zschr Uro Bd, 1976; 69: 1-9.
- [45]. D.J. Barker, S.P. Donnan, Regional variations in the incidence of upper urinary tract stones in England and Wales. B.M.J. 1978; 1: 67-70.
- [46]. C.M. Johnson, D.M. Wilson, W.M. O'Fallon, R.S. Malek, L.T. Kurland, Renal stone epidemiology : a 25-year study in Rochester, Minnesota, Kid. Int. 1979; 16: 624-631.
- [47]. D. Remzi, Urolithiasis in Infancy Urology 1980; 15: 248-250.

- [48]. W.G. Robertson, M. Peacock, P.J. Heyburn, F.A. Hanes, Epidemiological risk factors in calcium stone disease. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 1980; 53: 15-30.
- [49]. R.G. Hendrickse, Epidemiology and prevention of kidney disease in Africa *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1980; 74: 8-16.
- [50]. W. Tschöpe, E. Ritz, M. Haslbeck, H. Mehnert, H. Wesch, Prevalence and incidence of renal stone disease in a German population sample. *Klin Wochenschr* 1981; 59: 411-412.
- [51]. H.J. Schneider, C. Berg, Epidemiologische aussagen zum harsteinleiden auf der grundlage von 100 000 Harnteinanalysen. Unter besonderer berucksichtigung der rezidive. *Fortschr Urol Nephrol*, 1981; 17: 34-39.
- [52]. E.W. Vahlensieck, D. Bach, A. Hesse, Incidence, Prevalence and mortality of urolithiasis in the German Federal Republic. *Urol Res*, 1982; 10: 161-164.
- [53]. W.G. Robertson, M. Peacock, The pattern of urinary stone disease in Leeds and in the United Kingdom in relation to animal protein intake during the period 1960-1980. *Urol. Int.* 1982; 37: 394-399.
- [54]. R. Asper, Epidemiology and socioeconomic aspects of urolithiasis. *Urol Res* 1984; 12: 1-5.
- [55]. S. Ljunghall, B.G. Danielson, A prospective study of renal stone recurrences. *Br. J. Urol.* 1984; 56: 122-124.
- [56]. H.-J. Schneider, Epidemiology of Urolithiasis : Etiology · Diagnosis, *Handbook of Urology*, 1985; 17: 137-184.
- [57]. M. Daudon, R.J. Réveillaud, Whewellite et weddellite : vers des étiopathogénies différentes. Intérêt du typage morphologique des calculs. *Nephrologie* 198 ; 5: 195-201.
- [58]. M.C. Perrot, P. Montupet, F. Gauthier, J.P. Dommergues, J. Valayer, La lithiase urinaire de l'enfant : à propos de 92 cas. *Arch. Fr. Pédiatr.* 1985; 42: 23-27.
- [59]. M.H. Kheradpir, T. Armbruster, Childhood urolithiasis in Iran : a comparative study on the calculi composition of 121 cases. *Z. Kinderchir*, 1985; 40: 163-169.
- [60]. S.A. Rizvi, S.A. Naqvi, Z. Hussain, S. Hahjehan, Renal stones in children in Pakistan. *Br. J. Urol.* 1985; 57: 618-621.
- [61]. M.F. Najjar, F. Najjar, K. Boukef, A. Oueslati, J. Memmi, T. Bechraoui, La lithiase infantile dans la région de Monastir. Etude clinique et biologique. *Le Biologiste*, 1986; 20: 253-261.

- [62]. E. Takasaki, Chronological variation in the chemical composition of upper urinary tract calculi. *J. Urol.* 1986; 136: 5-9.
- [63]. P. Simon, K.S. Ang, G. Cam, C. Cloup, M. Carlier, J.P. Mignard et al. Épidémiologie de la lithiase calcique dans une région française : premiers résultats à 4 ans. *Presse Med.* 1986; 15: 1665-1668.
- [64]. S. Ljunghall, H. Lithell, E. Skarfors, Prevalence of renal stones in 60-year-old men. A 10-year follow-up study of a health survey. *Br J Urol.* 1987; 60: 10-13.
- [65]. C. Economou, J. Thomas, G. Tobelem, G. Arvis, Prédominance gauche de la lithiase rénale. *Sem. Hop.* 1987; 63: 277-280.
- [66]. A.M. Dajani, A.L. Abu Khadra, F.M. Baghdadi, Urolithiasis in Jordanian children. *Br. J. Urol.* 1988; 61: 482-486.
- [67]. N.S. Mandel, G.S. Mandel, Urinary tract stone disease in the United States veteran population. II. Geographical analysis of variations in composition. *J. Urol.* 1989; 142: 1516-1521.
- [68]. T.W. Jones, T.R. Henderson, Urinary calculi in children in Western Australia: 1972-1986. *J. Aust. Paediatr.* 1989; 25: 93-95.
- [69]. D.B. Leusmann, R. Blaschke, W. Schmandt, Results of 5035 stone analysis: a contribution to epidemiology of stone disease. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 1990; 24: 205-214.
- [70]. L. Borghi, P.P. Ferretti, G.F. Elia, F. Amato, E. Melloni, M.R. Trapassi et al. Epidemiological study of urinary tract stones in a northern Italian city. *Br. J. Urol.* 1990; 65: 231-235.
- [71]. O. Yoshida, Y. Okada, Epidemiology of urolithiasis in Japan: a chronological and geographical study. *Urol. Int.* 1990; 45: 104-111.
- [72]. P. Jungers, M. Daudon, Epidemiology of the kidney stones. *Presse Méd.* 1990; 19: 1655-1657.
- [73]. A. Ulmann, J. Clavel, D. Destree, C. Dubois, A. Mombet, J.M. Brisset, Histoire naturelle de la lithiase rénale calcique : données obtenues à partir d'une cohorte de 667 malades, *Presse Med.* 1991; 20: 499-502.
- [74]. M.J. Thun, S. Schober, Urolithiasis in Tennessee: an occupational window into a regional problem, *Am. J. Public Health* 1991; 81: 587-591.
- [75]. Y.H. Ni, Y.K. Tsau, C.H. Chen, T.C. Hsu, J.D. Lee, W.S. Tsai, Urolithiasis in children. *Zhonghua Min Guo Xiao Er Ke Yi Xue Hui Za Zhi*, 1991; 32: 9-16.

- [76]. D. Prigent, A. Spiegel, S. Brodin, C. Gras, Etude de l'hyperuricémie à Tahiti. 31 cas hospitalisés au Centre Hospitalier Territorial de Papeete (Tahiti). *Med. Trop.* 1992; 52: 63-66.
- [77]. C. Moesch, Données épidémiologiques, caractéristiques et évolution de la lithiase Urinaire, *Eurobiol.* 1993; 203: 21-28.
- [78]. J.M. Soucie, M.J. Thun, R.J. Coates, W. McClellan, H. Austin, Demographic and geographic variability of kidney stones in the United States. *Kidney Int.* 1994; 46: 893-899.
- [79]. M. Daudon, R. Donsimoni, C. Hennequin, S. Fellahi, G. Le Moel, M. Paris, S. Troupel, B. Lacour, Sex and age-related composition of 10617 calculi analyzed by I.R. Spectroscopy, *Urol. Res.* 1995; 23: 319-325.
- [80]. M. Daudon, L. Estépa, C. Hennequin, B. Lacour, P. Jungers, Evolution of urinary stone composition between 1980 and 1994 in France. In: Tiselius HG (ed) *Renal stones. Aspects on their formation, removal and prevention.* Akademityck AB, Edsbruk, 1995, pp 128 - 130.
- [81]. S.A. Al-Rasheed, S.R. El-Faqih, I. Husain, M. Abdurrahman, M.M. Al-Mugeirin, The aetiological and clinical pattern of childhood urolithiasis in Saudi Arabia. *Int. Urol. Nephrol.* 1995; 27: 349-355.
- [82]. S. Nimmannit, P. Malasit, W. Susaengrat, S. Ong-Aj-Yooth, S. Vasuvattakul, P. Pidetcha, C. Shayakul, S. Nilwarangkur, Prevalence of endemic distal renal tubular acidosis and renal stone in the northeast of Thailand. *Nephron* 1996; 72: 604-610.
- [83]. J.M. Soucie, R.J. Coates, W. McClellan, H. Austin, M. Thum, Relation between geographic variability in kidney stones prevalence and risk factors for stones. *Am. J. Epid.* 1996; 143: 487-495.
- [84]. S. Ekane, T. Wildschutz, J. Simon, C.C. Schulman, Lithiase urinaire: épidémiologie et Physiopathologie, *Acta Urol. Belg.* 1997; 65: 1-8.
- [85]. D. Harrache, Z. Mesri, A. Addou, A. Semmoud, B. Lacour, M. Daudon : La lithiase urinaire chez l'enfant dans l'Ouest-Algérien. *Ann. Urol.* 1997; 31: 84-88.
- [86]. D. Harrache, Z. Mesri, A. Addou, A. Semmoud, B. Lacour, M. Daudon, Analyse des calculs urinaires de l'adulte dans l'Ouest Algérien par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, *Eurobiol.* 1997; 31: 69-74.
- [87]. R. Donsimoni, C. Hennequin, S. Fellahi, S. Troupel, G.L. Moel, M. Paris et al. New aspects of urolithiasis in France. GERBAP: Groupe d'évaluation et de recherche

- des biologistes de l'Assistance publique des Hôpitaux de Paris. *Eur. Urol.* 1997; 31: 17-23.
- [88]. A. Hesse, R. Siener, Current aspects of epidemiology and nutrition in urinary stone Disease, *World Journal of Urology*, 1997; 15: 165-171.
- [89]. A.A. Bala, A.M. Salah, A.H. Khattab, A. Kambal, D. Bongartz, B. Hope, A. Hesse, Mineral composition of renal stones from the Sudan. *Urol. Int.* 1998; 61: 154 - 156.
- [90]. C.S. Pundir, L. Goyal, M. Thakur, N.K. Kuchhal, A.K. Bhargava, S.P. Yadav, Chemical analysis of urinary calculi in Haryana. *Indian J. Med. Sci.* 1998; 52: 16-21.
- [91]. N. Rabasse, Lithiases urinaires au Laos : enquête épidémiologique à visée descriptive et étiologique. Collection des ouvrages du Comité de Coopération avec le Laos, Paris, SEGIP, 1998.
- [92]. A. Kamoun, M. Daudon, ; J. Abdelmoula, M. Hamzaoui, B. Chaouachi, T. Houissa, A. Zghal, S. Ben Ammar, C. Belkahia, R. Lakhoua, Urolithiasis in Tunisian children : a study of 120 cases based on stone composition. *Pediatr. Nephrol.* 1999; 13: 920-925.
- [93]. M. Daudon, J. Amiel, Epidémiologie de la lithiase. *Prog Urol*, 1999; 9: 5-16.
- [94]. S. Aegukkatajits, Reduction of urinary stone in children from north-eastern Thailand. *J. Med. Assoc. Thai.* 1999; 82: 1230-1233.
- [95]. A. Serio, A. Fraioli, Epidemiology of nephrolithiasis. *Nephron*, 1999; 81: 26-30.
- [96]. O. Yoshida, A. Terai, T. Ohkawa, Y. Okada, National trend of the incidence of urolithiasis in Japan from 1965 to 1995. *Kidney Int.* 1999; 56: 1899-1904.
- [97]. M. Daudon, L'analyse morphoconstitutionnelle des calculs dans le diagnostic étiologique d'une lithiase urinaire de l'enfant, *Arch. Péd.* 2000; 7: 855-865.
- [98]. F.F. Angwafo III, M. Daudon, A. Wonkam, P.M. Kuwong, K.A. Kropp, Pediatric urolithiasis in sub Saharan Africa : A comparative study in two regions of Cameroon. *Eur. Urol.* 2000; 37: 106-111.
- [99]. A. Trinchieri, F. Coppi, E. Montanari, A. Del Nero, G. Zanetti, E. Pisani, Increase in the prevalence of symptomatic upper urinary tract stones during the last ten years. *Eur. Urol.* 2000; 37: 23-25.
- [100]. M.H. Gault, L. Chafe, Relationship of frequency, age and sex, stone weight and composition in 15,624 stones: comparison of results for 1980 to 1983 and 1995 to 1998, *J. Urol.* 2000; 164: 302-311.

- [101]. A. Oussama, F. Kzaiber, H. Hilmi, B. Merbari, A. Semmoud, M. Daudon, Analyse des calculs urinaires de l'adulte dans le moyen Atlas marocain par spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier. *Prog. Urol.* 2000; 10: 404-410.
- [102]. F.M. Alapont Perez, J. Galvez Calderon, J. Varea Herrero, G. Colome Borros, A. Olaso, J.R. Sanchez Bisono, Epidemiology of urinary lithiasis. *Actas Urol Esp*, 2001; 25: 341-349.
- [103]. W.G. Robertson, The changing pattern of urolithiasis in the UK and its causes. In: Kok DJ, Romijn HC, Verhagen PCMS, Verkoelen CF (eds). *Eurolithiasis*. Shaker, Maastricht, 2001, 9-15.
- [104]. A. Sarkissian, A. Babloyan, N. Arikyants, A. Hesse, N. Blau, E. Leumann, Pediatric urolithiasis in Armenia : a study of 198 patients observed from 1991 to 1999. *Pediatr. Nephrol.* 2001; 16: 728-732.
- [105]. M. Decoster, J.C. Bogot, J.L. Carre, J.F. Morin, J.L. Mah, T. Tanquerel, J. Cledes, H.H Floch, Etude épidémiologique des calculs urinaires dans l'ouest de la France. *Presse Méd.* 2002; 31: 113-118.
- [106]. S.A. Rizvi, S.A. Naqvi, Z. Hussain, A. Hashmi, M. Hussain, M.N. Zafar, S. Sultan, H. Medhi, Pediatric urolithiasis : developing nation perspectives. *J. Urol.* 2002; 168: 1522-1525.
- [107]. Y.H. Lee, W.C. Huang, J.Y. WC, J.Y. Tsai, C.M. Lu, W.C. Chen, M.H. Lee et al. Epidemiological studies on the prevalence of upper urinary calculi in Taiwan. *Urol. Int.* 2002; 68: 172-177.
- [108]. A. Hesse, E. Brandle, D. Wilbert, K.U. Kohrmann, P. Alken, Study on the prevalence and incidence of urolithiasis in Germany comparing the years 1979 vs. 2000. *Eur. Urol.* 2003; 44: 709-713.
- [109]. K.K. Stamatelou, M.E. Francis, C.A. Jones, L.M. Nyberg, G.C. Curhan. Time trends in Reported prevalence of kidney stones in the United States: 1976-1994. *Kidney Int*, 2003; 63: 1817- 823.
- [110]. W.G. Robertson, Stones in the tropics. *Semin Nephrol*, 2003; 23: 77-85.
- [111]. R.S. Barsoum, End-stage renal disease in North Africa. *Kidney Int.* 2003; 83: S111-S114.
- [112]. M. Jellouli, R. Jouini, M. Mekki, M. Belghith, M.F. Najjar, A. Nouri, Particularité de la lithiase urinaire du nourisson en Tunisie : A propos de 104 cas, *Prog. Urol.* 2004; 14: 376-379.

- [113]. M. Daudon, B. Bounxouei, F. Santa Cruz, D.A. Leite, S. Silva, B. Diouf et al. Composition des calculs observés aujourd'hui dans les pays non industrialisés. *Prog. Urol.* 2004; 14: 1151-1161.
- [114]. M. Daudon, J.C. Doré, P. Jungers, B. Lacour, Changes in stone composition according to age and gender of patients: a multivariate epidemiological approach, *Urol. Res.* 2004; 32: 241-247.
- [115]. M. Daudon, P. Jungers, Drug-induced renal calculi - Epidemiology, prevention and management, *Drugs*, 2004; 64: 245-275.
- [116]. M. Daudon, Épidémiologie actuelle de la lithiase rénale en France. *Ann Urol*, 2005; 39: 209-231.
- [117]. M. Daudon, La lithiase de l'enfant a-t-elle évolué en France au cours des vingt dernières années, *Feuillet Biologique*, 2005; 46: 29-34.
- [118]. P. Jungers, D. Joly, F. Barbey, G. Choukroun, M. Daudon, Insuffisance rénale terminale d'origine lithiasique : fréquence, causes et prévention, *Néphrologie & Thérapeutique*, 2005; 1: 301-310.
- [119]. J.C. Lieske, L.S. Pena De La Vega, J.M. Slezak, E.J. Bergstralh, C.L. Leibson, K.L. Ho, et al. Renal stone epidemiology in Rochester, Minnesota: an update. *Kidney Int.* 2006; 69: 760-764.
- [120]. Z. Djelloul, A. Djelloul, A. Bedjaoui, Z. Kaid-Omar, A. Attar, M. Daudon et al. Lithiase urinaire dans l'Ouest Algérien : étude de la composition de 1354 calculs urinaires en relation avec leur localisation anatomique, l'âge et le sexe des patients. *Prog. Urol.* 2006; 16: 328-235.
- [121]. C.D. Scales, L.H. Curtis, R.D. Norris, P. Springhart, RL Sur, K.A. Schulman et al. Changing gender prevalence of stone disease. *J. Urol.* 2007; 177: 979-982.
- [122]. M. Daudon, G. Panteix, I. Sagnol, I. Petit, Caractéristiques épidémiologiques régionales de la lithiase urinaire en France. *Feuillets Biol*, 2007; 48: 45-51.
- [123]. J. E. Dallera MD, P.S. Chandhoke, Epidemiology and Incidence of Stone Disease Urinary Stone Disease, *Current Clinical Urology*, 2007, 27-34.
- [124]. M. Daudon, O. Traxer, E. Lechevallier, C. Saussine, Epidémiologie des lithiases urinaires, *Progrès Urol.* 2008; 18: 802-814.
- [125]. S. Akoudad, M. Szklo, M.A. McAdams, T. Fulop, C.A.M. Anderson, J. Coresh, A. Köttgen, Correlates of kidney stone disease differ by race in a multi-ethnic middle-aged population: The ARIC study, *Preventive Medicine.* 2010; 51: 416-420.

- [126]. A.G. Wasserstein, Epidemiology and Natural History of Nephrolithiasis, Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism. 2011; 9: 165-180.
- [127]. F. Millán, S. Gracia, F.M. Sánchez-Martín, O. Angerri, F. Rousaud, H. Villavicencio, A new approach to urinary stone analysis according to the combination of the components: experience with 7,949 cases Actas Urológicas Españolas (English Edition), 2011; 35: 138-143.
- [128]. E.S. Hyams, D. Nelms, W.S. Silberman, Z. Feng, B.R. Matlaga, The Incidence of urolithiasis among commercial aviation pilots, The Journal of Urology, 2011; 186: 914-916.
- [129]. T.Y. Tseng, M.L. Stoller, Medical and Medical/Urologic Approaches in Acute and Chronic Urologic Stone Disease, Review Article, Medical Clinics of North America, 2011; 95: 169-177.
- [130]. M. Daudon, K. Bertrand. Dossier : lithiase urinaire « Epidémiologie de la lithiase urinaire ». La revue du praticien. 2011; 61: 371- 394.
- [131]. P. J. S. Osther, Epidemiology of Kidney Stones in the European Union, Urolithiasis, 2012, 3-12.
- [132]. A. Dibi, F. Jabourik, A. Abouhafs, M. Kissra, M.N. Benhmamouch, A. Bentahila, Les lithiases urinaires chez l'enfant, J. de Pédiatrie et de Puériculture, 2012; 25: 91-96.
- [133]. C.D. Scales Jr., A.C. Smith, J.M. Hanley, C.S. Saigal, Urologic Diseases in America Project Prevalence of Kidney Stones in the United States, European Urology, 2012; 62: 160-165.
- [134]. M.E. Dwyer, A.E. Krambeck, E.J. Bergstralh, D.S. Milliner, J.C. Lieske, A.D. Rule Temporal Trends in Incidence of Kidney Stones Among Children: A 25-Year Population based study, The Journal of Urology, 2012; 188: 247-252.
- [135]. G. Pourmand, B. Pourmand, Epidemiology of Stone Disease in Iran , Urolithiasis, 2012, 85-87.
- [136]. B. J. Linder, L.J. Rangel, A.E. Krambeck, The effect of work location on urolithiasis in health care Professionals, Urolithiasis, 2013; 41: 327-331.
- [137]. M.L. Giannossi, V. Summa, An Observation on the Composition of Urinary Calculi: Environmental Influence Medical Geochemistry, 2013: 5: 67-90.
- [138]. K. Sarica, R.Horuz, Pediatric Stones, Clinical Management of Urolithiasis, 2013, 133-154.

- [139]. A. R. Aragón-Tovara, M. Á. Hernández-Farías, Crystallographic analysis of 475 urinary tract calculi at The Hospital San José Tec Salud in Monterrey, N. L., *Rev Mex Urol*, 2013; 73: 130-135.
- [140]. F.A. Kaboré, T. Kambou, B. Zango, A. Ouattara, M. Simporé, C.L. Sorgho, E. Lechevalier, G. Karsenty, Épidémiologie d'une cohorte de 450 lithiases urinaires au CHU Yalgado Ouédraogo de Ouagadougou (Burkina Faso) ; *Progrès en Urologie*, In Press, Corrected Proof ;
- [141]. M. Daudon, D. Bazin, When the Synchrotron radiations highlight the Randall's plaques and kidney concretions. *J Phys: Conf series*, 2013; 425: 022006
- [142]. M. Daudon, Vitamine D, plaque de Randall et lithiase: existe-t-il un lien? *Arch Péd*, 2013; 20: 336-340.
- [143]. M. Daudon, O. Traxer, E. Lechevallier, C. Saussine, La lithogénèse, *Prog. Urol.* 2008; 18: 815-827.
- [144]. C. Hennequin, B. Lacour, M. Daudon, Les inhibiteurs de cristallisation, *L'Eurombiologiste*, 1993; XXVII, 47-53.
- [145]. Worcester, E.M., Urinary Calcium Oxalate Crystal Growth Inhibitors. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 1994, 5: 546-553.
- [146]. Matthew L. Weaver, S.R.Q., John R. Hoyer, William H. Casey, George H. Nancollas, James J. De Yore, Inhibition of calcium oxalate monohydrate growth by citrate and the effect of the background electrolyte. *Journal of Crystal Growth*, 2007, 30: 135-145.
- [147]. Nakagawa Y., A.V., Parks JH., Lau HSH., Kawooya JK., Coe FL., Urine glycoprotein crystal growth inhibitors. Evidence for a molecular abnormality in calcium oxalate nephrolithiasis. *J Clin Invest*, 1985, 76: 1455-1462.
- [148]. Bertrand, D., Les lithiases rénales. 2004: Paris ; Berlin : Springer. Collection : Monographies en urologie. 367P.
- [149]. Vera Tostesa, Cesonia A. Martinusso, Claudio C.C. Werneck, Paulo A.S. Moura, Lucio R. Cardoso., Low-molecular-weight dextran sulfate prevents experimental urolithiasis in rats. *Clinica Chimica Acta*, 2004, 341, 86: 147-155.
- [150]. Sorensen, S., Hansen, K., Bak, S., Justesen, SJ., An unidentified macromolecular inhibitory constituent of calcium oxalate crystal growth in human urine, *Urol. Res.*, 1990. 18: 373-379.
- [151]. Hesse, A., Wuzel, H., Vahieniseck, W.. Significance of glycosaminoglycans for the formation of calcium oxalate stones. *Am J Kidney Dis.*, 1991, 17: 414-419.

- [152]. Vivek Kumar, S.Y., Gerard Farrell, F. Gary Toback, and John C. Lieske, Renal epithelial cells constitutively produce a protein that blocks adhesion of crystals to their surface. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004, 287: 373-383.
- [153]. Atmani F, L.B., Strecker G, Parvy P, Druke T, Daudon M., Molecular characteristics of uronic-acid-rich protein, a strong inhibitor of calcium oxalate crystallization in vitro. *Biochem Biophys. Res Commun.*, 1993, 191: 1158-1165.
- [154]. Jessen, T., Faarvang KL., Ploug, M., Carbohydrate as covalent crosslink in human inter- α -trypsin inhibitor: a novel plasma protein structure. *FEBS Lett.*, 1988, 230: 195- 200.
- [155]. Hess, B., Nakagawa, Y., Coe, FL., Inhibition of calcium oxalate monohydrate crystal aggregation by urine proteins. *Am J Physiol.*, 1989, 257: 99-106.
- [156]. Phulwinder, K.G., Martin, I. Resnick, Evidence for the Presence of Abnormal Proteins in the Urine of Recurrent Stone Formers. *The Journal of urology*, 1995, 153(5): 1716-1721.
- [157]. Xavier Parent, G.B., Brignon, P., Lithiase oxalocalcique. Relation entre facteurs de risque biochimiques et phase cristalline du calcul. *Progrès en Urologie*, 1999, 9: 1051-1056.
- [158]. Xiaoxia Sheng, M.D.W., Jeffrey A. Wesson, Crystal Surface Adhesion Explains the Pathological Activity of Calcium Oxalate Hydrates in Kidney Stone Formation. *J Am Soc Nephrol*, 2005. 16: 1904-1908.
- [159]. Paul Jungers, D.J., Anne Blanchard, Marie Courbebaisse, Bertrand Knebelmann, Michel Daudon., Lithiases rénales héréditaires monogéniques : Récents acquis diagnostiques et thérapeutiques. *Néphrologie & Thérapeutique*, 2008. 4: 231-255.
- [160]. Senty, S., Christopher, Fry, The metabolic basis for urolithiasis . *Renal and Urology*, 2008, 26-34.
- [161]. Zech, P., Revillard, J.P., Néphrologie clinique. 1978: Edition ELLIPSES 336P.
- [162]. Barjon, P., Beraud, J.J., Canaud, B., Fourcade, J , Guiter, J , Laffargue, F., Mion, C., Mourad, G., Ribstein, J., Néphrologie. 1991: Edition ELLIPSES .397P
- [163]. Jungers, P., Daudon, M., Le Duc, A., Lithiase urinaire. 1989. Edition FLAMMARION MEDECINE SCIENCE. 284P.
- [164]. Debre B, P., Teyssie, P., Evard, B., Dufour, M., Zerbib, T., Flam, N., Thiounn, Abrégés d'urologie. 1992: Edition MASSON .197P.
- [165]. Hess, B., Néphrolithiase., *Forum Med Suisse*. 2001. 1119-1127.

- [166]. Matthew L. Weaver, S.R.Q., John R. Hoyer, William H. Casey, George H. Nancollas, James J. De Yoreo, Inhibition of calcium oxalate monohydrate growth by citrate and the effect of the background electrolyte. *Journal of Crystal Growth*, 2007. 306: 135-145.
- [167]. Frick, K.K., Bushinsky, David A., Molecular Mechanisms of Primary Hypercalciuria. *J Am Soc Nephrol.*, 2003, 14: 1082-1095.
- [168]. Ohkawa, M., Tokunaga, S., Nakashima, T., Orito, M., Hisazumi, H., Thiazide treatment for calcium urolithiasis in patients with idiopathic hypercalciuria *Br. J. Urol.*, 1992. 69: 571-576.
- [169]. Ettinger, B., Recurrent nephrolithiasis : Natural history and effect of phosphate therapy. A double-blind controlled study. *Am. J. Med.*, 1976. 61: 200-206.
- [170]. Presne, C., Monge, M., Bataille, P., El Esper, N., Choukroun, G, Fournier, A., Les essais cliniques randomisés dans la prévention des récurrences des lithiases oxalocalciques, *Néphrologie* , 2003. Vol. 24. N° 6.
- [171]. Blaiche, P., Traité de phytothérapie 1979: Tome 2. 260P.
- [172]. Paris, M., Abrégés de matière végétale. Pharmacognosie. Tome 1. 256P.
- [173]. Paris, F., Guide de plantes médicinales. 2004,. 1973. 369P.
- [174]. Bruneton, J., Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales, 4e éd., revue et augmentée, Tec & Doc - Éditions médicales internationales, Paris. 2009. 1288P.
- [175]. Wichtl, M., Anton, R. Plantes thérapeutiques : tradition, pratique officinale, science et thérapeutique, 2ème Ed. (trad. française de Teedrogen und Phytopharma, par Anton, R. et Bernard). Tec & Doc , Éditions médicales internationales. 2003. 692 P.
- [176]. Pal, R.P., Mellon, J.K., Renal stone disease. *Acute Care*. Elsevier., 2008, 199-203.
- [177]. Giovanni Gambaro, J., M., Reis-Santos, Nagaraja Rao, Review Nephrolithiasis: Why Doesn't Our "Learning" Progress *European Urology*, 2004, 45: 547-556.
- [178]. Makhoul, B., Yatim, M., Guinard, J., Fourcade, R.-O., Comment ponctionner un rein pour réaliser une néphrolithotomie percutanée. *Annales d'Urologie*, 2006. 40(2): 139-148.
- [179]. Lechevallier, E., Saussine, C., Traxer, O. , Urétroscopie pour calcul du haut appareil urinaire. *Progrès en urologie*, 2008, 18(12): 912-916.

- [180]. Saussine, C., Lechevallier, E., Traxer, O., Lithiase urinaire et laparoscopie.
Traitement des calculs du rein (hors anomalies fonctionnelles ou anatomiques.
Progrès en Urologie, 2008, 18(12): 938-942.

Deuxième Partie:
Partie Expérimentale

Matériels et Méthodes

1. Objectif

Notre objectif de travail est d'étudier l'activité antilithiasique des graines de *Nigella sativa* L. sur la lithiase urinaire induit chez les rats wistar par le billet d'une substance lithiasogène; l'éthylène glycol.

Dans ce contexte, les graines de *Nigella sativa* L., les feuilles de *Camellia sinensis* L., les feuilles et fleurs d'*Erica multiflora* L. ont fait l'objet d'une étude phytochimique en caractérisant les grandes familles des composés végétaux.

Enfin les extraits; huileux, organiques et aqueux sont testées pour évaluer leurs activités antibactérienne, antifongique et antiradicalaire.

2. Matériels végétales

2.1. Récolte

La *Nigelle* étudié dans cette approche expérimental provient du l'Est algérien. La cueillette d'échantillon a été faite au mois d'Avril 2011 dans la région d'Ain Slatna, située à 20 km au Nord de wilaya de Bordj bouareridj (Est de l'Algérie). Le Thé utilisé dans notre expérimentation provient du commerce. Il est connu sous le nom du thé vert de Chine (référence 0071).

Par ailleurs, *Erica multiflora* L. a été récoltée durant la période allant du mois de février jusqu'au mois de mars 2010, de station du wilaya d'Oran (Ouest de l'Algérie).

Les situations géographiques de cette station figurent dans le tableau 13 et figure 18.

Tableau 13: Situation géographique des stations de récolte.

Région	Altitude	Latitude	Longitude	Etage bioclimatique
Ain Slatna	928 m	36° 04' 00"	4° 46' 00"	continental
Hassi Mefsoukh	250 m	35°48' N	0°22' 0"	Semi-aride à hivers tempéré

2.2. Traitement

Les plantes, fraîchement récoltées, sont lavées et laissées sécher à l'ombre dans un endroit sec et aéré. Devenues sèches, les parties utilisées (tableau 14) sont broyées afin de procéder à l'extraction.

Tableau 14: Organes végétaux destinés à l'extraction.

L'espèce végétale	Les parties étudiées
<i>Nigella sativa</i> L.	Les graines
<i>Camellia sinensis</i> L.	Les feuilles
<i>Erica multiflora</i> L.	Les feuilles Les fleurs



Stations de récolte: 

Figure 18: Carte géographique montrant les stations de récolte

2.3. Les huiles essentielles

2.3.1. Procédé d'extraction

L'extraction d'huile essentielle a été effectuée par hydrodistillation dans un Clevenger (figure 19). 100g des graines sont introduits dans un ballon à 3 cols ou fiole de 2 litres, imprégné d'eau distillée, l'ensemble est porté à l'ébullition pendant 2 à 3 heures.

Les vapeurs chargées d'huile, en traversant un réfrigérant se condensent et chutent dans une ampoule à décanter, l'eau et l'huile se séparent par différence de densité.

L'huile séparée, de l'eau aromatique de couleur jaune et d'odeur très agréable, est déshydratée par le sulfate de sodium (Na_2SO_4) et conservée à $+4^\circ\text{C}$.

2.3.2. Calcul du rendement

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids d'huile extraite et le poids de la plante à traiter [1]. Le rendement, exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante:

$$R = P_B / P_A \times 100$$

Ou

$$R = [\sum P_B / \sum P_A] \times 100$$

Où :

R : Rendement de l'huile en %

P_B : poids d'huile en g

P_A : poids de la plante en g

2.3.3. Mesure de la densité

La densité relative d'huile essentielle est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile à 20°C et la masse d'un égal volume d'eau distillée à 20°C [2].



Figure 19: Montage d'hydrodistillation employé pour l'extraction d'huile essentielle.

2.4. Extraction

➤ Méthode d'extraction

Nous avons procédé à une extraction par décoction 10 % pendant trois temps différentes, une macération pendant 3 x 24 heures par l'eau, une infusion à trois concentrations différentes pendant trois temps différentes, une digestion pendant 3 heures et enfin une extraction par des solvants à polarité croissante (éther de pétrole, dichlorométhane, méthanol et éthanol). Une digestion et une décoction du marc ont été entreprises avec 150 ml d'eau distillée à chaque fois pendant 3 heures à la fin de procédés [3].

2.4.1. Décoction par l'eau

Nous avons procédé à une décoction dans un ballon, de la poudre des différentes parties étudiées (10 g) dans 100 ml d'eau distillée pendant 5, 10 et 15 minutes au bain marie à 100°C (figure 20).

Après refroidissement, nous avons filtré le décocté, le filtrat obtenu a été concentré sous vide à l'aide d'un Rotavapor (R110) à la température de 45 °C puis Lyophilisé.

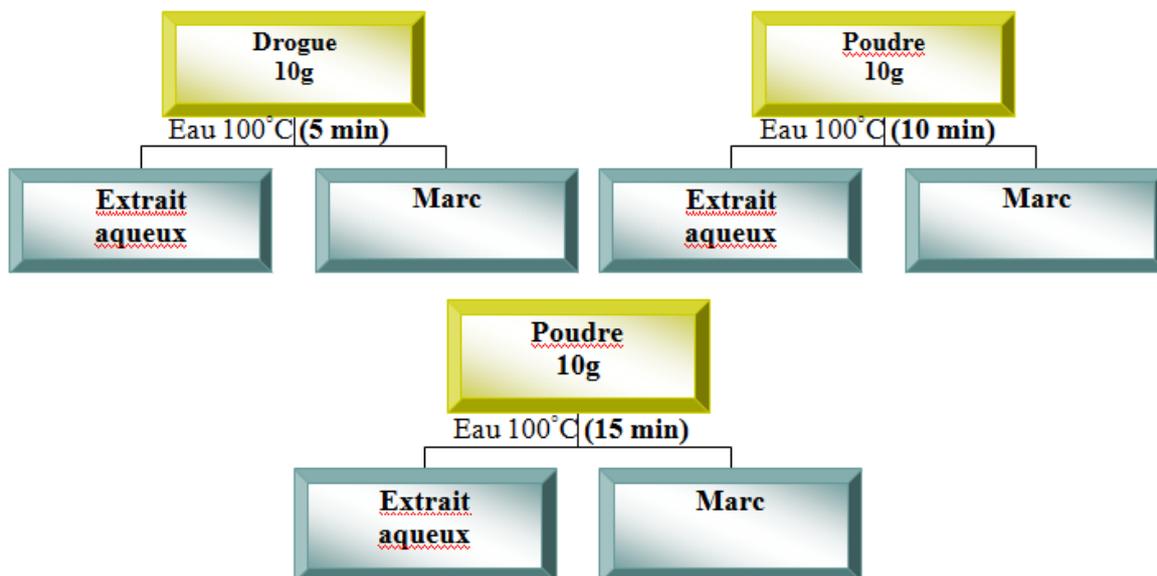


Figure 20: Extraction par décoction de la poudre des différentes parties étudiées

2.4.2. Macération par l'eau

10 g de poudre des drogues ont été mis en macération avec 100 ml d'eau distillée pendant 3 x 24 heures à la température de laboratoire. Après filtration, le macéré obtenu à été concentré au Rotavapor (R110) à la température de 45 °C puis lyophilisé (figure 21).

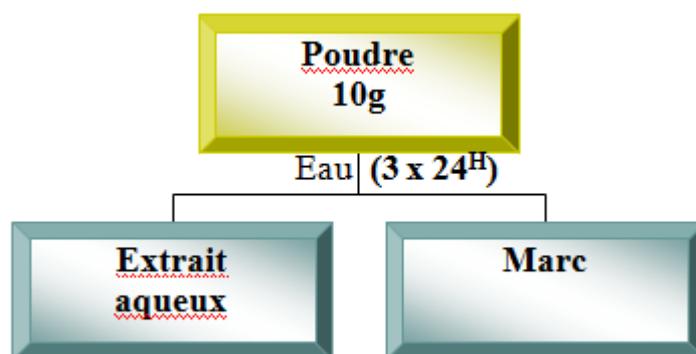


Figure 21: Extraction par macération de la poudre des différentes parties étudiées

2.4.3. Digestion à 50 °C

Dans un erlenmeyer, nous avons introduit 10 g de poudre préalablement pesé et 100 ml d'eau distillée, l'ensemble est chauffée à 50°C pendant 3 h. Après filtration, le filtrat obtenu a été concentré au Rotavapor (R110) à la température de 45 °C puis lyophilisé (figure 22).

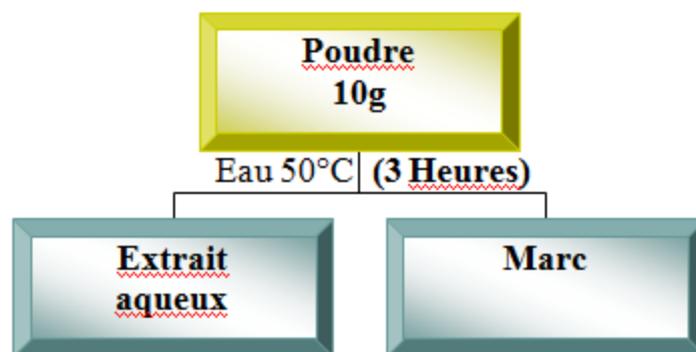


Figure 22: Extraction par digestion de la poudre des différentes parties étudiées

2.4.4. Infusion

Nous avons effectué une infusion à différentes concentrations (0.8, 1.6, 3.2) g. La poudre de chaque recette a été mise avec 100 ml d'eau distillée bouillante pendant 5, 10 et 15 min. Après filtration, le filtrat obtenu a été concentré au Rotavapor (R110) à la température de 45°C puis lyophilisé (figure 23).

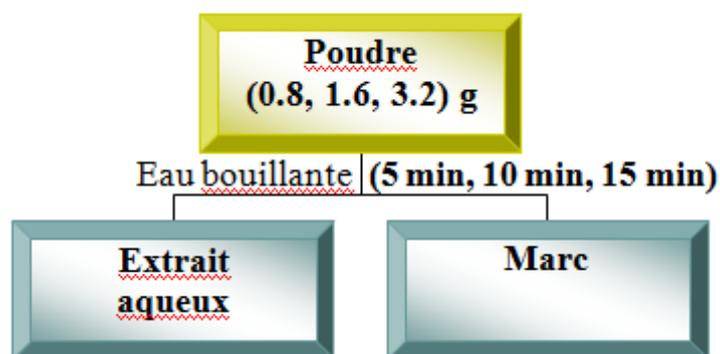


Figure 23: Extraction par infusion de la poudre des différentes parties étudiées

2.4.5. Extraction par solvants à polarité croissante

25 g de poudre des différentes parties étudiées ont été extraits avec 3 x 50 ml d'éther de pétrole et mis sous agitation pendant 3 x 24 heures. Après filtration, le marc est ensuite mis en agitation avec 3 x 50 ml de dichlorométhane pendant 3 x 24 heures. La même procédure pour le méthanol puis pour l'éthanol. Les extraits d'éther de pétrole, dichlorométhane, méthanolique et éthanolique ont été concentrés sous vide à 45°C à l'aide d'un Rotavapor (R110). A la fin d'extraction par les solvants organiques, le marc a été séché pendant 24 h, puis il a subi une digestion (50°C) puis une décoction (100°C) avec 150 ml d'eau distillée à chaque fois pendant 3 heures. Après filtration et concentration, les extraits aqueux ont été lyophilisés (figure 24).

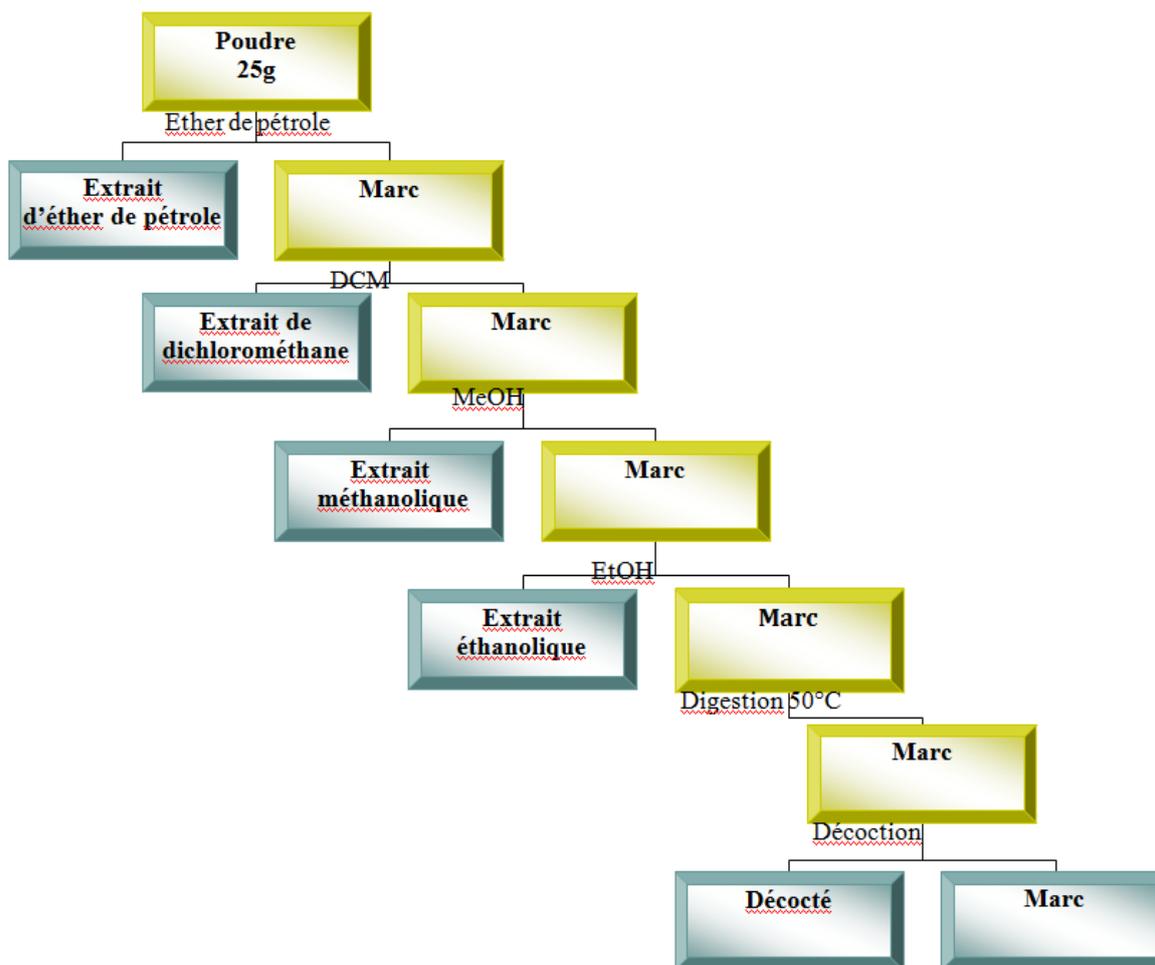


Figure 24: Extraction par solvants à polarité croissante de la poudre des différentes parties étudiées

3. Etude phytochimique

Une analyse phytochimique est effectuée parallèlement aux différents tests biologiques.

La phytochimie de la plante est réalisée par trois solvants de polarités différentes à savoir; méthanol, éthanol et eau. Les extraits bruts (méthanologique, éthanologique et aqueux) sont préparés par macération de 5 g de la poudre végétale dans 100ml de solvant.

3.1. Phytochimie qualitative

La phytochimie qualitative consiste en la mise en évidence des différentes familles de composés par la réalisation de réactions chimiques caractéristiques.

3.1.1. Tanins

A 2 ml de la solution à tester ajouter 2 à 3 gouttes de solution FeCl_3 à 2%. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu-noire et un précipité (laisser reposer quelques minutes) [4].

3.1.2. Saponosides

Test 1 : 5 ml de la solution à tester sont bien mélangés avec 10 ml d'eau distillée pendant 2 mn. La formation d'une mousse persistante après 15 mn confirme la présence des saponosides [4].

Test 2 : Evaporer 10 ml d'extrait éthanolique. Traiter le résidu obtenu avec 10 ml de chloroforme anhydre. Mélanger 5 ml de la solution chloroformique avec 5 ml d'anhydride acétique. Ajouter quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Agiter puis laisser reposer. L'apparition d'une coloration violacée fugace virant au vert confirme la présence des hétérosides stéroïdiques [4].

Test 3 : 5 ml de la solution à tester sont mélangés avec 2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique concentré. Une couleur rouge-marronne de la couche d'interface indique la présence des triterpènes hétérosidiques [5].

3.1.3. Flavonoïdes

Traiter 5 ml de chaque extrait avec quelques gouttes d'HCl concentré. Ajouter une quantité de tournures de magnésium (Laisser agir). La présence des flavonoïdes est confirmée par l'apparition d'une couleur rouge ou orange [4].

3.1.4. Glucosides cardiotoniques

Ce test est basé sur la réaction de Keller-Kiliani. A 1 ml de chaque extrait ajouter 5 ml d'acide acétique contenant des traces de FeCl_3 et 5 ml d'acide sulfurique contenant des traces de FeCl_3 . La présence des glucosides cardiotoniques est confirmée par la formation de deux phases, une colorée en brun rouge (acide acétique) et la deuxième en bleu-vert (acide sulfurique) [5].

3.1.5. Anthracénosides

Ce test est réalisé sur l'extrait éthanolique. En premier lieu, prendre 25 ml d'extrait éthanolique, ajouter 15 ml d'HCl 10%, porter à reflux pendant 30 mn, refroidir la solution et l'extraire 3 fois avec 15 ml de méthanol afin d'obtenir deux phases, aqueuse et méthanolique.

Le test de la présence des anthracénosides est basé sur la réaction de Borntrager. Evaporer 8 ml de la phase méthanolique, récupérer le résidu avec 2 ml d'eau chaude, ajouter quelques gouttes d' NH_4OH à 10%. Le test est positif par l'apparition d'une coloration rouge orangée [5].

3.1.6. Alcaloïdes

Deux réactifs sont utilisés : réactif de Mayer et réactif de Wagner qui sont préparés comme suit :

- *Réactif de Mayer* : 5 g de KI et 1,358 g de HgCl_2 solubilisés dans 100 ml d'eau distillée.

- *Réactif de Wagner* : 2 g de KI et 1,27g d'I₂ solubilisé dans 100 ml d'eau distillée.

Ce test se fait par ajout de quelques gouttes de chaque réactif, séparément, aux différents extraits étudiés. L'apparition d'un précipité confirme la présence des alcaloïdes [6].

3.1.7. Acides aminés

Ce test est basé sur la réaction des acides aminés avec la ninhydrine. A 1ml de la solution à tester (solubilisée dans l'eau distillée) ajouter 1ml de solution de ninhydrine préparée dans l'acétone (ou éthanol) dont la concentration est 1%. Chauffer dans un bain marie et observer le changement de couleur. La présence des aminoacides est confirmée par l'apparition d'une couleur violette [7].

3.2. Phytochimie quantitative

3.2.1. Dosage de calcium

Les graines de *Nigella sativa L* ont fait l'objet d'une digestion acide et analysées suivant la méthode décrite par [8]. La concentration du calcium a été déterminée par spectrophotomètre d'adsorption atomique (AAS).

3.2.2. Dosage d'Oxalate

La détermination de la concentration des oxalates a été réalisée en utilisant des kits de diagnostic (SOBIODA SAS, REF: 1310.001, France) selon la méthode de Lartillot et Vogel [9].

3.2.3. Dosage de tymoquinone

La méthode densitométrique HPTLC est utilisée pour la détermination de la quantité de thymoquinone dans l'huile des graines de *Nigella sativa L* [10].

4. Recherche d'activité antilithiasique

La recherche d'activité antilithiasique est effectuée sur des rats wistar rendus lithiasique par l'éthylène glycol.

4.1. Description de test biologique

Une grande partie de ce travail s'est déroulée au niveau d'animalerie de l'université de Tiaret, Institut des Science Vétérinaire (ISV). La première étape consiste à l'élevage des animaux dans le but d'obtenir un nombre important de rats mâles *Rattus norvegicus* variété Wistar qui sont nourris par l'aliment de bétail (ONAB).

Afin de ne pas stresser l'animal, les animaux se sont mis dans des conditions constantes et contrôlées (température plus ou moins constante de 25±2 °C, une humidité comprise entre 35 et 50 % et un rythme nyctéméral de 12h/12h).

Ils sont nourris d'un régime complet standard sous forme des granules ("EL AALF", unité de Rahouia), composé (tableau 15) de; céréales, tourteaux de soja, issues de céréales, huile de

soja, phosphate monocalcique, carbonate de calcium, lysine, méthionine, choline, plus un complexe minéralo-vitaminiques.

Tableau 15: Composition de l'aliment des rats [11].

Ingredients	Amounts /100 g of diet
Carbohydrates	58 g
Proteins	15 g
Lipids	7 g
Linoleic acid	1 g
Choline	0.5 g
Vitamin A	255 µg
Vitamin D	64 mg
Vitamin C	22 mg
Vitamin B1	290 µg
Vitamin B2	100 µg
Vitamin B6	500 µg
Vitamin B12	0.8 mg
Vitamin PP	7 mg
Vitamin E	3.5 mg
Vitamin K3	100 µg
Calcium	500 mg
Phosphorus	400 mg
Magnesium	120 mg
Iron	15 mg
Copper	500 µg
Zinc	400 µg
Manganese	700 µg
Sodium	0.5 g

L'eau et l'aliment leur sont fournis *ad libitum*.

Les tests de l'activité antilithiasique de la plante en question sont effectués à l'âge de 3 mois où les rats présentent un poids entre 120 et 130g. De ce fait, l'élevage des animaux constitue l'étape la plus longue.

4.2. Induction d'une lithiase urinaire

La lithiase urinaire est induite chez des rats mâles de poids moyen entre 120 et 130 g par le billet d'éthylène glycol (Merk, Germany) à raison de 0.75% (v/v) et de chlorure d'ammonium à raison de 1.0% (p/v) dissout dans l'eau de boisson [12].

4.3. Évaluation d'effet antilithiasique d'huile essentielle de *Nigella sativa* L.

Afin d'évaluer l'effet antilithiasique d'huile essentielle de *Nigella sativa* L. le protocole suivant a été adapté;

Les rats sujets sont répartis en cinq groupes différents: Groupes des rats normaux témoins, Groupes des lithiasiques témoins, Groupes des lithiasiques traités avec cystone 750 mg/kg,

Groupes des lithiasiques traités dès le premier jour avec l'huile de *Nigella sativa* L. et
Groupes des lithiasiques traités dès le 15^{ème} jour avec l'huile de *Nigella sativa* L.

Les groupes témoins ne reçoivent pas de traitement. En même temps, les groupes traités reçoivent quotidiennement les mêmes doses de l'extrait correspondant.

La voie d'administration est la voie intragastrique (par voie orale) (V.O). Le gavage est réalisé à l'aide d'une sonde de gavage à raison de 5 ml/kg.

Le suivi des animaux se fait à moyen terme durant 28 jours.

Pour ce faire, 30 rats mâles Wistar répartis en 05 lots ont été utilisés :

- Lot 1 (Groupe I): Témoins normaux (**RTN**);
- Lot 2 (Groupe II): Témoins lithiasiques (**RTL**);
- Lot 3 (Groupe III): Lithiasiques traités par cystone (**RLT CY**);
- Lot 4 (Groupe IV): Lithiasiques traités par l'huile essentielle de Nigelle dès le premier jour (**RLT HE₁**);
- Lot 5 (Groupe V): Lithiasiques traités par l'huile essentielle de Nigelle dès le 15^{ème} jour (**RLT HE₁₅**).

4.4. Évolution du poids corporel

Afin de déterminer le poids corporel et la croissance des rats, nous avons suivi l'évolution du poids corporel, des rats témoins et traités, périodiquement tout au long de l'expérimentation.

Les poids corporels sont mesurés à l'aide d'une balance en gramme (g) et les variations du poids corporel des rats par rapport au 1^{er} jour sont exprimées en pourcentage (%) et calculé selon la formule suivante:

$$\text{Variation du poids corporel (\%)} = \frac{(PJ - PJ_0) \times 100}{PJ_0}$$

PJ₀ : poids corporel au 1er jour ;

PJ : poids corporel au jour J.

4.5. Dosages des paramètres urinaires

Les analyses urinaires sont réalisées périodiquement (chaque semaine) afin de suivre l'évolution de ces paramètres; Volume, Oxalate, Phosphate, Calcium, Acide urique et magnésium; tout au long de l'expérimentation.

4.5.1. Mesure de volume urinaire

Afin de déterminer le volume des urines excrétées par les rats, nous avons mesurés l'évolution du volume des rats témoins et traités, périodiquement tout au long de

l'expérimentation. Le volume est mesuré à l'aide d'une éprouvette graduée (ml).

4.5.2. Dosage d'Oxalate

La détermination de la quantité d'Oxalate dans les urines se fait par des méthodes enzymatiques colorimétriques.

Principe

L'acide oxalique, en présence d'oxalate oxydase, est transformé en peroxyde d'hydrogène, qui, produit un composé de couleur bleue.

Réactif 1	Tampon pH 3.80	3-(Diméthylamino) acide Benzoïque	conservateurs et stabilisants
Réactif 2	Tampon succinique pH 3.80		conservateurs et stabilisateurs
Réactif 3	Oxalate oxydase	peroxydase	conservateurs et stabilisants
Standard	Oxalate 0.5 mM		conservateurs et stabilisants

Solution de travail

Mélanger 1 ml d'urine avec 1 ml de diluant échantillon.

Contrôler le pH si nécessaire, ajuster le pH entre 5.0 et 7.0 avec HCl (1N) ou NaOH (1N).

Vider le mélange dans un tube de purification.

Agiter vigoureusement pendant 5 minutes, soit manuellement par inversion et continuellement, soit grâce à un agitateur rotatif. Centrifuger ou filtrer.

Méthode de dosage

Réactifs	Blanc	Standard	Echantillon
Réactif 1	500 µl	500 µl	500 µl
Réactif 2	500 µl	500 µl	500 µl
Eau distillée	50 µl	-	-
Standard	-	50 µl	-
Echantillon	-	-	50 µl
Réactif 3	100 µl	100 µl	100 µl

Ajouter en dernier le **Réactif 3**; bien mélanger et laisser incuber pendant 10 minutes.

Faire le zéro avec le blanc réactif et lire les absorbances.

Calcule

$$\text{Acide Oxalique} = (A \text{ échantillon} / A \text{ standard}) \times 0.5 \times 2 \times L \text{ d'urine}$$

Les teneurs en Acide Oxalique sont exprimées en mg/24 h.

4.5.3. Dosage de Phosphate

La détermination du phosphate dans les urines se fait par la méthode U.V

Principe

Le phosphore inorganique est dosé selon la réaction suivante:

Phosphore

Molybdate d'Ammonium + Acide Sulfurique \longrightarrow Complexe phospho-molybdique

L'absorption de ce complexe à 340 nm est proportionnelle à la concentration en phosphore.

Réactif 1	Acide sulfurique	200 mmol/l
	Molybdate d'ammonium	0,40 mmol/l
Réactif 2	Standard phosphore	5 mg/dl
Standard		50 mg/l 1.61 mmol/l

Préparation d'échantillon

Urine diluée 1/10 avec de l'eau distillée.

	Blanc	étalon	Echantillon
Standard	-	10 μ l	-
Echantillon	-	-	10 μ l
Réactif de travail	1 ml	1 ml	1 ml

Mélanger et lire les DO après une incubation de 5 minutes.

Calcul

$$\text{Phosphore} = \text{D.O. Echantillon} / \text{D.O. Standard}$$

Les teneurs en Phosphore sont exprimées en mg/24 h.

4.5.4. Dosage de Calcium

La détermination du Calcium dans les urines se fait par des méthodes colorimétriques

Principe

Le calcium forme avec le complexant crésolphtaléine en milieu alcalin un composé coloré en violet dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en calcium.

Réactif 1	Tampon Alcalin		500 mmol/l
	Solution tampon	2-Amino-2-methyl 1 – Propanol	
Réactif 2	Complexant crésolphtaléine		0.62 mmol/l
	Solution chromogène	Hydroxy 8 quinoléine	69 mmol/l
Réactif 3	Standard calcium		10 mg/dl
	Standard		100 mg/l 2.5 mmol/l

Préparation d'échantillon

Urine diluée au 1/3 avec de l'eau distillée, acidifiée à pH 3,4 avec HCl dilué.

	Blanc	étalon	Echantillon
Standard	-	20 µl	-
Echantillon	-	-	20 µl
Mélange réactif	1 ml	1 ml	1 ml

Mélanger et lire les DO après une incubation de 5 minutes.

Calcule

$$\text{Calcium} = \text{D.O. Echantillon} / \text{D.O. Standard} \times n$$

n: valeur du standard

Les teneurs en Calcium sont exprimées en mg/24 h.

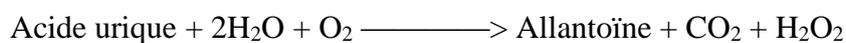
4.5.5. Dosage de l'Acide urique

La détermination du l'Acide urique dans les urines se fait par des méthodes enzymatiques colorimétriques.

Principe

L'acide urique est dosé selon les réactions suivantes:

Uricase



Péroxydase



Réactif 1	Tampon phosphate Solution tampon	pH 7.4 Dichloro Phénolsulfonate	2-4	50mmol/l 4 mmol/l
Réactif 2	Uricase Enzymes	Peroxydase Amino-4-Antipyrine		70 U/l 660 U/l 1 mmol/l
Réactif 3	Standard	Acide urique		6 mg/dl 60 mg/l 357 µmol/l

Préparation d'échantillon

Urine diluée au 1/10 avec de l'eau distillée.

	Blanc	Standard	Echantillon
Standard	-	20 µl	-
Echantillon	-	-	20 µl
Réactif de travaille	1 ml	1 ml	1 ml

Mélanger et lire les DO après une incubation de 5 minutes.

Calcule

$$\text{Acide urique} = \text{D.O. Echantillon} / \text{D.O. Standard} \times n$$

Les teneurs en Acide urique sont exprimées en mg/24 h.

4.5.6. Dosage de Magnésium

La détermination du Magnésium dans les urines se fait par des méthodes colorimétriques

Principe

Le magnésium forme un complexe coloré avec la calmagite en milieu alcalin. La présence d'EGTA rend la réaction spécifique.

L'intensité de la coloration produite est proportionnelle à la concentration en magnésium.

Réactif 1	Tampon	Amino-Méthyl propanol	1 mmol/l
	EGTA		0,20 mmol/l
Réactif 2	Calmagite		0,30 mmol/l
Réactif 3	Standard magnésium		2 mg/dl
			20 mg/l
			0,824 mmol/l

Préparation d'échantillon

Urine diluée au 1/10 avec de l'eau distillée, acidifiée à pH 3,4 avec d'HCl dilué.

	Blanc	Standard	Echantillon
Standard	-	10 µl	-
Echantillon	-	-	10 µl
Réactif de travaille	1 ml	1 ml	1 ml

Mélanger et lire les DO après une incubation de 5 minutes.

Calcule

$$\text{Magnésium} = \text{D.O. Echantillon} / \text{D.O. Standard} \times n$$

Les teneurs en Magnésium sont exprimées en mg/24 h.

4.6. Dosages des paramètres biochimiques sériques

A la fin d'expérimentation les rats sont anesthésiés et sacrifiés, le sang récupéré a subi une centrifugation à 10000 tr/min pour séparer le sérum. Ce dernier a fait l'objet des analyses pour déterminer quelques paramètres biochimiques; Créatinine, l'urée sanguine (BUN) et Acide urique

4.6.1. Dosage de l'Acide urique

La détermination du l'Acide urique dans le sérum se fait par une méthode enzymatique colorimétrique.

Sérum, plasma recueilli sur héparine.

Le même protocole (échantillon urine) est approuvé pour déterminer la teneur en acide urique.

Les teneurs en Acide urique sont exprimées en mg/dl.

4.6.2. Dosage de l'urée sanguine BUN (Blood Urea Nitrogen)

La détermination du BUN dans le sérum se fait par des méthodes colorimétriques.

Principe

La vitesse de diminution de l'absorbance à 340 nm due à l'oxydation du NADH en NAD est proportionnelle à la concentration d'urée dans l'échantillon.

R1	TRIS pH 7,8	80 mmol/L
Tampon	A-Cétoglutarate	6 mmol/L
R2	Uréase	3750 U/L
Enzymes	Glutamate déshydrogénase (GLDH)	6000 U/L
	NADH	0,32 mmol/L
UREA	Patron primaire de détection d'urée	50 mg/dL
CAL		

Préparation d'échantillon

Sérum, plasma recueilli sur héparine.

	Blanc	Modèle	Echantillon
RT (mL)	1,0	1,0	1,0
Modèle (µL)	-	10	-
Echantillon	-	-	10

Mélanger et consulter les absorbances aux 30^{ème} Secondes (A₁) et aux 90^{ème} Secondes (A₂).

Calculer $\Delta A = A_1 - A_2$

Calcule

$$\text{BUN} = (A) \text{ Echantillon} / (A) \text{ Modèle} \times 500$$

Les teneurs en BUN sont exprimées en mg/dl.

4.6.3. Dosage de la Créatinine

La détermination du Créatinine dans le sérum se fait par des méthodes colorimétriques.

Principe

La créatinine forme en milieu alcalin un complexe coloré avec l'acide picrique. La vitesse de formation de ce complexe est proportionnelle à la concentration de créatinine.

Réactif 1	Hydroxyde de sodium	1.6 mol/l
Réactif 2	Acide picrique	17.5 mmol/l
Réactif 3	créatinine	2 mg/dl
Standard		20 mg/l
		176,8 μmol/l

Préparation d'échantillon

Sérum, plasma recueilli sur héparine.

	Standard	Echantillon
Standard	100 μl	-
Echantillon	-	100 μl
Réactif de travaille	1 ml	1 ml

Calcule

Calculer $\Delta DO = DO_2 - DO_1$

pour le standard et les échantillons.

$$\text{Créatinine} = \Delta \text{D.O. Echantillon} / \Delta \text{D.O. Standard} \times n$$

Les teneurs en Créatinine sont exprimées en mg/dl.

4.7. Dosages des paramètres biochimiques rénaux

Une fois les rats sont anesthésiés et sacrifiées, un des deux reins récupéré a subi un séchage à 80 °C dans un four à air chaude. Un échantillon de 100 mg de rein est bouille dans 10 ml de HCl 1 N pour 30 min puis homogénéiser. L'homogénat a subi une centrifugation à 2000 tr\10 min et le surnageant est récupérer. Ce dernier a fait l'objet des analyses pour déterminer quelques paramètres rénaux biochimiques; Oxalate, Phosphate et Calcium

Les mêmes protocoles (échantillon urine) sont approuvés pour déterminer les teneurs en Oxalate, Phosphate et Calcium.

Les teneurs sont exprimées en mg/g.

4.8. Etude histologique

Les reins isolés ont été nettoyées de tissu grasseux et conservés dans le formol neutre à 10%. Une des reins isolé a ensuite été inclus dans des séries de bain d'alcool et toluène, puis mis

finalement dans le paraffine en utilisant des méthodes conventionnelles, coupé à des sections d'une épaisseur de 5 μm par un microtome. Les coupes sont recueillies sur des lames en verre et mises à sécher (durant la nuit à 40-45°C ou pendant 1 heure max à 60°C). Ces dernières ont subi une coloration à l'aide de l'hématoxyline et éosine. Finalement, les lames histologiques ont été observées sous microscope optique pour détecter les changements histopathologiques dans l'architecture de tissu des reins, des microphotographies ont été prises [13].

5. Activité antioxydante (test au DPPH)

Le pouvoir antioxydant de nos extraits a été testé par la méthode de Blois [14], méthode au DPPH [15, 16], avec quelques modifications. Ce radical (figure 25) libre stable possède une coloration violette foncée, lorsqu'il est réduit, la coloration devient jaune pâle.

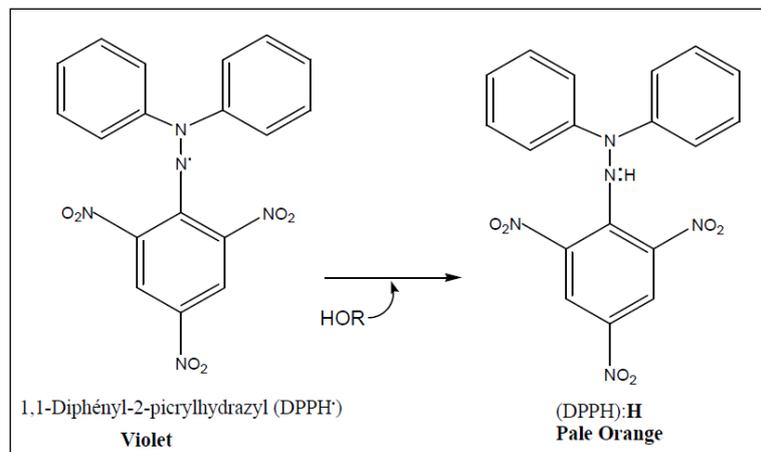


Figure 25: Forme libre et réduite du DPPH [17]

5. 1. Préparation de la solution DPPH

Le DPPH 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl ($\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$), est solubilisé dans du méthanol absolu pour en avoir une solution de 0,3 mM.

5. 2. Solution d'extrait

Pour ce test l'échantillon a été préparé par dissolution dans le méthanol absolu [18].

On prépare des solutions dans du méthanol absolu à raison de 1mg/ml. Ces solutions dites solutions mères, subiront ensuite des dilutions pour en avoir différentes concentrations de l'ordre de microgramme par ml (Tableau 16).

Tableau 16: Concentrations testées dans le test DPPH.

Extrait	Concentration $\mu\text{g} / \text{ml}$
L'huile	2
essentielle	10
<i>Nigella sativa</i> L.	20
	100
	300
	500
	1000
	3000
	5000

5. 3. Test au DPPH

Dans des tubes secs et stériles, on introduit 2,5 ml de la solution à tester, on ajoute 1ml de solution au DPPH. Après agitation par un vortex, les tubes sont placés à l'obscurité, à une température ambiante pendant 30 minutes. Pour chaque concentration, le test est répété 3 fois. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm par un spectrophotomètre.

Pour chaque dilution, on prépare un blanc, constitué de 2.5ml de la solution a testé additionné de 1ml de méthanol. Le contrôle négatif est composé de 1 ml de la solution méthanolique au DPPH (0,3 mM) et de 2.5 ml de méthanol.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard; l'acide ascorbique et le Trolox (acide 6-Hydroxy-2, 5, 7,8-Tetramethylchroman-2-Carboxylique " $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$ ") dont l'absorbance est mesuré dans les mêmes conditions que l'échantillon test.

5. 4. Expression des résultats

Pour obtenir la concentration efficace qui réduit la concentration initiale de DPPH de 50%, aussi bien que la puissance antiradicalaire (ARP égal à $1/ \text{EC}_{50}$) [19], les résultats sont exprimés en activité antioxydante.

L'activité antioxydante, qui exprime la capacité de piéger le radical libre est estimée par le pourcentage de décoloration du DPPH en solution dans le méthanol. L'activité antioxydante "AA%" est donnée par la formule suivante : [19]

$$\text{AA \%} = 100 - \left\{ \frac{(\text{Abs}_{\text{test}} - \text{Abs}_{\text{Blanc}}) \times 100}{\text{Abs}_{\text{control}}} \right\}$$

Soit :

AA : Activité Antioxydante

Abs : Absorbance à la longueur d'onde de 517 nm.

Les résultats sont exprimés par la moyenne de trois mesures \pm écart type.

La valeur EC₅₀ (autrement appelée la valeur IC₅₀) est déterminée pour chaque extrait, est défini comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH (couleur) (exprimée en mg de substrat/g de DPPH). Ou encore, c'est la concentration de l'échantillon exigé pour diminuer de 50% l'absorbance de la solution contrôle constitué de méthanol et DPPH.

Les valeurs EC₅₀ moyennes ont été calculées par les régressions linéaires des trois essais séparés où l'abscisse est représentée par la concentration des composés testés et l'ordonnée par l'activité antioxydante en pourcentage [20].

6. Activité antibactérienne et antifongique

6.1. Les souches testées

Nous avons repérés des patients, qui étaient des sujets atteints de la lithiase urinaires, hospitalisés ou non dans l'hôpital de Aïn Tedless, wilaya du Mostaganem.

Les prélèvements des souches microbiennes sont effectués, par isolement à partir des urines des patients.

Les souches utilisées dans les tests font parties de deux groupes de microorganismes (tableau 17), qui sont des pathogènes et des contaminants.

L'isolement des souches est effectué sur des milieux solides; Mac Conkey, gélose nutritive et Chapman pour les souches bactériennes et milieu sabouraud (chloramphénicol + actidione) pour la souche de levure. La purification des souches est effectuée par la suite. Après un examen microscopique et coloration de Gram, nous procédons à l'identification des souches.

L'identification des souches bactériennes est réalisée par galerie classique et plaque API20E (BioMérieux S.A., Marcy l'Etoile, France) pour les *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Proteus mirabilis* et *Klebsiella pneumoniae*) et *Pseudomonas spp.* Et les plaques APIS*taph* (BioMérieux S.A.) pour les *Staphylococcus spp.*

Pour les souches fongiques nous avons appliqué le test de Blastése puis procédé à la détermination de leurs caractères biochimiques par galerie classique et plaque APIC*andida*.

Tableau 17: source des souches concernées par les tests

Les souches	La source
Les bactéries	
1. Les souches de références	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Institut de pasteur d'Alger.
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 7002	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 27736	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862	
<i>Pseudomonas aerogenosa</i> ATCC 27853	
2. Les souches cliniques	
<i>E. coli</i>	Laboratoire de microbiologie de l'hôpital de Aïn Tedless wilaya de Mostaganem.
<i>Proteus mirabilis</i>	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Pseudomonas aerogenosa</i>	
Les levures	
1. La souche de référence	
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Institut de pasteur d'Alger.
2. La souche clinique	
<i>Candida albicans</i>	Laboratoire de microbiologie de l'hôpital de Aïn Tedless wilaya de Mostaganem.

Avant les tests, les souches ont subi une série de repiquage pour s'assurer de leur pureté.

6.2. Conservation des souches

Les souches ont été conservées à 4°C dans des tubes stériles contenant 10 ml de milieu de culture incliné (gélose nutritive).

6.3. Les milieux de culture

Suivant les méthodes employées dans l'essai et selon les souches, nous avons utilisés comme milieux de culture les suivants:

- Gélose Nutritive, Bouillon Nutritif et Gélose Muller Hinton pour les bactéries,
- Bouillon Nutritif, milieu Sabouraud et Gélose Muller Hinton pour les levures.

6.4. Préparation des précultures

Pour chaque microorganisme, 10 ml de milieu de culture fraîchement préparé et stérilisé (Bouillon Nutritif) à été inoculé avec une colonie prélevé d'une culture de 24 heure, incubé

durant 24 heures. Après 24 heures d'incubation, 1 ml de cette culture a été dilué dans l'eau distillé stérile (9 ml), pour en avoir une concentration de 0,1.

La suspension d'inoculum a été ensuite diluée 1:10 dans de l'eau distillé stérile pour avoir une concentration de 1×10^7 cfu/ml.

6.5. Les techniques microbiologiques

6.5.1. Sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques

Principe

Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique [21].

Choix des antibiotiques

Le choix des antibiotiques a été fait en fonction de la disponibilité.

❖ Les antibiotiques

- *Quinolones*: Acide Nalidixique '**Na**' 30µg
- *Cephalosporines*: Cefazoline '**Cz**' 30µg
- *Colistine*: Colistine '**Cs**' 50µg
- *Cyclines*: Doxycycline '**Do**' 30µg
- *Macrolides*: Erythromycine '**E**' 15µg
- *Aminosides*: Kanamycine '**K**' 30µg
- *Aminosides*: Néomycine '**N**' 30µg
- *Quinolones*: Norfloxacine '**Nor**' 5µg
- *Pénicillines*: Oxacilline '**Ox₁**' 1µg
- *Synergistines ou streptogramines*: Pristinamycine '**Pt**' 15µg
- *Rifampicine*: Rifampicine '**Ra**' 30µg
- *Cyclines*: Tétracycline '**Te**' 30µg
- *Trimethoprim + Sulfamides*: Trimethoprim + Sulfamide '**Sxt**' 1.23/23.75 µg

❖ Les antifongiques

- *Nystatine*: Mycostatine 30 ppm.

Méthodes d'étude

Pour les bactéries, on a testé leur sensibilité par la méthode des disques ou antibiogrammes standard [22], ainsi, cette méthode a été aussi appliquée pour les levures.

Ces méthodes de diffusion ou antibiogrammes standard sont les plus utilisées par les laboratoires de diagnostic. Des disques imprégnés des antibiotiques à tester, sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à

étudier. Dès l'application des disques, les antibiotiques diffusent leurs contenus de manière uniforme si bien que leurs concentrations qui sont inversement proportionnelles à la distance de disque. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture [23].

Application

Dans des boîtes de pétri de 9 cm de diamètre contenant 10^6 cfu/ml de culture bactérienne ensemencé à la surface de gélose de MH, des disques imprégnés de 20 μ l d'antibiotiques sont appliqués à la surface à des distances déterminés (5 disques/boîte). Les boîtes sont incubées à une température ambiante pendant 30 min, puis dans un réfrigérateur à 4 °C (2 heures) ensuite dans une étuve à 37°C pendant 24 heures. La lecture des résultats se fait par la mesure de la zone d'inhibition, qu'est représentée par une auréole formée autour de chaque disque où aucune croissance n'est observée.

6.5.2. Test de pouvoir antimicrobien

Essai antimicrobien

L'essai antimicrobien a été réalisé par la méthode de diffusion sur gélose [24, 25] la gélose Mueller Hinton [26] a été employé pour l'essai de la sensibilité des différentes souches [27, 28].

Test par diffusion sur disque

Des cultures pures développées durant 24 heures dans un bouillon nutritif, dénombrées à l'aide d'une lame appelée « **Salambini** », ajustées par l'eau distillée stérile pour passer de concentration 1×10^8 cfu/ml au 1×10^7 cfu/ml. 0,1 ml de chaque suspension, contenant approximativement 1×10^6 cfu à été étaler à la surface du milieu gélosé Mueller Hinton. Des disques de papier buvard chargés de 20 μ l de l'extrait, de 6 millimètres de diamètre, sphériques ont été placés à la surface gélosé sèche, inoculée au préalable par une suspension microbienne pure.

Les boîtes de pétri rempli à raison de 10 ml/boîte [25]. Après incubation à $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 24 heures, les diamètres des zones claires d'inhibition autour des disques ont été mesurés.

6.5.3. Détermination de la concentration minimal inhibitrice CMI

C'est la méthode de référence, qui peut être pratiquée en milieu liquide ou solide. Lorsque la mesure de CMI est effectuée selon une technique en milieu liquide, on distribue dans un premier temps, dans une série de tubes à hémolyse stériles, sous un même volume, des concentrations décroissantes d'huile essentielle (en progression géométrique en raison de 2). Puis on ajoute dans chacun des tubes, sous un même volume (100 μ l), une culture de bactéries

en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ 10^6 cfu/ml (inoculum microbien optiquement invisible).

La CMI (figure 26) sur la souche étudiée est définie comme étant la plus faible concentration inhibant, après une incubation (18 à 24 heures de contact à 37°C), toute croissance bactérienne visible à l'œil [29, 30].

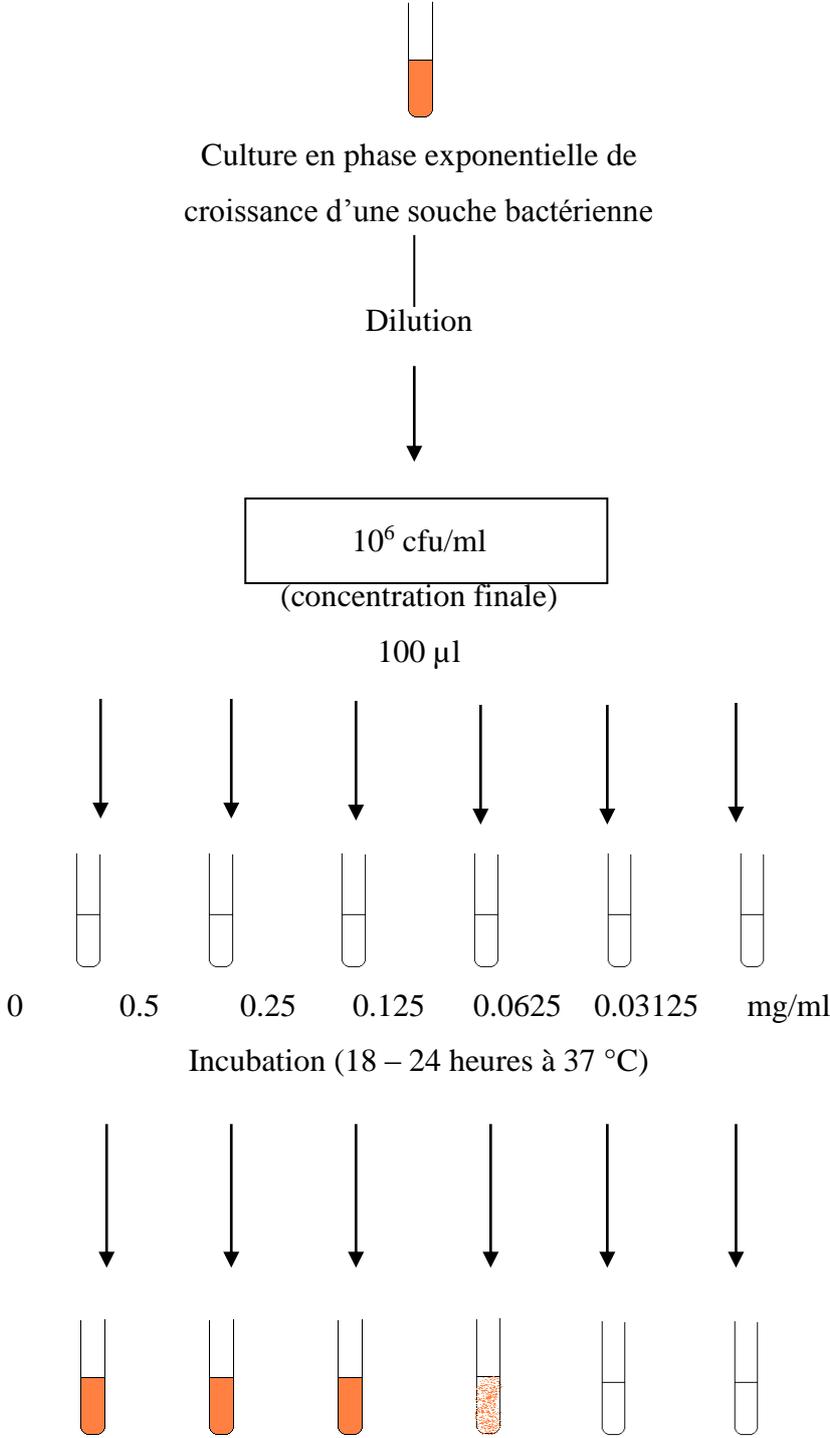


Figure 26: Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI

7. Analyses statistiques

Les calculs statistiques sont souvent utiles pour la détermination des valeurs normales ou plus exactement des valeurs de référence. Comme pour l'évaluation de précision et l'exactitude d'analyse. Pour cela une comparaison entre les différents groupes de rats est réalisée par un test de Student. Ce test nous donne le degré de signification «P» où la différence est significative si ($P < 0,05$).

7.1. La moyenne

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_i x_i$$

x : valeur de test

7.2. La variance

$$V_x = \frac{1}{n} \sum_i (x_i - \bar{x})^2$$

7.3. L'écart-type

$$\sigma_x = \sqrt{V_x}$$

7.4. L'erreur standard de la moyenne (Sm)

$$S_m = \frac{\sigma}{\sqrt{n-1}} = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n(n-1)}}$$

7.5. Test de Student

Dans les études, il est important de savoir si deux échantillons d'individus ou encore deux ou plusieurs séries de résultats d'expériences ou d'observations doivent être considérés comme réellement différents.

En cas de petits échantillons (n_1 et/ou $n_2 < 30$)

Dans un premier temps on calcule la variance commune comme suit :

$$\sigma^2 = \sigma_1^2 + \sigma_2^2 = \frac{\sum (x - m_1)^2 + \sum (x - m_2)^2}{n_1 + n_2 - 2} \Leftrightarrow \sigma^2 = \frac{n_1 \sigma_1^2 + n_2 \sigma_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

Dans ces conditions. La variance standard de la différence des moyennes est :

$$S_d^2 = \sigma^2 \left[\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right]$$

Pour comparer les deux moyennes on applique le teste de Student, à ν degrés de liberté qui dépend de la taille de l'échantillon :

$$\nu = d.l.l = n_1 + n_2 - 2$$

$$t_e = \frac{m_1 - m_2}{\sqrt{\sigma^2 \left[\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right]}}$$

Si le (t) calculé ou expérimentale est plus élevé que (t_v) de la table de Student, la différence entre les moyennes des deux échantillons est significative [31, 32].

La valeur de « t » nous donne le degré de signification « P » lu sur la table de Student. La différence entre deux moyennes est :

Peu significative : $P < 0.05$ (*);

Significative : $P < 0.01$ (**);

Très significative : $P < 0.001$ (***)).

Références

- [1]. Caree P. précis de technologie et de chimie industrielle. T3. Ed. Ballière JB. et fils. 1953.
- [2]. AFNOR. Recueil des normes françaises sur les huiles essentielles. Paris. 1992.
- [3]. Drissa Diallo, Rokia Sanogo, Hamsétou Yasambou, Aminata Traoré, Kassoum Coulibaly, Ababacar Maïga. Etude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. ELSEVIER, Mémoire / Full Paper. 2004, 1075.
- [4]. Karumi Y, Onyeyili PA, Ougubuaaja VO. Identification of active principles of *M. balsamina* (Balsam Apple) leaf extract. *J Med Sci.* 2004; 4(3):179-182.
- [5]. Edeoga HO, Okwu DE, Mbaebie BO. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology.* 2005; 4(7): 685-688.
- [6]. Bruneton J. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Ed TEC et DOC, 3^{ème} édition. 1999.
- [7]. Harbone JB. Phytochemical Methods, a guide to modern techniques of plant analysis. Ed Chapman et Hall, 3^{ème} Edition. 1998.
- [8]. Association of Official Analytical Chemists (AOAC) *Official Methods of Analysis*, 15th ed., Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC; 1990.
- [9]. LARTILLOT S., VOGEL C. Dosage de l'acide oxalique de l'urine et des calculs urinaires par une méthode enzymatique colorimétrique. *Feuille de biologie.* 1980, 21 (115): 43-48.
- [10]. Prawez Alam, Hasan Yusufoglu, Aftab Alam. HPTLC densitometric method for analysis of thymoquinone in *Nigella sativa* extracts and marketed formulations. *Asian Pac J Trop Dis;* 2013; (6): 467-471.
- [11]. Mourad Bardaoui, Rachid Sakly, Fadoua Neffati, Mohamed Fadel Najjar, Abdelhamid El Hani. Effect of vitamin A supplemented diet on calcium oxalate renal stone formation in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology.* 2010; (62): 573-576.
- [12]. Kalyani Divakar, A. T. Pawar, S. B. Dighe, Goli Divakar. Protective effect of the hydro-alcoholic extract of *Rubia cordifolia* roots against ethylene glycol induced urolithiasis in rats. *Food and chemical Toxicology.* 2010; (48):1013-1018.
- [13]. Hadjzadeh MA, Khoei A, Hadjzadeh Z, Parizady M. Ethanolic extract of *Nigella sativa* L seeds on ethylene glycol induced kidney calculi in rats. *Urol J;* 2007; (4): 86- 90.

- [14]. Zhu Q. Y., Hackman R. M., Ensunsa J. L., Holt R. R. et Keen C. L. Antioxidative Activities of Oolong Tea. *J. Agric. Food Chem*; 2002; (50): 6929-6934.
- [15]. Leitão G. G., Leitão S. G. et Vilegas W. Quick Preparative Separation of Natural Naphthopyranones with Antioxidant Activity by High-Speed Counter-Current Chromatography. *Z. Naturforsch.* 2002; (57c): 1051-1055.
- [16]. Chen C-N, Weng M-S, Wu C-L et Lin J-K. Comparison of Radical Scavenging Activity, Cytotoxic Effects and Apoptosis Induction in Human Melanoma Cells by Taiwanese Propolis from Different Sources. *eCAM*. 2004; 1(2): 175-185.
- [17]. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol*; 2004; 26 (2): 211-219.
- [18]. Panichayupakaranant P. et Kaewsuwan S. Bioassay-guided isolation of the antioxidant constituent from *Cassia alata L.* leaves. *Songklanakarin J. Sci. Technol*; 2004; 26(1): 103-107.
- [19]. Heilerová L., Bučková M., Tarapčík P., Šilhár S. et Labuda J. Comparison of Antioxidative Activity Data for Aqueous Extracts of Lemon Balm (*Melissa officinalis L.*), Oregano (*Origanum vulgare L.*), Thyme (*Thymus vulgaris L.*), and Agrimony (*Agrimonia eupatoria L.*) obtained by Conventional Methods and the DNA-Based Biosensor. *Czech J. Food Sci*; 2003; 21 (2): 78–84.
- [20]. Mensor L. L., Menezes F. S., Leitão G. G., Reis A. S., Santos T. C., Coube C. S. et Leitão S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant isoactivity by the use of DPPH free radical method. *Phy- tother. Res*; 2001; 15: 127-130.
- [21]. Burnichon N. et Texier A. l'antibiogramme : la détermination des sensibilités au antibiotiques. *DES bactériologies*. 2003.
- [22]. Joffin J-N. et Leyral G. *Microbiologie Technique. 1 Dictionnaire des techniques. Collection Biological Technique. 3e edition. CNDP. 2001, 312.*
- [23]. Guérin-Faubleé V. et Carret G. L'antibiogramme : principes, méthodologie, intérêt et limites. *Journées nationales GTV-INRA. 1999, 5-12.*
- [24]. Murtaza N., Mirza M. Yaqeen Z. et Badar Y. Studies on antibacterial activity of *Nelumbium speciosum* Wild seed oil extracts. *PJSIR*. 1994; 37: 269-272.
- [25]. Veličković Dragant T., Randjelović Novica V., Ristić Mihailo S., Veličković Ana S. et Šmelcerović Andrija A. Chemical constituents and antimicrobial activity of the ethanol extracts obtained from the flower, leaf and stem of *Salvia officinalis L.* *J.Serb.Chem.Soc*; 2003; 68 (1): 17–24.

- [26]. Ericsson H.M.A. et Sherris J.C. Antibiotic sensitivity testing. Report of an International Collaborative Study. Acta path Microbiol Scand. B Suppl; 1971; 217: 90.
- [27]. Nostro A., Germanò M. p., D'Angelo V., Marino A. et Cannatelli M.a. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. Lettres en microbiologie appliquée; 2000; 30 (5): 379.
- [28]. Rahman M. et Gul S. Antibacterial Activity of Hydrodistilled Essential Oil of *Psammogeton canescens* N.O. Umbelliferae. Biotechnology; 2002; 1 (1): 55-60.
- [29]. Mathabe M.C, Nikolova R.V, Lall N, Nyazema N.Z. Antibacterial activities of medicinal plants used for the treatment of diarrhoea in Limpopo Province, South Africa. Journal of Ethnopharmacology. 2006; 288.
- [30]. Patrick B, Jean-louis. G, Michel. S, bactériologie; les bactéries des infections humaines. 1^{re} Ed Paris, 1988. 108, 116, 123, 236, 274, 593-600.
- [31]. Amotte M., Initiation aux méthodes statistiques en biologie 2^{ème} Ed. Paris; Masson et Cie. 1971.
- [32]. Schwartz D., Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. 3^{ème} edit. Paris ; Flammarion medecine-Sciences. 1992.

Résultats et Interprétation

1. Extraction des huiles essentielles

1.1. Rendement et densité

L'estimation de rendement d'huiles essentielle brut est résumée dans la figure 27. La valeur est 1.72 %; (g) par rapport à 100g de plante sèche (graines).

La mesure de densité "d" effectuée à 20°C d'huiles essentielle de *Nigella sativa* L est moyenne. La valeur de "d" à 20°C est de 0.82 (figure 28).

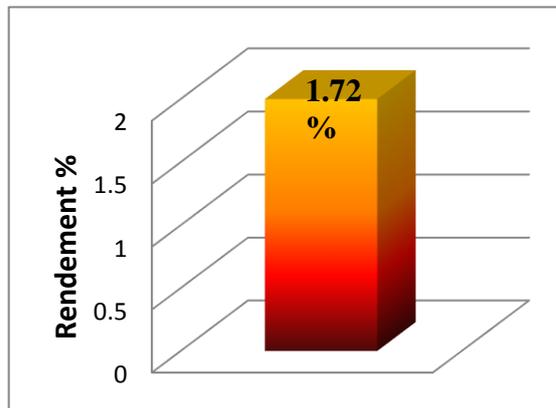


Figure 27: Rendement en huile essentielle

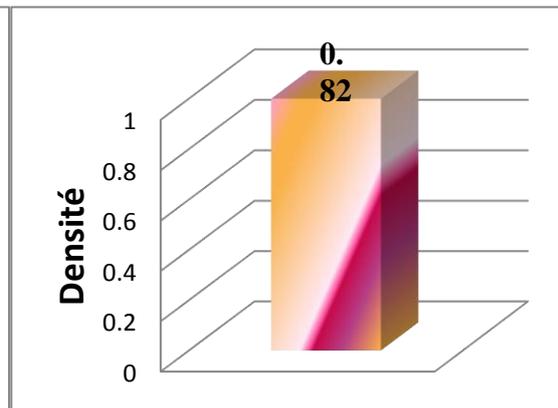


Figure 28: Densité d'huile essentielle

2. Etude phytochimique :

2.1. Tests qualitatifs :

Le screening phytochimique réalisé sur les graines de *Nigella sativa* L, les feuilles de *Camellia sinensis* L et les feuilles et fleurs d'*Erica multiflora* L nous a permis d'avoir les résultats présentés au tableau 18.

L'ajout du FeCl_3 aux trois extraits a permis de mettre en évidence la présence des tanins au niveau de tous les extraits des trois plantes mais leur absence dans l'extrait méthanolique de *Nigella sativa* L.

Ce dernier a signalé la présence des saponisides dans l'extrait aqueux et leur absence dans les restes des extraits de *Nigella sativa* L. Ce pendant les Stéroïdes et les Triterpénoides ont prouvées leurs richesse dans toutes les extraits de *Nigella sativa* L. et *Camellia sinensis* L mais leus pauvreté dans les extraits d'*Erica multiflora* L.

Les flavonoïdes ont réclamés présent suite au test colorimétrique de détection sur toute la gamme des extraits des trois plantes objets d'étude.

Tableau 18: Résultats des tests phytochimiques

Composé	Espèce	<i>Nigella sativa</i> L			<i>Camellia sinensis</i> L			<i>Erica multiflora</i> L		
		EA	EE	EM	EA	EE	EM	EA	EE	EM
Tanins		+	+	-	+	+	+	+	+	+
Saponosides:	Test 1	+	-	-	+	+	+	+	-	-
	Stéroïdes	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Triterpénoides	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Flavonides		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucosides cardiotoniques		+	+	-	+	-	+	+	-	+
Anthracénosides		+	+	-	+	-	-	-	-	-
Alcaloïdes:	Test 1	+	+	-	+	-	-	-	-	-
	Test 2	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Huiles volatiles		+	+	+	+	/	+	-	-	-
Acides gras		/	+	+	/	+	+	/	/	/
Acides aminés		+	/	/	+	/	+	+	/	/

EA : Extrait Aqueux, EE : Extrait Ethanolique, EM : Extrait Méthanolique

+ : DéTECTÉ

- : Non détecté

/ : Non effectué

D'autres métabolites sont mis en évidence. Un résultat positif de la réaction de Keller-Kiliani effectué sur les extraits aqueux confirme la présence des glucosides cardiotoniques.

L'analyse qualitative des anthracénosides nous a permis de confirmer leurs présences.

Ainsi, nous avons constaté l'existence des alcaloïdes sels au niveau des extraits aqueux et éthanolique chez *Nigella sativa* L et aqueux de *Camellia sinensis* L prouvée par la formation de précipité ainsi que l'huile volatile et les acides gras révélés par l'obtention d'un résidu arôme et un résidu gras.

La recherche des acides aminés montre une richesse dans les extraits aqueux.

Les graines de *Nigella sativa* L, les feuilles de *Camellia sinensis* L et les feuilles et fleurs d'*Erica multiflora* L sont très riches en composés pouvant être actifs. L'usage de solvants de polarité différente semble influencer sur la qualité de composé extrait. Nous pouvons conclure que l'eau est le solvant le plus polaire qui permet une bonne extraction de la plupart des métabolites secondaires présents dans les plantes.

2.2. Tests quantitatifs :

Ces tests ont pour but de quantifier quelques composés minéraux et aromatiques.

Tableau 19: Caractéristiques chimiques (matière sèche) des graines de *Nigella sativa* L. (mg/kg)

éléments	<i>Nigella sativa</i>
Calcium	536 ± 18.93
Oxalate	0.031 ± 0.01

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD de trois tests.

La matière minérale ou cendres, présente une teneur importante. Ces minéraux sont représentés surtout par des éléments tels que le Ca²⁺ (536 mg) et l'Oxalate (0.031mg).

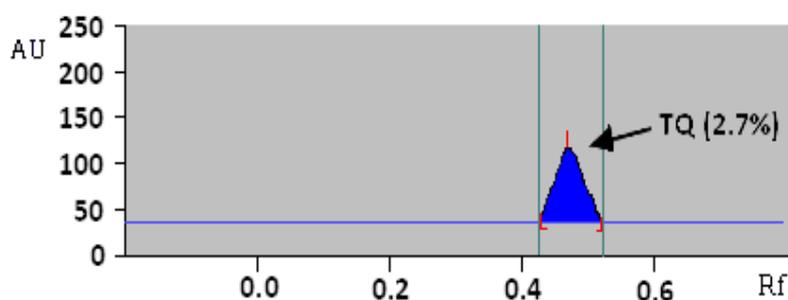


Figure 29: Chromatogramme HPTLC d'huile essentielle des graines de *Nigella sativa* L.

Les composés phénoliques sont présents en taux élevé (2.7%). Cela a été montré par les tests phytochimiques, par la mise en évidence de la présence des flavonoïdes, tanins, l'huile essentielle et autres.

3. Évaluation d'effet antilithiasique d'huile essentielle de *Nigella sativa* L.

Les essais d'évaluation d'activité antilithiasique de *HENS* (Huile Essentielle de *Nigella sativa* L) ont été réalisés en plusieurs étapes afin de suivre son efficacité.

Pour chaque essai, nous avons des lots prévus de rats normaux (sains), lithiasiques, traités et témoins (non traités).

Les rats sont rendus lithiasiques par l'éthylène glycol administré par voie intra-gastrique. La lithiase rénale résultante était variable d'un animal à l'autre.

3.1. Évolution du poids corporel

Les résultats de l'effet du traitement des rats normaux et des rats lithiasiques par l'extrait brut de *Nigella sativa* L par administration orale (5 ml/kg) p.c d'huile essentielle de *Nigella sativa* L, sur l'évolution du poids corporel, durant 28 jours, sont représentés dans la tableau 20.

Tableau 20: Variation du poids corporel chez les rats normaux lithiasiques soumis à un gavage intra-gastrique quotidien de 5 ml/kg p.c d'huile essentielle de *N. sativa* L durant 28 jours.

Jours	Groupe I	Groupe II	Groupe III	Groupe IV	Groupe V
0	126,33 ± 4,03	127,33 ± 3,50	128,33 ± 2,94	125,50 ± 3,93	124,66 ± 3,14
7	163,00 ± 5,83	118,17 ± 1,94 ^{a**}	149,00 ± 5,44 ^{a* b**}	124,50 ± 3,51 ^{a**}	111,00 ± 3,03 ^{a**}
14	186,00 ± 5,73	110,17 ± 2,99 ^{a**}	169,83 ± 6,58 ^{a** b**}	127,17 ± 4,44 ^{a** b*}	102,33 ± 2,80 ^{a**}
21	207,67 ± 5,00	100,83 ± 2,04 ^{a**}	188,33 ± 5,82 ^{a** b**}	145,67 ± 4,54 ^{a** b**}	102,17 ± 3,49 ^{a**}
28	234,17 ± 7,98	94,67 ± 2,87 ^{a**}	204,33 ± 3,77 ^{a** b**}	166,33 ± 4,03 ^{a** b**}	109,33 ± 1,86 ^{a** b*}

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD de trois tests. (n = 6 animales/groupe).

a Comparisons sont mis avec Groupe I.

b Comparisons sont mis avec Groupe II.

* Statistiquement significative à p < 0.05.

** Statistiquement significative à p < 0.01.

*** Statistiquement significative à p < 0.001.

Nous avons enregistré une diminution progressive (-25.65 %) du poids corporel chez les rats lithiasiques témoins (non traités) par rapport aux deux lots; rats témoin normaux (+85.36 %) et lithiasiques traités avec cystone (+59.22 %).

Par contre, les rats lithiasiques traités avec l'huile des graines dès le 1^{er} jour, on a observé une légère diminution du poids corporel après la première semaine, puis une re-augmentation dès la 2^{ème} semaine du traitement jusqu'à la fin d'expérimentation (+32.53 %). En revanche, une nette diminution du poids corporel est enregistrée chez les rats de cinquième lot durant les trois premières semaines (-18.04 %) puis une légère croissance corporelle après la troisième semaine (+7.01 %), alors qu'une faible variation du poids a été observée chez les rats normaux non traités.

3.2. Dosages des paramètres urinaires

3.2.1. Mesure de volume urinaire

Le tableau 21 représente la variation de volume urinaire excrété durant 28 jours après l'administration intra-gastrique de 5 ml/kg p.c d'huile des graines de *Nigella sativa* L, chez les rats lithiasiques traités dès le premier jour (RLT HE₁) et rats lithiasiques traités dès le 15^{ème} jour (RLT HE₁₅), comparée aux rats lithiasiques traités avec cystone (RLT CY), rats témoins normaux (RTN) et rats témoins lithiasiques (RTL).

Tableau 21: Variation du volume urinaire chez les rats normaux lithiasiques soumis à un gavage intra-gastrique quotidien de 5 ml/kg p.c de l'huile essentielle de *Nigella sativa* L durant 28 jours.

Jours	Groupe I	Groupe II	Groupe III	Groupe IV	Groupe V
0	08,00 ± 1,09	07,00 ± 0,89	07,83 ± 0,75	07,17 ± 0,75	06,83 ± 0,75
7	07,83 ± 1,17	12,33 ± 0,82 ^{a**}	17,00 ± 0,89 ^{a** b*}	14,50 ± 2,59 ^{a**}	12,33 ± 0,51 ^{a**}
14	09,00 ± 0,63	17,00 ± 0,55 ^{a**}	19,16 ± 0,75 ^{a**}	18,67 ± 2,16 ^{a**}	18,00 ± 0,89 ^{a**}
21	09,83 ± 0,75	18,50 ± 1,05 ^{a**}	21,83 ± 0,75 ^{a**}	24,33 ± 2,42 ^{a**}	20,00 ± 2,28 ^{a**}
28	09,33 ± 1,03	19,67 ± 0,81 ^{a**}	23,33 ± 1,03 ^{a**}	27,83 ± 2,31 ^{a** b**}	21,83 ± 2,31 ^{a**}

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD de trois tests. (n = 6 animales/groupe).

a Comparisons sont mis avec Groupe I.

b Comparisons sont mis avec Groupe II.

* Statistiquement significative à p < 0.05.

** Statistiquement significative à p < 0.01.

*** Statistiquement significative à p < 0.001.

Durant les 4 semaines, nous avons enregistré chez les rats rendus lithiasiques traités avec (RLT CY, RLT HE₁ et RLT HE₁₅) une augmentation progressive de volume d'urine excrété à partir de la 1^{ère} semaine; elle varie de (7.83, 7.17 et 6.83) ml à (23.33, 27.83 et 22.83) ml respectivement. Cette augmentation est significative à la fin d'expérimentation pour les rats lithiasiques non traités (RLT).

En revanche, pour les rats normaux témoins (RTN), nous n'avons remarqué aucun changement significatif de volume urinaire. Celle-ci reste dans les limites normales.

3.2.2. Dosage d'Oxalate

Durant les quatre semaines de traitement, nous avons observé une augmentation d'oxalate chez les deux lots des rats lithiasiques non traités (RTL) et traités avec l'huile de *Nigella sativa* L. dès la troisième semaine RLT HE₁₅ (tableau 22). Cette variation est importante chez les lithiasiques non traités, cette augmentation est hautement significative p < 0.01 à la 3^{ème} semaine. Mais nous pouvons remarquer qu'aux deux premières semaines, les deux groupes ont des taux d'oxalate proches.

En revanche, les deux autres groupes lithiasiques traités; avec cystone et l'huile de *Nigella sativa* L. dès la 1^{ère} semaine ont présentés des taux d'oxalates (06.30 et 06.98) mg/24h

respectivement peu comparables à ceux signalés chez les rats témoins normaux de premier lot (05.23) *mg/24h*. A partir de ces résultats, il semble que notre extrait est efficace pour stabiliser le taux d'oxalate.

Pour les rats normaux, le taux d'oxalate reste, dans les limites, normale. Une légère variation est observée et qui reste statistiquement non significative.

3.2.3. Dosage de phosphate

Le taux de phosphate des rats impliqués dans ce test (tableau 22) montre une légère variation en taux de phosphate des rats lithiasiques traités avec cystone 05.92 *mg/24h* et l'huile de nigelle dès le jour 06.16 *mg/24h*, par rapport aux rats témoins non traités de premier lot 05.87 *mg/24h*. Par contre, ceux traités par l'huile de nigelle dès la troisième semaine et lithiasique non traités ont présentés une légère élévation (07.00 et 07.99) *mg/24h* respectivement. Cette augmentation $p < 0.01$ est moyennement importante par rapport à celle des lithiasiques témoins. De ce, nous pouvons conclure que notre l'huile pourrait agir positivement sur la stabilité des concentrations phosphatique.

3.2.4. Dosage de calcium

Le tableau 22 illustre la variation de concentration de calcium des rats témoins et traités. Le traitement à la 1^{ère} semaine des rats lithiasiques par 750mg/kg de cystone provoque une diminution de taux de calcium (-19.11 %) alors qu'une re-augmentation est observée à la 2^{ème} semaine (+1.82 %). L'extrait d'huile brut à 5 ml/kg semble être non efficace et sans influence sur la variation de concentration de calcium des rats lithiasiques des lots 4 et 5.

Chez les rats normaux, l'évolution de taux calcique est normale et qu'aucune variation n'a été enregistrée chez les animaux normaux.

3.2.5. Dosage d'acide urique

Le tableau 22 résume la réponse des rats de différents lots lithiasiques ou saines, traités avec cystone ou l'huile de nigelle dès la première RLT HE₁ et la troisième semaine RLT HE₁₅ vis-à-vis la variabilité de taux d'acide urique. L'huile de *Nigella sativa* L qui a amélioré l'excrétion d'acide urique chez les rats lithiasiques RLT HE₁ de quatrième lot (+38.57 %). De même, pour les rats témoins normaux (+2.16 %) et lithiasiques traités avec cystone (+26.95 %) ont conservées des taux d'acide urique presque stable et comparable.

A partir de ces résultats, nous pouvons conclure que l'huile de *Nigella sativa* L. à la dose testée est efficace sur la diminution de taux d'acide urique excrété.

3.2.6. Dosage de magnésium

Nous représentons dans le tableau 22, la variation de concentration magnésique durant les 28 jours de traitement. Les rats lithiasiques traités par cystone et l'huile de *Nigella sativa* L. RLT

HE₁ présentent une faible diminution dès la première semaine de traitement et qui continue jusqu'à la 4^{ème} semaine (-16.67 %) et (-21.75 %) respectivement. Cette variation est statistiquement non significative. Sauf que, pour les lithiasiques témoins, le taux de magnésium est en constante diminution jusqu'à attendre un taux de 1.56 mg/24h (- 43.07 %).

Tableau 22: L'effet d'huile des graines de *Nigella sativa* L sur le taux urinaire d'Oxalate, Phosphate, Calcium, Acide urique et Magnesium chez les rats sujets de test (*mg/24 h*).

Jours	Groupe I	Groupe II	Groupe III	Groupe IV	Groupe V
<i>Oxalate</i>					
0	05,21 ± 0,15	05,08 ± 0,08	05,03 ± 0,10	05,11 ± 0,09	05,06 ± 0,08
7	05,24 ± 0,06	06,75 ± 0,06 ^{a**}	05,36 ± 0,06 ^{b**}	05,49 ± 0,10 ^{b**}	06,68 ± 0,09 ^{a**}
14	05,26 ± 0,10	08,25 ± 0,07 ^{a**}	05,62 ± 0,09 ^{b**}	05,88 ± 0,08 ^{a* b**}	08,16 ± 0,11 ^{a**}
21	05,22 ± 0,03	10,17 ± 0,12 ^{a**}	05,92 ± 0,08 ^{a* b**}	06,42 ± 0,09 ^{a** b**}	08,87 ± 0,06 ^{a** b**}
28	05,23 ± 0,08	11,82 ± 0,07 ^{a**}	06,30 ± 0,10 ^{a** b**}	06,98 ± 0,07 ^{a** b**}	09,27 ± 0,12 ^{a** b**}
<i>Phosphate</i>					
0	05,87 ± 0,12	05,99 ± 0,06	05,87 ± 0,08	05,88 ± 0,09	05,91 ± 0,09
7	05,85 ± 0,16	06,38 ± 0,06 ^{a**}	06,02 ± 0,07 ^{b*}	05,96 ± 0,08 ^{b**}	06,28 ± 0,03 ^{a*}
14	05,93 ± 0,06	06,81 ± 0,07 ^{a**}	05,93 ± 0,06 ^{b**}	06,05 ± 0,11 ^{b**}	06,81 ± 0,05 ^{a**}
21	05,95 ± 0,08	07,37 ± 0,11 ^{a**}	05,90 ± 0,11 ^{b**}	06,07 ± 0,08 ^{b**}	06,96 ± 0,06 ^{a** b**}
28	05,87 ± 0,09	07,99 ± 0,09 ^{a**}	05,92 ± 0,06 ^{b**}	06,16 ± 0,10 ^{a* b**}	07,00 ± 0,07 ^{a** b**}
<i>Calcium</i>					
0	00,69 ± 0,03	00,56 ± 0,05	00,68 ± 0,03	00,61 ± 0,08	00,53 ± 0,05
7	00,71 ± 0,03	00,34 ± 0,07 ^{a**}	00,55 ± 0,02 ^{a* b*}	00,48 ± 0,06 ^{a** b*}	00,32 ± 0,09 ^{a**}
14	00,67 ± 0,03	00,24 ± 0,08 ^{a**}	00,56 ± 0,07 ^{a* b**}	00,41 ± 0,06 ^{a** b**}	00,28 ± 0,05 ^{a**}
21	00,60 ± 0,07	00,21 ± 0,04 ^{a**}	00,60 ± 0,10 ^{b**}	00,39 ± 0,07 ^{a** b**}	00,24 ± 0,08 ^{a**}
28	00,66 ± 0,08	00,13 ± 0,04 ^{a**}	00,61 ± 0,11 ^{b**}	00,34 ± 0,08 ^{a** b**}	00,21 ± 0,04 ^{a** b*}
<i>Uric acid</i>					
0	01,39 ± 0,03	01,34 ± 0,06	01,41 ± 0,07	01,40 ± 0,04	01,41 ± 0,04
7	01,41 ± 0,04	01,68 ± 0,08 ^{a*}	01,49 ± 0,08	01,52 ± 0,04 ^{b*}	01,63 ± 0,05 ^{a*}
14	01,40 ± 0,02	02,16 ± 0,06 ^{a**}	01,62 ± 0,10 ^{a* b**}	01,65 ± 0,03 ^{a* b**}	01,82 ± 0,06 ^{a** b**}
21	01,40 ± 0,05	02,47 ± 0,06 ^{a**}	01,72 ± 0,07 ^{a* b**}	01,78 ± 0,06 ^{a* b**}	02,16 ± 0,07 ^{a** b**}
28	01,42 ± 0,04	02,79 ± 0,09 ^{a**}	01,79 ± 0,13 ^{a* b**}	01,94 ± 0,08 ^{a** b**}	02,02 ± 0,07 ^{a** b**}
<i>Magnesium</i>					
0	02,77 ± 0,08	02,74 ± 0,12	02,88 ± 0,06	02,85 ± 0,05	02,81 ± 0,10
7	02,80 ± 0,07	02,36 ± 0,07 ^{a**}	02,76 ± 0,04 ^{b*}	02,71 ± 0,07 ^{b**}	02,48 ± 0,09 ^{a*}
14	02,81 ± 0,07	02,06 ± 0,06 ^{a**}	02,69 ± 0,05 ^{b**}	02,51 ± 0,08 ^{a* b**}	02,35 ± 0,05 ^{a** b*}
21	02,72 ± 0,07	01,80 ± 0,07 ^{a**}	02,52 ± 0,06 ^{a* b**}	02,37 ± 0,04 ^{a** b**}	02,23 ± 0,04 ^{a** b**}
28	02,81 ± 0,08	01,56 ± 0,05 ^{a**}	02,40 ± 0,06 ^{a** b**}	02,23 ± 0,06 ^{a** b**}	02,11 ± 0,04 ^{a** b**}

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD de trois tests. (n = 6 animales/groupe).

a Comparisons sont mis avec Groupe I.

b Comparisons sont mis avec Groupe II.

* Statistiquement significative à $p < 0.05$.

** Statistiquement significative à $p < 0.01$.

*** Statistiquement significative à $p < 0.001$.

3.3. Dosages des paramètres biochimiques sériques

La lithiase rénale induite est associée à des altérations significatives de quelques paramètres sériques clés incluant l'acide urique, l'urée sanguine (BUN) et la créatinine.

Le tableau 23 présente l'évolution de quelques paramètres biochimiques sériques (créatinine, acide urique et BUN,).

3.3.1. Dosages de créatinine

D'après les résultats regroupés dans le tableau 23, nous n'avons pas pu noter des différences significatives de l'évolution de créatinine sérique, après 28 jours, chez les rats soumis à une administration orale quotidienne dès le 1^{er} jours à 750 mg/kg de cystone (+21.74 %) et l'huile de *Nigella sativa* L à 5 ml/kg p.c, (+36.23 %) par rapport au rats de premier lot; mises à part une augmentation significative (+59.42 % et +44.92 %) mg/dl chez les rats du 2^{ème} et 5^{ème} lot respectivement.

3.3.2. Dosages d'acide urique

L'analyse d'évolution d'acide urique sérique, 28 jours après l'administration orale d'extrait d'huile brut de *Nigella sativa* L à 5 ml/kg p.c, présentés dans le tableau 23, nous a permis de constater qu'il n'y a pas d'augmentation significatives de taux d'acide urique chez les rats de 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} lots.

Par contre, nous avons noté une différence significative chez les rats du lot RTL, après 28 jours, par rapport aux rats témoins RTN (+120.23 %).

3.3.3. Dosages d'urée sanguine (BUN)

D'après les résultats, présentés dans le tableau 23, du dosage d'urée sanguin chez les rats Wistar suivis durant 28 jours après l'administration de 5 ml/kg p.c d'huile des graine du *Nigella sativa* L, nous n'avons pas enregistré une augmentation significative du taux d'urée sanguin, avec des valeurs de l'ordre de (+10.57 %) et (+17.55 %) chez les rats des lots RLT CY et RLT HE₁ respectivement.

Mais, elle est significative à (+24.15 %) et (+37.46 %) chez les rats des lots RLT HE₁₅ et RLT par rapport aux rats de lot témoins (RTN),

Tableau 23: L'effet d'huile des graines de *Nigella sativa* L sur le taux des paramètres sériques de Créatinine, Acide urique et Urée sérique (BUN) chez les rats sujets de test (mg/dl).

Parameteres	Groupe I	Groupe II	Groupe III	Groupe IV	Groupe V
<i>Créatinine</i>	00,69 ± 0,04	01,10 ± 0,02 ^{a**}	00,84 ± 0,04 ^{a* b**}	00,94 ± 0,01 ^{a* b*}	01,00 ± 0,02 ^{a**}
<i>Acide urique</i>	01,73 ± 0,05	03,81 ± 0,08 ^{a**}	01,97 ± 0,04 ^{a* b**}	02,13 ± 0,03 ^{a** b**}	02,23 ± 0,03 ^{a** b**}
<i>Urée sérique (BUN)</i>	33,21 ± 0,06	45,65 ± 0,29 ^{a**}	36,72 ± 0,11 ^{a* b**}	39,04 ± 0,12 ^{a** b**}	41,23 ± 0,09 ^{a**}

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD de trois tests. (n = 6 animales/groupe).

a Comparisons sont mis avec Groupe I.

b Comparisons sont mis avec Groupe II.

* Statistiquement significative à p < 0.05.

** Statistiquement significative à p < 0.01.

*** Statistiquement significative à p < 0.001.

3.4. Dosages des paramètres biochimiques rénaux

Le tableau 24 montre des détails sur la conservation des reins en composants cristallins, à savoir l'oxalate, calcium et phosphate chez les rats de différents lots normaux et lithiasiques.

La teneur d'oxalate, calcium et phosphate a augmentée significativement ($P < 0.01$) en homogénat rénale chez les rats de groupe II (05.79, 00.45 et 03.76) respectivement. Le taux élevé d'oxalate a eu comme conséquence suite à l'accumulation d'oxalate dans les reins. En revanche, le traitement préventive et curative, avec l'huile de *Nigella sativa* L, a enregistré une réduction significatif ($P < 0.01$) dans la rétention des reins en oxalates, calcium et phosphate. Ces résultats sont comparables avec les rats de 3^{ème} lots traitées avec cystone (01.69, 00.25 et 02.58) respectivement.

Tableau 24: Effet d'huile de *Nigella Sativa* L sur les paramètres biochimiques rénaux chez les rats normaux et lithiasiques (mg/g)

Composant cristalline	Groupe I	Groupe II	Groupe III	Groupe IV	Groupe V
Oxalate	01,41 ± 0,02	05,79 ± 0,11 ^{a**}	01,69 ± 0,08 ^{b**}	02,17 ± 0,09 ^{a** b**}	02,45 ± 0,06 ^{a** b**}
Phosphate	02,33 ± 0,03	03,76 ± 0,08 ^{a**}	02,58 ± 0,07 ^{b**}	03,00 ± 0,10 ^{a* b*}	03,22 ± 0,05 ^{a** b*}
Calcium	00,20 ± 0,02	00,45 ± 0,03 ^{a**}	00,25 ± 0,05 ^{b**}	00,29 ± 0,04 ^{a* b**}	00,33 ± 0,10 ^{a* b*}

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD de trois tests. (n = 6 animales/groupe).

a Comparisons sont mis avec Groupe I.

b Comparisons sont mis avec Groupe II.

* Statistiquement significative à p < 0.05.

** Statistiquement significative à p < 0.01.

*** Statistiquement significative à $p < 0.001$.

3.5. Etude histologique

L'étude histopathologique des sections renal a également soutenu les résultats ci-dessus.

L'observation a permis d'observer des distensions des tubules rénaux et une congestion du parenchyme rénal par rapport à l'architecture des reins des rats témoins normaux (RTN) (figure 30.a).

Les tubules ont semblé focalement entoussiastes et entourés par une infiltration inflammatoire (figure 30.b). L'épithélium aplati avec la dégénération vacuolaire focale (figure 30.f) et la nécrose cellulaire a encadré les tubules. L'infiltration inflammatoire s'est principalement composée de lymphocytes mûrs infiltrant l'épithélium tubulaire. Les cristaux irréguliers étaient présents à l'intérieur des tubules et dans le long du néphron et au niveau papillaire.

Le groupe IV traitée avec l'huile des graines des nigelles a montrée une histologie normale du rein (figure 30e) et des glomérules normaux avec un léger œdème des cellules tubulaires.

Ce traitement administré aux rats a également montré un rétablissement de parenchyme. Cependant, le rétablissement épithélial tubulaire rénal était moins significatif par rapport aux rats traités par la drogue standard; cystrone (figure 30.c).

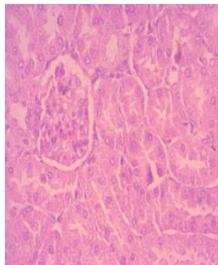


Figure 30. a: parenchyme renal normale chez RTN (H&E x40).

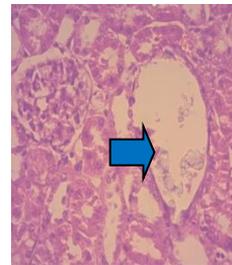


Figure 30. d: Dommages des tubules rénaux et du système collecteur (flèche bleue) chez RLT; (H&E x40).

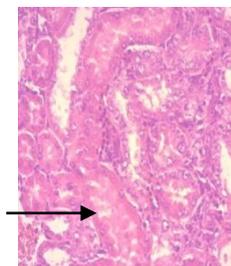


Figure 30. b: Tubules entourés par infiltration inflammatoire principalement de lymphocytes (flèche noir); (H&E x40).

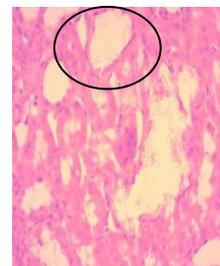


Figure 30. f: Epithelium aplati avec dégénération vacuolaire focale; (H&E x10).

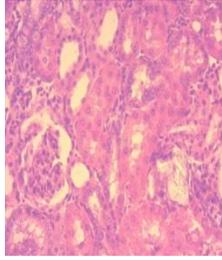


Figure 30. e: Histologie renal normal avec un glomerule normal et un léger oedème des cellules tubulaires chez les rats traités avec l'huile de *Nigella Sativa* L; (H&E x40).

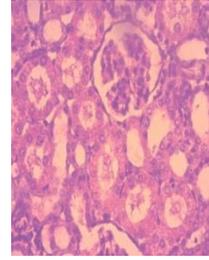


Figure 30. c: Rétablissement de parenchyme renal chez les rats traités avec cystone; (H&E x40).

4. Test du pouvoir antioxydant

En raison de l'implication des radicaux libres dans diverses pathologies, les recherches de nouvelles molécules pouvant pallier le déficit du système de défense endogène se sont largement intensifiées.

L'activité antioxydante exprime la capacité de réduction des radicaux libres. Pour nos extraits, nous avons employé la méthode au DPPH, ce radical libre présente une coloration violet sombre, lorsqu'il est piégé par des substances antioxydantes, la forme réduite confère à la solution d'une coloration jaune pâle, le virage vers cette coloration et l'intensité de la décoloration de la couleur de la forme libre en solution dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance antiradicalaire.

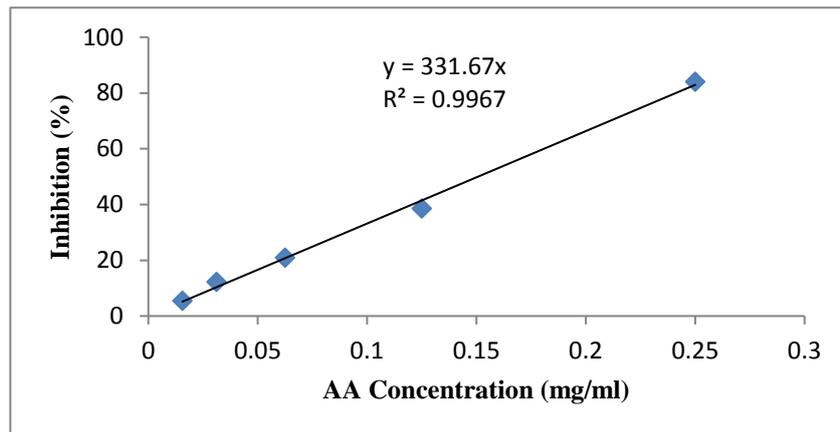


Figure 31: Pouvoir antioxydant d'acide ascorbique

Les figures 31 représentent l'absorbance du DPPH résiduel en fonction de la concentration de la source de l'antioxydant (Acide ascorbique). L'inhibition est en relation linéaire et proportionnelle avec la concentration de l'antioxydant, dont ($R^2 = 0,996$).

L'activité antioxydante de nos extraits est exprimée en EC₅₀ (tableau 25), ce paramètre à été apparemment introduit par Brand-Williams et ses collaborateurs et a été ensuite employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats, il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50 % de l'activité de DPPH (couleur). Ces EC₅₀ sont déterminés graphiquement des trois tests séparés dont l'abscisse représente la concentration de l'extrait brut et l'ordonnée l'activité antioxydante en pourcentage.

Tableau 25: EC₅₀ et puissance antioxydante (ARP) de *Nigella sativa* L, *Camellia sinensis* L, *Erica multiflora* L et l'extrait standard (Acide ascorbique).

L'extrait	EC ₅₀ (µg/ml)	ARP
<i>Nigella sativa</i> L	451,09 ± 13,32	0,0022 ± 0,0002
<i>Camellia sinensis</i> L	214,41 ± 1,08	0,0047 ± 0,0005
<i>Erica multiflora</i> L	12248,57 ± 2.07	8,1642 ± 0,7144
Acide ascorbique	104,07 ± 0.13	0,0096 ± 0,0008

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD de trois tests.

Les extraits de *Camellia sinensis* et *Nigella sativa* L ont présentés une capacité de réduction du radical libre proche de celle de standard (Acide ascorbique), la concentration requise pour la neutralisation et la stabilité de 50 % de la concentration du DPPH est autour du (214.41 et 451.09) µg/ml respectivement (tableau 25).

4.1. Etude comparative d'activité antioxydant

Les histogrammes 32 et 33 comparent les valeurs EC₅₀ en µg/ml des antioxydants naturels et commerciaux.

Selon les figures 32 et 33 et en comparant les résultats obtenus avec le standard, on classe l'activité et la puissance antioxydante suivant l'ordre :

Acide ascorbique > *Camellia sinensis* L > *Nigella sativa* L >>> *Erica multiflora* L

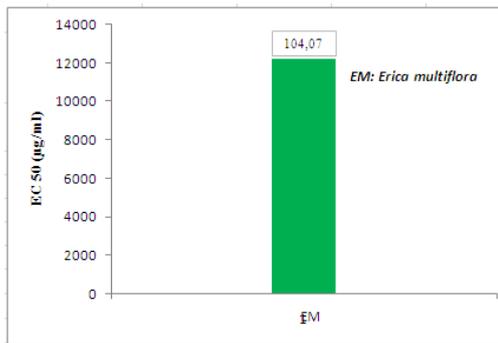


Figure 32: EC₅₀ d'extrait d'*Erica multiflora* L.

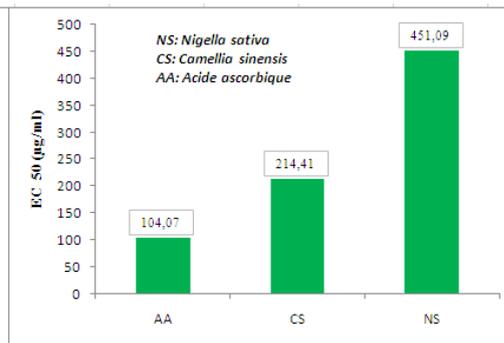


Figure 33: EC₅₀ d'extrait standard (Acide ascorbique), *Camellia sinensis* L et l'huile essentielle de *Nigella sativa* L.

5. Résultats du test du pouvoir antimicrobien

5.1. Origine et identification des souches microbiennes

L'utilisation de milieux d'isolement sélectifs ainsi que l'examen microscopique à l'état frais suivi d'une coloration de Gram, ont permis de classer les souches bactériennes isolées en trois groupes:

- ✚ Souches appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, dont les formes des colonies sont variables de couleur rouge sur milieu Mac Conkey;
- ✚ Souches appartenant à la famille des *Pseudomonadaceae*, leurs colonies sont rondes, lisses à bord régulier, de couleur jaune sur milieu Mac Conkey;
- ✚ Souches appartenant au genre *Staphylococcus* spp. avec des petites colonies rondes, lisses, à bord régulier, de couleur jaune dorée sur milieu Chapman.

Les souches fongiques isolées et purifiées apparaissent en milieu solide en colonies blanches, arrondies ou ovoïdes, lisses crémeuses et dégagent une odeur dite de levure. Elles sont Gram positif, à bourgeonnements multilatéraux, ce qui nous amène à conclure qu'elles appartiennent au genre *Candida* spp.

La détermination des caractéristiques biochimiques des souches bactériennes étudiées est rapportée dans les tableaux 26, 27 et illustrés dans les figures 34 et 35.

Tableau 26: Caractères biochimiques (Api 20E) des bactéries étudiées Gram négatif

Espèces bactériennes	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aerogenosa</i>
Tests biochimiques				
Gram	-	-	-	-
Mobilité	+	+	+	+
Forme	bacille	bacille	bacille	bacille
Type respiratoire	Aérobie facultatif	Aérobie facultatif	Aérobie facultatif	Aérobie stricte
β-galactosidase (ONPG)	+	-	+	-
Arginine dihydrolase (ADH)	-	-	-	+
Lysine décarboxylase (LDC)	+	-	+	-
Ornithine décarboxylase (ODC)	+	+	-	-
Citrate de sodium (CIT)	-	+	+	+
Thiosulfate de sodium (H₂S)	-	+	-	-
Uréase (URE)	-	+	+	-
Tryptophane désaminase (TDA)	-	+	-	-
Indole (IND)	+	-	-	-
Pyruvate de sodium (VP)	-	-	+	-
Gélatine de kohn (GEL)	-	+	-	+
Glucose (GLU)	+	+	+	+
Mannitol (MAN)	+	-	+	-
Inositol (INO)	-	-	+	-
Sorbitol (SOR)	+	-	+	-
Rhamnose (RHA)	+	-	+	-
Saccharose (SAC)	-	-	+	-
Melibiose (MEL)	+	-	+	-
Amydaline (AMY)	-	-	+	-
Arabinose (ARA)	+	-	+	-



Api 20 E : *Klebsiella pneumoniae*



Api 20 E : *Proteus mirabilis*



Api 20 E : *Escherichia coli*



Api 20 E : *Pseudomonas aeruginosa*

Figure 34: (Api 20 E) Caractères biochimiques des bactéries étudiées Gram négatif

Du tableau 26, sur la totalité des souches nous avons appliqué les tests de la galerie classique. Les résultats obtenus pour chaque souches sont comparés aux données de “Bergy’s Manuel of Systematic Bactériology”.

Les souches appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* sont des bacilles à Gram négatif, mobiles, aérobies facultatifs, arginine déshydrolyse négatifs, dégradant le glucose.

Toutefois, certains de leurs caractères biochimiques nous les avons classées comme suites:

- La souche d'*Escherichia coli* qui produit la β -galactosidase, dégrade le mannitol, sorbitol, rhamnane, melibiose et l'arabinose. Elle possède les deux enzymes; la lysine décarboxylase et l'ornithine décarboxylase positive.

- La souche de *Proteus mirabilis* qu'est β -galactosidase négative, produit l'ornithine décarboxylase, l'uréase, tryptophane désaminase, gélatinase et H₂S. Elle ne dégrade que le glucose et mélibiose.
- La souche de *Klebsiella pneumoniae* qu'est β -galactosidase positive, possède les enzymes: la lysine décarboxylase, l'uréase et l'ornithine décarboxylase et une absence de dégagement de H₂S.

La détermination des caractéristiques des souches bactériennes appartenant à la famille des *Pseudomonadaceae* par galerie classique nous a permis de les attribuer à l'espèce *Pseudomonas aerogenosa*. Ce sont des bactéries Gram négatives, mobiles, aérobies strictes, arginine déshydrogénase positives. Elles dégradent le citrate, glucose, mannitol, l'inositol, sorbitol, rhamnose, saccharose, melibiose et l'arabinose.

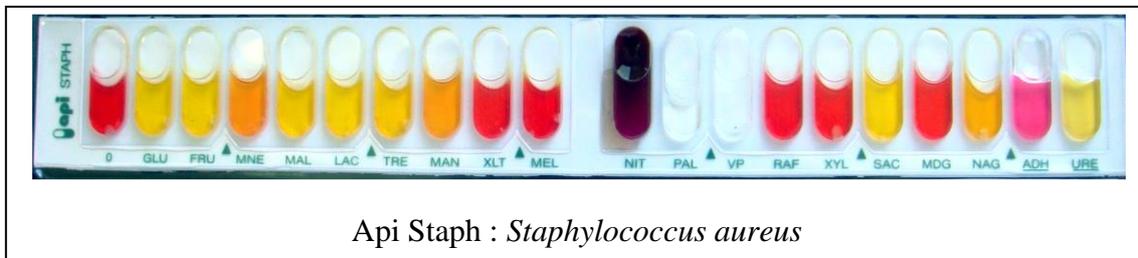


Figure 35: (Api Staph) Caractères biochimiques de la bactérie étudiée Gram positif

Du tableau 27, Les résultats obtenus par l'identification des souches du genre *Staphylococcus* spp. ont permis de conclure qu'ils sont des Staphylocoques dorés.

Ces bactéries sont des cocci immobiles, Gram positif, aérobie facultatif. Elles produisent une arginine déshydrogénase et une uréase. Elles dégradent le glucose, mannitol et le saccharose.

Tableau 27: Caractères biochimiques de bactérie étudiée Gram positif

Espèce bactérienne:	<i>Staphylococcus aureus</i>
Tests biochimiques	
Gram	+
Mobilité	-
Forme	Coccobacille
Type respiratoire	Aérobie facultatif
Témoin négatif (0)	-
Témoin positif (D-glucose (GLU))	+
D-fructose (FRU)	+
D-mannose (MNE)	+
Maltose (MAL)	+
Lactose (LAC)	+
D-trehalose (TRE)	+
D-mannitol (MAN)	+
Xylitol (XLT)	-
D-melibiose (MEL)	-
Réduction des nitrates en nitrites (NIT)	+
Phosphatase alcaline (PAL)	
Pyruvate de sodium (VP)	+
Raffinose (RAF)	-
Xylose (XYL)	-
Saccharose (SAC)	+
Méthyl- α -D-glucopyranoside (MDG)	-
N-acétyl-glucosamine (NAG)	+
Arginine dihydrolase (ADH)	+
Uréase (URE)	+

➤ **La levure (*Candida albicans*)**

Les souches fongiques sont Gram positives, aérobies stricts. Les tests biochimiques effectués nous ont permis de confirmer l'appartenance des souches à l'espèce *Candida albicans*.

Ces souches dégradent le glucose et le galactose, elles sont uréase, raffinose et α -Amydaline positive.

Le tableau 28 et la figure 36 montrent les différentes caractères biochimiques de la levure étudiée.

Tableau 28: Caractères biochimiques de la levure étudiée

Espèce: <i>Candida albicans</i>	
Tests biochimiques	
Gram	+
Type respiratoire	Aérobie stricte
Glucose (GLU)	+
Galactose (GAL)	+
Saccharose (SAC)	-
D-trehalose (TRE)	-
Raffinose (RAF)	+
β Maltose (β MAL)	-
α Amydaline (α AMY)	+
β Xylose ($\beta_{NAG}^{\beta XYL}$)	-
β N-acétyl-glucosamine	
β Mannitol ($\beta_{GAL}^{\beta MAN}$)	-
β Galactose	
Uréase (URE)	+



Figure 36: (Api Candida) Caractères biochimiques de la levure étudiée

5.2. Résultats de l'antibiogramme

L'antibiogramme consiste à rechercher la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques. Nous avons testé l'activité de treize antibiotiques par la méthode standard des disques.

➤ Sur *E. coli*

A la lumière de la figure 37 nous pouvons noter que la plus grande zone d'inhibition a été observé au niveau de Norfloxacine '**Nor**' soit un diamètre de (26.3 mm) et la plus petite zone d'inhibition a été observé au niveau de Doxycycline '**Do**' soit un diamètre de (9 mm) et cela pour la même souche; *E. coli* clinique. Par contre, la souche de référence *E. coli* ATCC 25922 a marqué une zone d'inhibition de (20 mm) avec Cefazoline '**Cz**' et (10 mm) avec Erythromycine '**E**'.

En revanche, les deux souches ont manifesté une certaine résistance variable contre ces antibiotiques. La résistance est totale pour les deux souches qui se croître d'une façon normale en présence des antibiotiques (Triméthoprime + Sulfamide 'Sxt', Tétracycline 'Te', Oxacilline 'Ox1', Néomycine 'N', Kanamycine 'K' et Acide Nalidixique 'Na') pour la souche de référence *E. coli* ATCC 25922.

Les mesures des zones d'inhibition illustrés dans la figure 37 qui nous montrent les valeurs en mm des zones d'inhibitions les plus élevés atteintes.

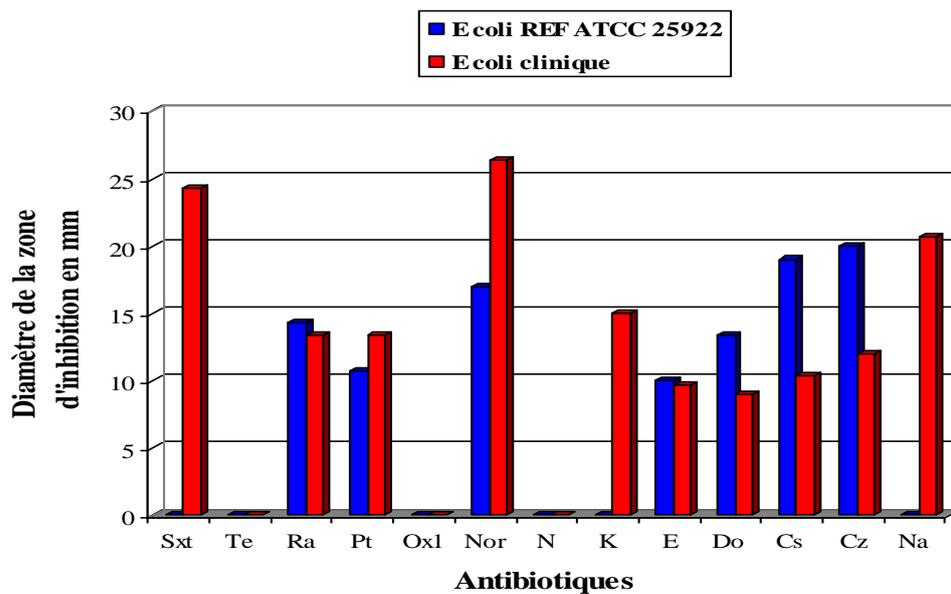


Figure 37: Diamètre de zone d'inhibition en fonction des antibiotiques sur la croissance d'*E. coli*

Les figures 38 et 39 sont des photographies montrent l'effet des antibiotiques sur la croissance d'*E. coli* clinique et référence ATCC 25922.



Figure 38: Photo d'activité des antibiotiques sur la croissance d'*E. coli* ATCC 25922

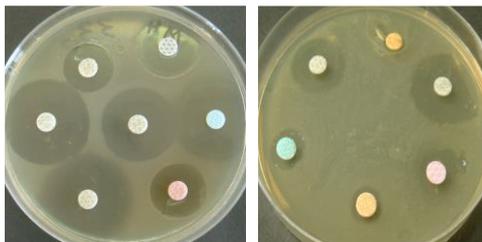


Figure 39: Photo d'activité des antibiotiques sur la croissance d'*E. coli* clinique

➤ **Sur *Proteus mirabilis***

La figure 40 rapporte les résultats de mesure des zones d'inhibitions avec les antibiotiques.

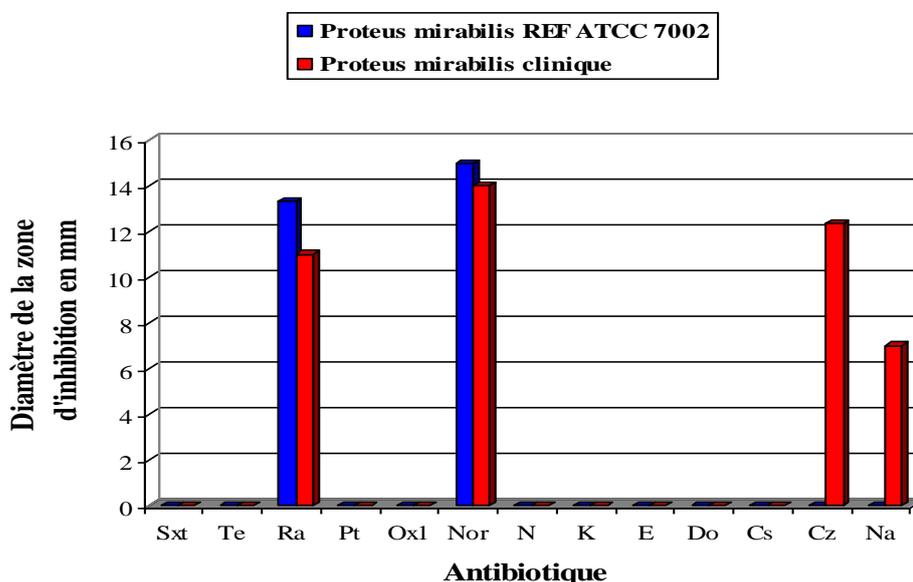


Figure 40: Diamètre de zone d'inhibition en fonction des antibiotiques sur la croissance de *Proteus mirabilis*

D'une manière générale, les antibiotiques utilisés ont provoqué une baisse notable dans le développement de *Proteus mirabilis* traduisait par des zones d'inhibition qui varie de 13.3 mm à 15mm en moyenne avec Rifampicine '**Ra**' et La Norfloxaciné '**Nor**' respectivement pour la souche de référence ATCC 7002. Photo de figure 41.

Par ailleurs, la plus faible zone d'inhibition (7 mm) a été enregistré pour la souche clinique avec Acide Nalidixique '**Na**'. Photo de figure 42

On observe une large résistance contre la majorité des antibiotiques utilisés.

Les figures 41 et 42 sont des photographies qui montrent l'effet des antibiotiques sur la croissance de *Proteus mirabilis* clinique et référence ATCC 7002.



Figure 41: Photo d'activité des antibiotiques sur la croissance de *Proteus mirabilis* ATCC 7002

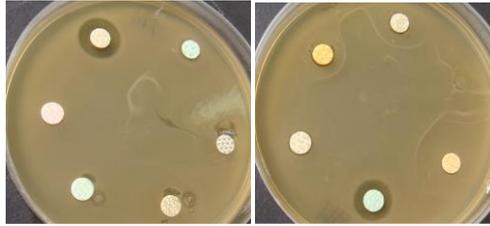


Figure 42: Photo d'activité des antibiotiques sur la croissance de *Proteus mirabilis* clinique

➤ **Sur *Klebsiella pneumoniae***

Nous avons résumés les résultats d'antibiogramme sur les deux souches de *Klebsiella pneumoniae* dans la figure 43.

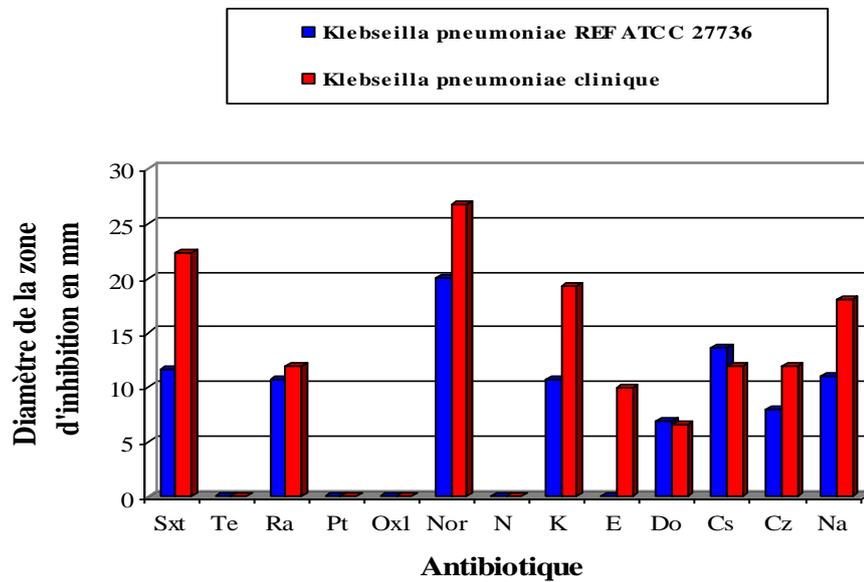


Figure 43: Diamètre de zone d'inhibition en fonction des antibiotiques sur la croissance de *Klebsiella pneumoniae*

Comparativement à la souche clinique, les antibiotiques utilisés ont provoqué une nette élévation en diamètre de zone d'inhibition avec la souche de référence ATCC 27736 de *Klebsiella pneumoniae*; (26.7 mm, 22.3 mm et 19.3 mm) contre (20 mm, 11.7 mm et 10.7 mm) en moyenne avec la Norfloxacine 'Nor' 5µg, (Triméthoprime + Sulfamide) 'Sxt' et Kanamycine 'K' respectivement (figure 43).

Apparemment, les deux souches ont enregistré une certaine résistance vis-à-vis le reste des antibiotiques (la Tétracycline 'Te', la Pristinamycine 'Pt', l'Oxacilline 'Ox1' et la Néomycine 'N') figure 45.

Les figure 44 et 45 sont des photographies qui montrent l'effet des antibiotiques sur la croissance de *Klebsiella pneumoniae* clinique et référence ATCC 27736.

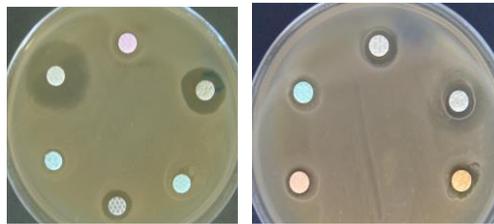


Figure 44: Photo d'activité des antibiotiques sur la croissance de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736

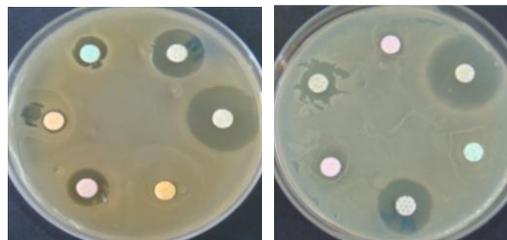


Figure 45: Photo d'activité des antibiotiques sur la croissance de *Klebsiella pneumoniae* clinique

➤ Sur *Pseudomonas aerogenosa*

D'après la figure 46, nous pouvons noter que cette bactérie est la plus résistante bactérie vis-à-vis la plus part des antibiotiques utilisées.

Cependant, elle est faiblement sensible au Rifampicine 'Ra' (9.7 mm, 9.3 mm) pour les deux souches; *Pseudomonas aerogenosa* ATCC 27853 et *Pseudomonas aerogenosa* clinique, respectivement et moyennement sensible aux Norfloxacine 'Nor' (16 mm et 21 mm) et Colistine 'Cs' (12.7 mm et 14.3 mm) pour les deux souches; *Pseudomonas aerogenosa* ATCC 27853 et clinique, respectivement, figures 47 et 48.

L'étude de l'antibiogramme sur les deux souches de *Pseudomonas aerogenosa* est résumée dans la figure 46.

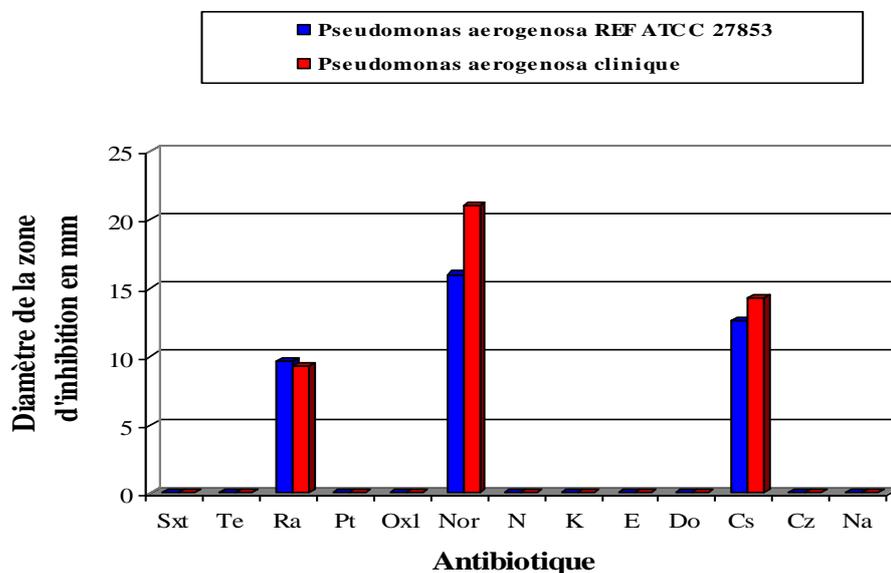


Figure 46: Diamètre de la zone d'inhibition en fonction des antibiotiques sur la croissance de *Pseudomonas aerogenosa*

Les figures 47 et 48 sont des photographies qui montrent l'effet des antibiotiques sur la croissance de *Pseudomonas aerogenosa* clinique et référence ATCC 27853.



Figure 47: Photo d'activité des antibiotiques sur la croissance de *Pseudomonas aerogenosa* ATCC 27853

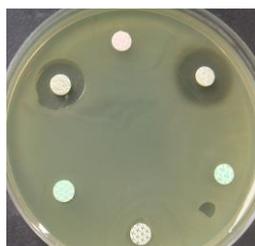


Figure 48: Photo d'activité des antibiotiques sur la croissance de *Pseudomonas aerogenosa* clinique

➤ **Sur *Staphylococcus aureus***

Les résultats de mesure de diamètre des zones d'inhibition issu suite au test de l'antibiogramme exercer par les antibiotiques sur les deux souches de *Staphylococcus aureus* est regroupées dans la figure 49.

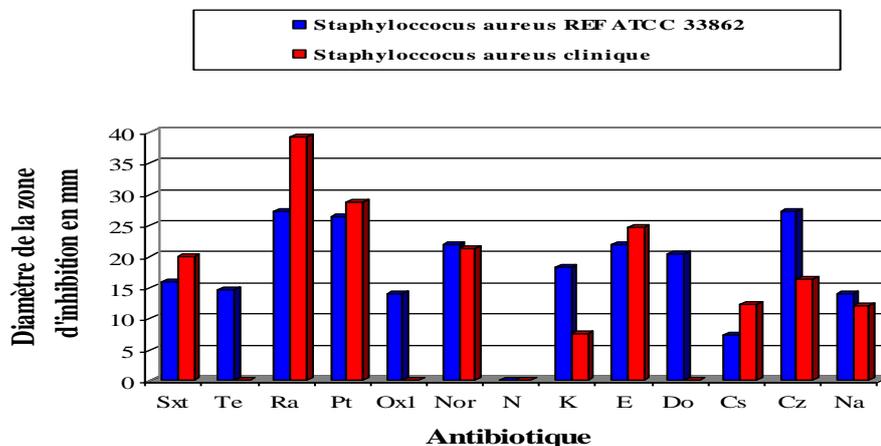


Figure 49: Diamètre de zone d'inhibition en fonction des antibiotiques sur la croissance de *Staphylococcus aureus*

Du la figure 49, la majorité des antibiotiques ont été actifs sur les deux souches; *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 et *Staphylococcus aureus* clinique avec des zone d'inhibition allant de (7.7 mm à 28.7 mm) pour *Staphylococcus aureus* clinique et de (18.3 mm à 39.3 mm) pour *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 avec Kanamycine 'K', Pristinamycine 'Pt' et Rifampicine 'Ra' respectivement.

En revanche, les deux souches ont manifesté une résistance contre Néomycine 'N', figure 50. La figure 50 est une photographie qui montre l'effet des antibiotiques sur la croissance de *Staphylococcus aureus* clinique.

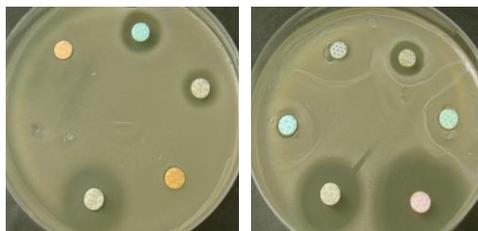


Figure 50: Photo d'activité des antibiotiques sur la croissance de *Staphylococcus aureus* clinique

5.3. Résultats de l'antifongigramme

Les résultats de l'antifongigramme selon le diamètre de lauréole d'inhibition sont résumés dans la figure 51.

La figure 51 nous renseigne sur l'activité de nystatine vis-à-vis la levure *C. albicans* qui s'est montré moyennement sensible à la dose de 30 ppm. Une zone d'inhibition de 11.7 mm et 9.7 mm respectivement; *Condida albicans* ATCC 10231 et *Condida albicans* clinique.

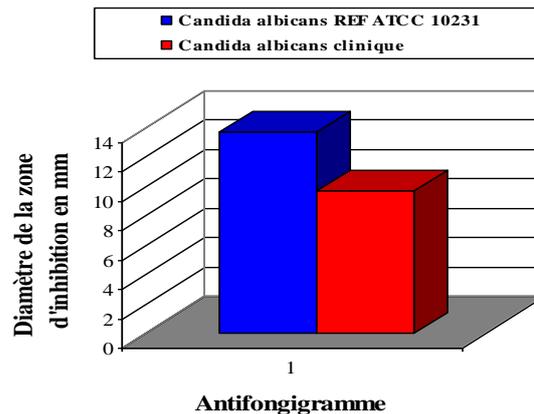


Figure 51: Diamètre de zone d'inhibition en fonction de l'antifongique sur la croissance de *Candida albicans*

5.4. Résultat de l'activité antimicrobienne d'huile essentielle

Nous avons évalué l'activité antimicrobienne d'huile essentielle de *Nigella sativa L* par la méthode de Test par diffusion sur disque. Ensuite pour chaque disque nous avons mesuré les diamètres des zones d'inhibition. Les figures suivantes nous montrent les résultats des diamètres d'inhibitions pour chaque bactérie.

On note ici que la méthode utilisée est celle de **M.C.Mathabe**, que le disque déposé à la surface du milieu gélosé est chargé de 20 µl d'extrait naturel.

On note ici que la méthode utilisée est celle de Vincent, que le disque déposé à la surface du milieu gélosé est chargé de 20 µl d'huile aromatique. Les zones d'inhibitions des différentes souches avec les différents extraits sont résumées dans le tableau 29.

Tableau 29: Résultat d'activité antimicrobienne en mm d'huile essentielle de *Nigella sativa* L

Microorganisme		Zone d'inhibition en mm	
Bactérie Gram négatif	<i>E. coli</i>	ATCC 25922	15 ± 0,47
		Clin	13 ± 0, 81
	<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 7002	13 ± 0,81
		Clin	12 ± 0, 00
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 27736	18 ± 0,47
		Clin	15 ± 0,00
<i>Pseudomonas aerogenosa</i>	ATCC 27853	11 ± 0,81	
	Clin	08 ± 0,00	
Bactérie Gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 33862	24 ± 1,63
		Clin	21 ± 0,81
Levure	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	10 ± 0,47
		Clin	09 ± 0,47

Clin: clinique

Notre l'huile essentielle a montré une activité modéré avec des zone d'inhibitions allant de (8 à 24) mm; elle est moyennement importante sur les souches de références que les souches cliniques. Notant que la plus importante activité a été enregistrée sur la souche de *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 avec une aérole de 24 mm et la plus faible a été signalé chez *Pseudomonas aerogenosa* Clin (8 mm).

5.5. Résultat de l'activité antimicrobienne des extraits de *Camellia sinensis* L

Nous avons évalué l'activité antibactérienne des extraits aqueux et organiques de *Camellia sinensis* L par la méthode de Test par diffusion sur disque. Ensuite pour chaque disque nous avons mesuré les diamètres des zones d'inhibition. Les figures suivantes nous montrent les résultats des diamètres d'inhibitions pour chaque bactérie.

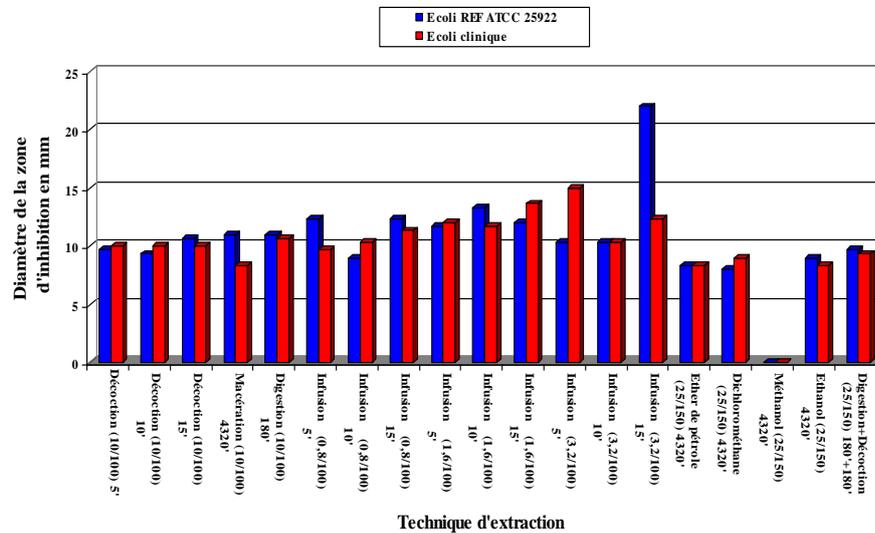
On note ici que la méthode utilisée est celle de **M.C.Mathabe**, que le disque déposé à la surface du milieu gélosé est chargé de 20 µl d'extrait naturel et que pour ces derniers, l'extrait brut sec se trouve en solution dans le DMSO.

➤ Sur la croissance de *E. coli*

La majorité des extraits ont été positifs sur les deux souches; cliniques et référence.

La plus grande zone d'inhibition a été signalé avec l'extrait d'infusion au bout de 15 minutes, avec 3,2 g (22 mm) pour la souche *E. coli* ATCC 25922 contre (8 mm) avec l'extrait de dichlorométhane figure 52. Du même temps, on a enregistré des diamètres des auréoles allant du (8.3 mm) à (15 mm) avec l'extrait d'infusion au bout de 5 minutes avec 3,2 g et l'extrait d'éthanol respectivement pour *E. coli* clinique.

Cependant, l'extrait de Méthanol a donné des réactions négatives avec les deux souches. Les résultats concernant l'étude de pouvoir antimicrobien de *Camellia sinensis* L sur les deux souches de *E. coli* sont présentés dans la figure 52.



Figutr 52: Diamètre de zone d'inhibition en fonction des extraits de *Camellia sinensis* L sur la croissance d'*E. coli*

➤ Sur la croissance de *Proteus mirabilis*

Selon la figure 53 les extraits ont présenté une certaine activité modérée dont les diamètres des zones d'inhibition ont atteint les (28 mm). Une bonne activité, la plus élevée pour *Proteus mirabilis* ATCC 7002 a été remarquée avec l'extrait de Méthanol (28.3 mm) et la valeur faible de l'auréole d'inhibition a été de (8 mm) qui a été enregistré sur *Proteus mirabilis* clinique avec l'extrait d'éthanol. Par ailleurs la plus grande valeur de zone d'inhibition pour *Proteus mirabilis* clinique a été signalé au bout de 15 minutes avec 3,2 g (18.3 mm).

Nous avons résumés les résultats de l'activité antibactérienne de *Camellia sinensis* L sur les deux souches de *Proteus mirabilis* dans la figure 53.

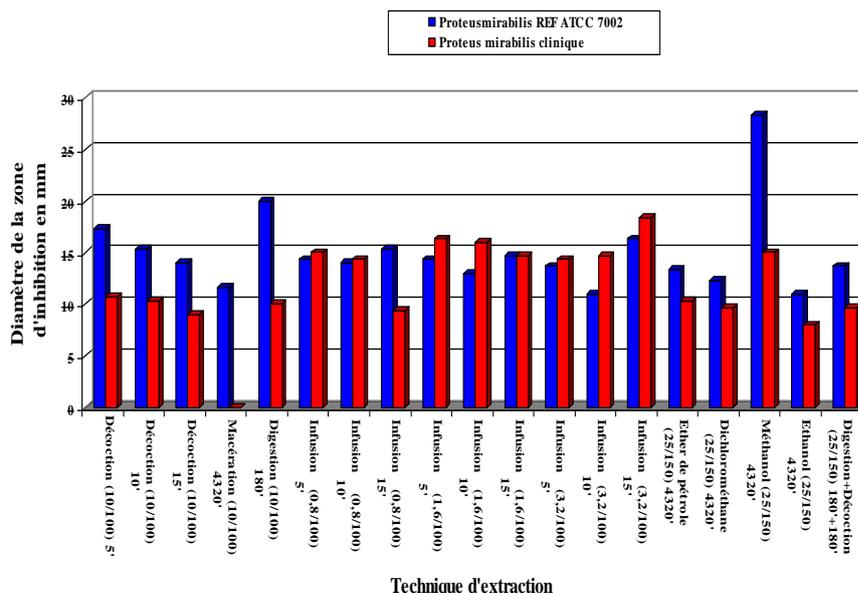


Figure 53: Diamètre de zone d'inhibition en fonction des extraits de *Camellia sinensis* L sur la croissance de *Proteus mirabilis*

➤ **Sur la croissance de *Klebsiella pneumoniae***

Nous remarquons suivant la figure 54, que quelque soit le type d'extrait naturel et quelque soit la concentration d'extrait, *Camellia sinensis* L possède une faible activité sur les deux souches avec un intervalle de zone d'inhibition allant de 8.3 mm au 15.7 mm.

L'étude de l'activité antimicrobienne de *Camellia sinensis* L sur les deux souches de *Klebsiella pneumoniae* est résumée dans la figure 54.

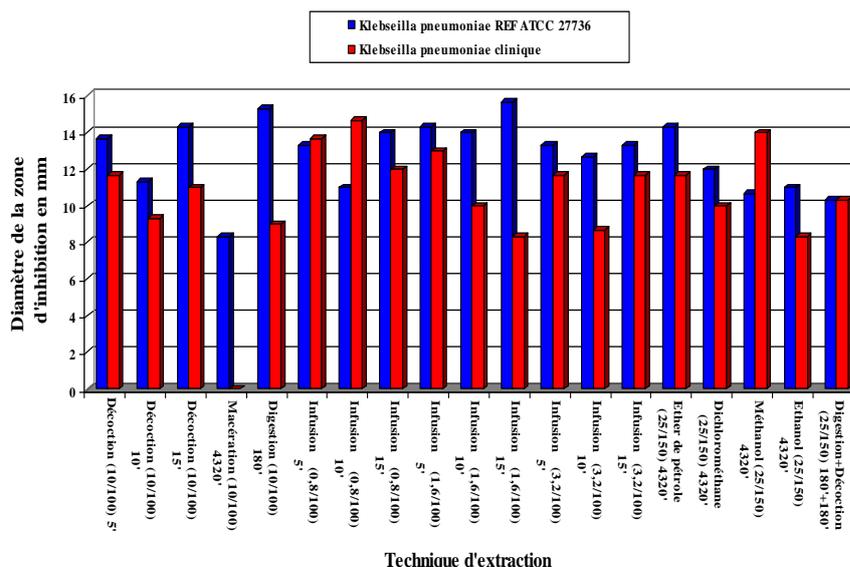


Figure 54: Diamètre de zone d'inhibition en fonction des extraits de *Camellia sinensis* L sur la croissance de *Klebsiella pneumoniae*

➤ **Sur la croissance de *Pseudomonas aerogenosa***

Les extraits de Méthanol, décoction, éther de pétrole et éthanol de *Camellia sinensis* L ont engendré de fortes zones d'inhibition avec la souche de référence ATCC 27853 par rapport au souche clinique; (27 mm, 20.7 mm, 19.3 mm et 19 mm) contre (13.3 mm, 14.7 mm, 12.7 mm et 8 mm) en moyenne respectivement.

Les résultats de l'étude d'activité antibactérienne des extraits de *Camellia sinensis* L sur les deux souches de *Pseudomonas aerogenosa* sont résumés dans la figure 55.

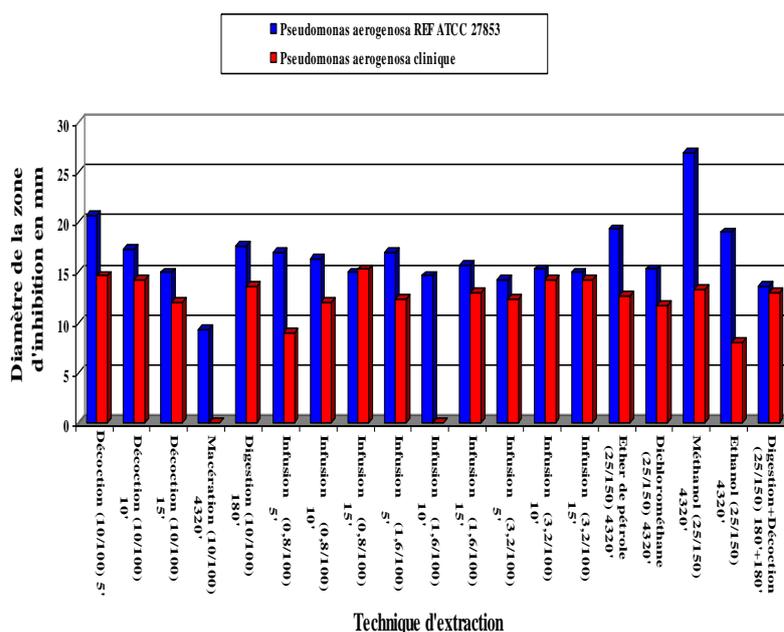


Figure 55: Diamètre de zone d'inhibition en fonction des extraits de *Camellia sinensis* L sur la croissance de *Pseudomonas aerogenosa*

➤ **Sur la croissance de *Staphylococcus aureus***

Apparemment, les extraits aqueux d'espèce végétale *Camellia sinensis* L n'ont présenté aucun effet inhibiteur sur la croissance d'espèce bactérienne *Staphylococcus aureus* de référence.

Au contraire, ils s'avèrent exercer une action inhibitrice sur l'espèce bactérienne *Staphylococcus aureus* clinique avec des zones d'inhibition allant de (12.3 au 23.7) mm, 31 mm) pour l'extrait de macération, l'extrait de digestion et l'extrait d'infusion au bout de 10 minutes avec 1.6 g, respectivement.

En revanche, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 a été sensible aux extraits organiques de l'espèce végétale *Camellia sinensis* L et a donné des valeurs marquantes allant du (24.7 mm) au (32.7 mm) avec l'extrait d'éthanol et méthanol respectivement.

L'effet de *Camellia sinensis* L sur la croissance des deux souches de *Staphylococcus aureus* a donné les résultats suivants consignés dans la figure 56.

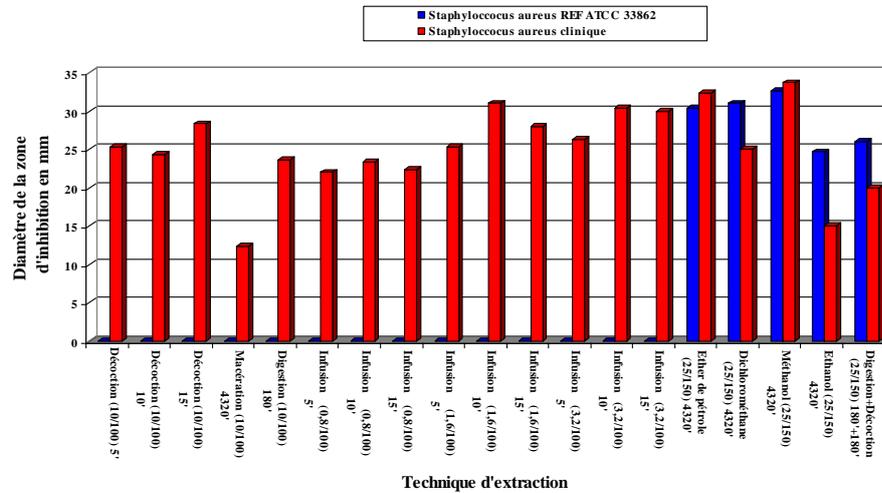


Figure 56: Diamètre de zone d'inhibition en fonction des extraits de *Camellia sinensis* L sur la croissance de *Staphylococcus aureus*

➤ **Sur la croissance de *Candida albicans***

La figure 57 montre que Les zones d'inhibition de pouvoir antimicrobien des extraits de *Camellia sinensis* L a donné des résultats généralement significatifs et a sensibiliser les deux souches de *Condida albicans*.

La plus élevé fut observé au niveau du l'extrait de Méthanol (30.3 mm) pour *Condida albicans* ATCC 10231 et le plus faible au niveau d'extrait éthananolique (9.7 mm) pour *Condida albicans* clinique.

Les résultats obtenus à partir des tests effectuer sur les deux souches de *Candida albicans* pour déterminer son activité antimicrobienne sont résumés dans la figure 57.

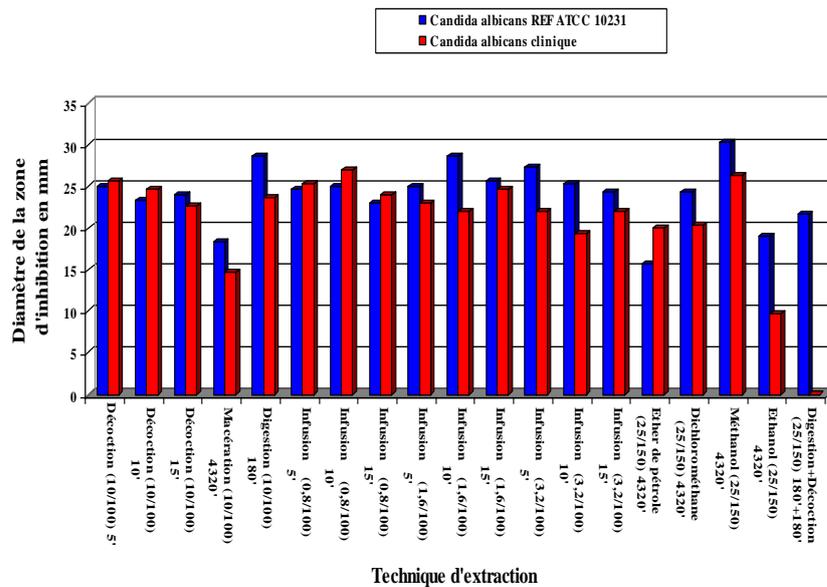


Figure 57: Diamètre de zone d'inhibition en fonction des extraits de *Camellia sinensis* L sur la croissance de *Candida albicans*

5.6. Résultat de l'activité antimicrobienne des extraits d'*Erica multiflora* L

Les résultats obtenus de l'activité antibactérienne des extraits aqueux et organiques d'*Erica multiflora* L par la méthode **M.C.Mathabe** nous montrent une large variation des diamètres des zones d'inhibition atteignant les 25.3 mm selon la souche et en fonction de nature d'extrait.

➤ Sur la croissance d'*E. coli*

En effet, la comparaison de deux souches *E. coli* ATCC 25922 et clinique, nous révèle que les extraits aqueux d'*Erica multiflora* L sont moyennement actifs, elles présentent une sensibilisation plus ou moins modérée sur les deux souches d'*E. coli* avec des diamètres des zones d'inhibition allant de 14.7 mm au 8.3 mm pour *E. coli* ATCC 25922 contre 8.3 mm au 9 mm pour *E. coli* clinique avec les extraits d'infusion au bout de 15 minutes à 6 g et l'extrait d'infusion au bout de 10 minutes à 3 g respectivement à l'exception des extraits organiques qu'ont signalées aucune sensibilité sur les deux souches.

Le diamètre de la zone d'inhibition de pouvoir antibactérien sous l'effet des extraits d'*Erica multiflora* L sur les deux souches d'*E. coli* est présenté dans la figure 58.

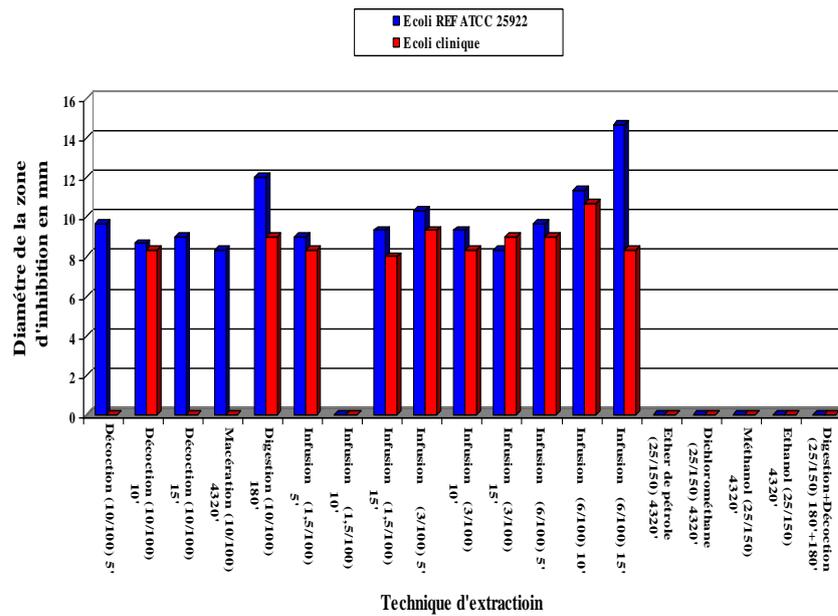


Figure 58: Diamètre de zone d'inhibition en fonction des extraits d'*Erica multiflora* L sur la croissance d'*E. coli*

➤ **Sur la croissance de *Proteus mirabilis***

Les extraits aqueux d'*Erica multiflora* L préparés à différentes concentrations (1,5 - 3 - 6 et 10 g/100 ml) de matière végétale, en engendré en moyenne des zones d'inhibition sur la croissance des germes par comparaison aux extraits organiques d'espèce végétale qui n'a rapporté aucun effet sur la croissance des germes, dont une moyenne du (16.7 mm, 8.3 mm) pour la souche de *Proteus mirabilis* clinique et du (13.7 mm et 8.3 mm) pour la souche *Proteus mirabilis* ATCC 7002.

La figure 59 regroupe les différents résultats obtenus sur l'étude de l'activité antibactérienne des extraits d'*Erica multiflora* L sur les deux souches de *Proteus mirabilis*.

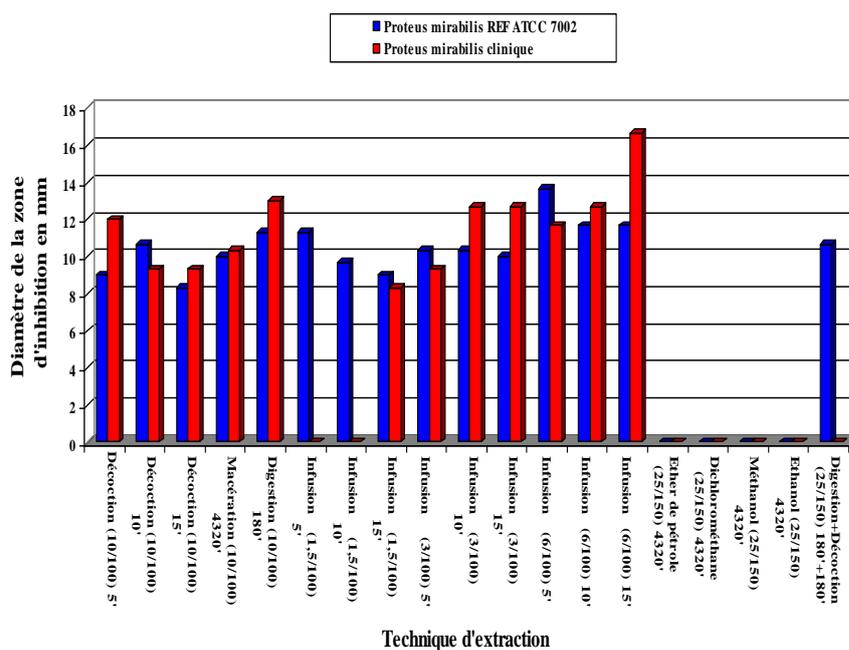


Figure 59: Diamètre de zone d'inhibition en fonction des extraits d'*Erica multiflora* L sur la croissance de *Proteus mirabilis*

➤ **Sur la croissance de *Klebsiella pneumoniae***

Apparemment, les extraits organiques de l'espèce végétale *Erica multiflora* L n'ont présenté aucun effet inhibiteur sur la croissance de l'espèce bactérienne *Klebsiella pneumoniae*.

Aussi, il a été remarqué que les extraits aqueux préparés à différentes concentrations de matière végétale exercent des effets inhibiteurs comparables sur la croissance de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736 et cliniques; les nombres moyens des zones d'inhibition sont estimés à (13 mm, 12 mm et 8.7 mm) pour la souche clinique et (11.7 mm et 8.3 mm) pour la souche de référence et cela avec l'extrait d'infusion au bout de 15 minutes avec 1,5 g, l'extrait de digestion au bout de 180 minutes avec 10 g et l'extrait de décoction au bout de 5 minutes avec 10 g respectivement.

Nous avons rapportés les résultats tirés de tests de pouvoir antibactérien effectués sur les deux souches de *Klebsiella pneumoniae* avec les différents extraits d'*Erica multiflora* L et se sont présentés dans la figure 60.

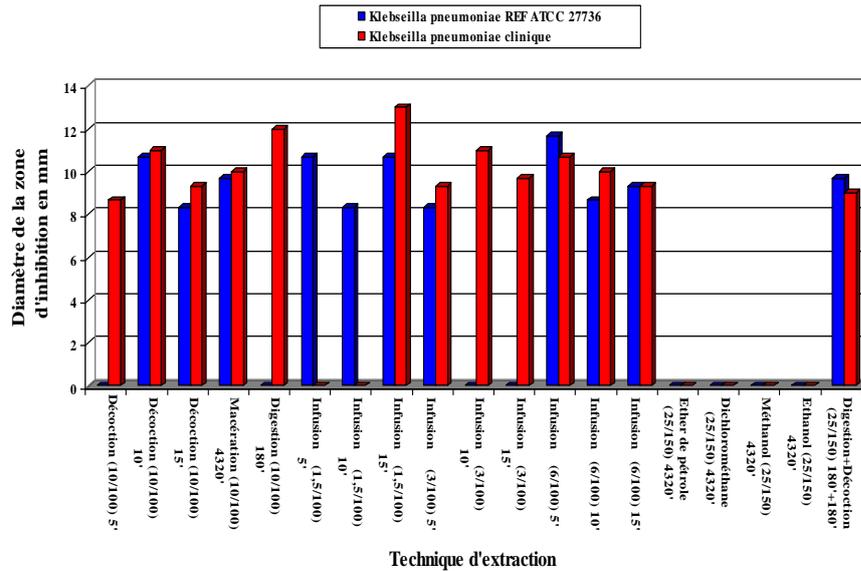


Figure 60: Diamètre de zone d'inhibition en fonction des extraits d'*Erica multiflora* L sur la croissance de *Klebsiella pneumoniae*

➤ **Sur la croissance de *Pseudomonas aerogenosa***

L'ensemble des extraits aqueux préparés à 1.5, 3, 6 et 10 g/100 ml de matières végétales ont provoqué une réduction moyenne sur la croissance de *Pseudomonas aerogenosa* traduisait par des valeurs allant de 8 mm à 14.33 mm pour la souche *Pseudomonas aerogenosa* ATCC 27853 avec l'extrait d'infusion au bout de 5 minutes avec 1,5 g et l'extrait d'infusion au bout de 15 minutes avec 3 g, respectivement et des chiffres allant de 9 mm à 12 mm pour la souche de *Pseudomonas aerogenosa* clinique avec l'extrait d'infusion au bout de 10 minutes avec 1.5 g et l'extrait de décoction au bout de 5 minutes avec 10 g, respectivement.

Toutefois, aucune zone d'inhibition n'est observée avec les extraits organiques figure 61.

Les résultats de la mesure de diamètre des zones d'inhibition issu suite au test de pouvoir antimicrobien exercer par les extraits d'*Erica multiflora* L sur les deux souches de *Pseudomonas aerogenosa* sont regroupées dans la figure 61.

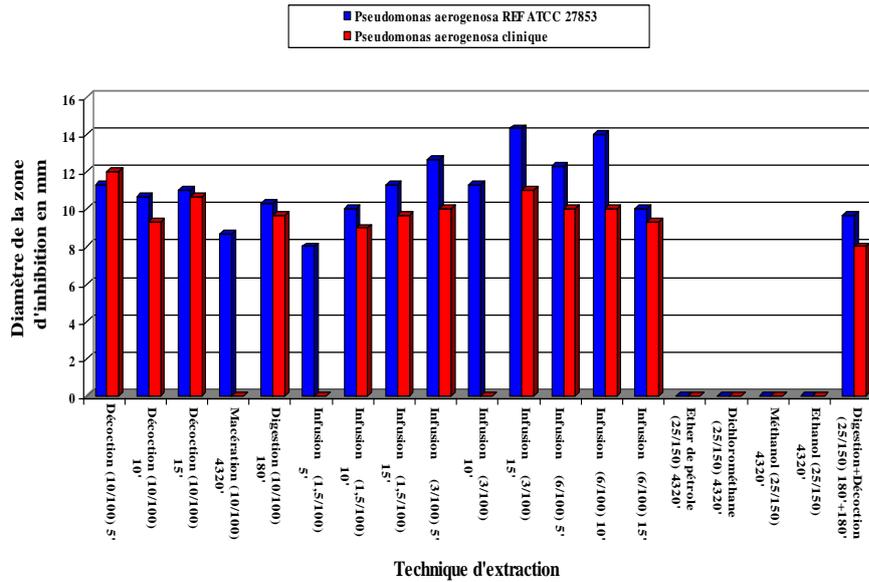


Figure 61: Diamètre de zone d'inhibition en fonction des extraits d'*Erica multiflora* L sur la croissance de *Pseudomonas aerogenosa*

➤ **Sur la croissance de *Staphylococcus aureus***

Les extraits d'*Erica multiflora* L ont provoqués une inhibition marquante allant de (11.3 mm, 19 mm et 25 mm) pour *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 contre des zones d'inhibition allant de (0 mm, 13 mm et 15 mm) pour *Staphylococcus aureus* clinique avec l'extrait de dichlorométhane au bout de 72 heures avec 25 g et l'extrait d'infusion au bout de 15 minutes avec 1,5 g et l'extrait d'infusion au bout de 15 minutes avec 6 g, respectivement.

On signale ici qu'il y a une résistance des deux souches avec les extraits d'éthanol et éther de pétrole.

Les résultats concernant l'étude de pouvoir antimicrobien d'*Erica multiflora* L sur les deux souches de *Staphylococcus aureus* sont présentées dans la figure 62.

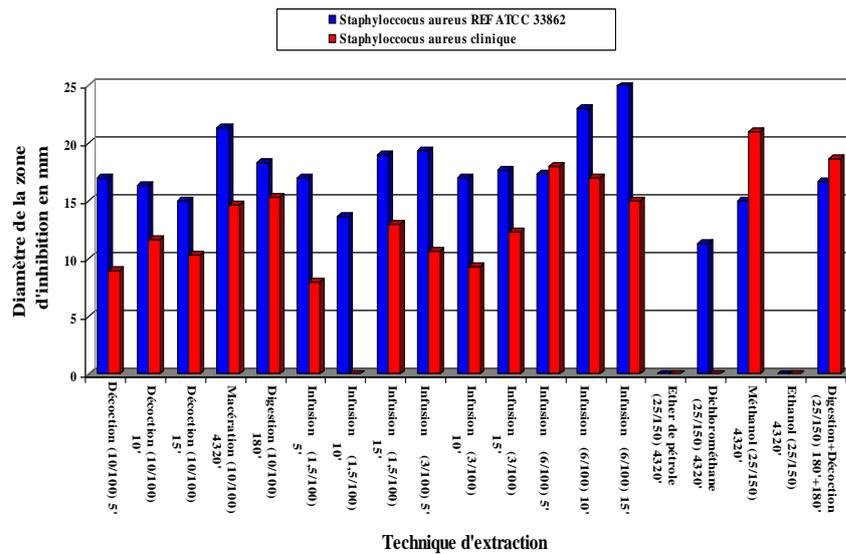


Figure 62: Diamètre de zone d'inhibition en fonction des extraits d'*Erica multiflora* L sur la croissance de *Staphylococcus aureus*

➤ **Sur la croissance de *Candida albicans***

D'après la figure 63, le pouvoir antibactérien des extraits d'*Erica multiflora* L a marqué une large inhibition traduisait par des zones d'inhibition allant de 11.7 mm à 25.3 mm pour la souche de référence *Condidia albicans* ATCC 10231 avec l'extrait de méthanol et de digestion et contre des zones allant de 8 mm à 22 mm pour la souche clinique avec l'extrait de décoction au bout de 15 minutes, à 10 g et l'extrait d'infusion au bout de 5 minutes, au 6 g de matériel végétale, respectivement.

En revanche, les deux souches ont manifesté une certaine résistance variable contre les extraits d'éther de pétrole et dichlorométhane.

La figure 63 résume les déférentes résultats obtenus suite au test de pouvoir antimicrobien des extraits d'*Erica multiflora* L sur les deus souches de *Candida albicans*.

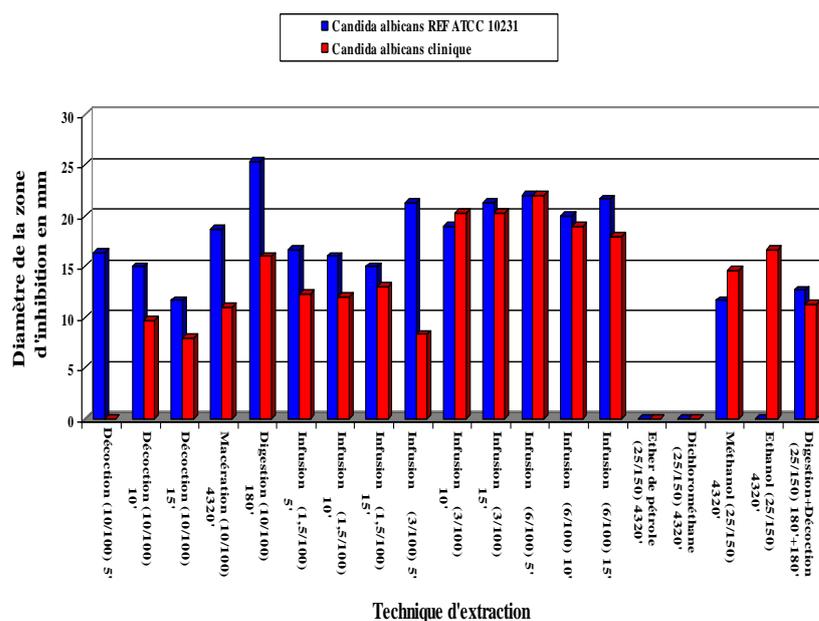


Figure 63: Diamètre de zone d'inhibition en fonction des extraits d'*Erica multiflora* L sur la croissance de *Candida albicans*

5.7. Résultat de la détermination de Concentration Minimal Inhibitrice CMI

5.7.1. *Nigella sativa* L

Nous avons rapportées les différentes résultats obtenus suite au test de détermination de la concentration minimale inhibitrice dans le tableau 30.

Tableau 30: Résultats de la Concentration Minimal Inhibitrice CMI en (mg/ml) d'huile essentielle de *Nigella sativa* L relatives aux différentes souches microbiennes étudiées

Microorganisme		CMI en (mg/ml)	
Bactérie Gram négatif	<i>E. coli</i>	ATCC 25922	0,312
		Clin	0,625
	<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 7002	0,625
		Clin	0,625
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 27736	0,312
		Clin	0,312
	<i>Pseudomonas aerogenosa</i>	ATCC 27853	0,625
		Clin	1,250
Bactérie Gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 33862	0,078
		Clin	0,156
Levure	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	1,250
		Clin	1,250

Clin: clinique

Du tableau 24, nous remarquons que les valeurs de CMI varient entre (1.25 – 0.078) mg/ml. La souche *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 a été la plus sensible 0.078 mg/ml.

5.7.2. *Camellia sinensis* L

➤ Sur la croissance de *E. coli*

Nous avons rapportées les différentes résultats obtenus suite au test de détermination de la concentration minimale inhibitrice dans le tableau 31.

Tableau 31: La Concentration Minimal Inhibitrice CMI en (mg/ml) des extraits de *Camellia sinensis* L relatives aux souches d'*E. coli*; cliniques et référence ATCC 25922

<i>Camellia sinensis</i> L			Souches	
Extrait	Concentration (mg/ml)	Temps (minutes)	REF <i>E. coli</i> ATCC 25922	CLI <i>E. coli</i>
Décoction par l'eau distillée	10 /100	5	1,250	0,625
		10	1,250	0,625
		15	0,625	0,625
Macération par l'eau distillée	10 /100	4320	0,625	1,250
Digestion à 50 °C par l'eau distillée	10 /100	180	0,625	0,625
Infusion par l'eau distillée	0.8 /100	5	0,312	1,250
		10	1.250	0,625
		15	0,312	0,625
	1.6 /100	5	0,625	0,312
		10	0,312	0,625
		15	0,312	0,312
	3.2 /100	5	0,625	0,156
		10	0,625	0,625
		15	0,039	0,312
Ether de pétrole	25 /150	4320	1,250	1,250
Dichlorométhane	25 /150	4320	1,250	1,250
Méthanol	25 /150	4320	-	-
Ethanol	25 /150	4320	1,250	1,250
(Digestion + décoction) par l'eau distillée	25 /150	(180 + 180)	1,250	1,250

(-): Résistante; non exécuté

Du tableau 31, nous avons remarqué que les valeurs de CMI varient entre (1.25 – 0.039) mg/ml. La souche *E. coli* ATCC 25922 a été la plus sensible, elle a été sensible avec l'extrait d'infusion 0.039 mg/ml au bout de 15 minute à 3,2 g contre la valeur de CMI 0.156 mg/ml qui a été signalé avec l'extrait d'infusion au bout de 5 minute à 3,2 g avec *E. coli* clinique.

Par ailleurs, les extraits organiques de l'espèce végétal *Camellia sinensis* L ont sensibilisé les deux souches à une CMI de 1.25 mg/ml.

➤ **Sur la croissance de *Proteus mirabilis***

Nous avons résumés les résultats de détermination de concentration minimale inhibitrice de *Camellia sinensis* L sur les deux souches de *Proteus mirabilis* dans le tableau 32.

Tableau 32: La Concentration Minimal Inhibitrice CMI en (mg/ml) des extraits de *Camellia sinensis* L relatives aux souches de *Proteus mirabilis*; cliniques et référence ATCC 7002

<i>Camellia sinensis</i> L			Souches	
Extrait	Concentration (mg/ml)	Temps (minutes)	REF <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 7002	CLI <i>Proteus mirabilis</i>
Décoction par l'eau distillée	10 /100	5	0,078	0,625
		10	0,156	0,625
		15	0,156	1,250
Macération par l'eau distillée	10 /100	4320	0,625	-
Digestion à 50 °C par l'eau distillée	10 /100	180	0,039	0,625
Infusion par l'eau distillée	0.8 /100	5	0,156	0,156
		10	0,156	0,156
		15	0,156	1,250
	1.6 /100	5	0,156	0,078
		10	0,312	0,078
		15	0,156	0,156
	3.2 /100	5	0,312	0,156
		10	0,625	0,156
		15	0,078	0,039
Ether de pétrole	25 /150	4320	0,312	0,625
Dichlorométhane	25 /150	4320	0,312	1,250
Méthanol	25 /150	4320	0,039	0,156
Ethanol	25 /150	4320	0,625	1,250
(Digestion + décoction) par l'eau distillée	25 /150	(180 + 180)	0,312	1,250

(-): Résistante; non exécuté

Le tableau 32, montre que les valeurs de CMI des extraits sont actives sur les deux souches de *Proteus mirabilis*; ATCC 7002 et clinique. Les valeurs de CMI obtenus de cette étude expérimentale avec les déférentes extraites de *Camellia sinensis* L donne des valeurs qui varie entre (1.25 et 0.039) mg/ml. La grande valeur de concentration minimale inhibitrice été observée sur *Proteus mirabilis* clinique avec les extraits d'infusion au bout de 15 minutes à

0,8 g de matériel végétale à 100 ml d'eau ainsi qu'avec les extraits de dichlorométhane, éthanol et de digestion + décoction.

En revanche, *Proteus mirabilis* ATCC 7002 a été la moins sensible aux extraits de *Camellia sinensis* L avec des valeurs enregistrées au dessus de 0.625 mg/ml.

➤ **Sur la croissance de *Klebsiella pneumoniae***

Les résultats concernant l'étude de détermination de la concentration minimale inhibitrice de *Camellia sinensis* L sur les deux souches de *E. coli* sont présentés dans le tableau 33.

Tableau 33: La Concentration Minimal Inhibitrice CMI en (mg/ml) des extraits de *Camellia sinensis* L relatives aux souches de *Klebsiella pneumoniae*; cliniques et référence ATCC 27736

<i>Camellia sinensis</i> L			Souches	
Extrait	Concentration (mg/ml)	Temps (minutes)	REF <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 27736	CLI <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Décoction par l'eau distillée	10 /100	5	0.312	0.625
		10	0.625	1.250
		15	0.156	0.625
Macération par l'eau distillée	10 /100	4320	1.250	-
Digestion à 50 °C par l'eau distillée	10 /100	180	0.156	1.250
Infusion par l'eau distillée	0.8 /100	5	0.312	0.312
		10	0.625	0.156
		15	0.156	0.312
	1.6 /100	5	0.156	0.312
		10	0.156	0.625
		15	0.156	1.250
	3.2 /100	5	0.312	0.625
		10	0.312	1.250
		15	0.312	0.625
Ether de pétrole	25 /150	4320	0.156	0.625
Dichlorométhane	25 /150	4320	0.312	0.625
Méthanol	25 /150	4320	0.625	0.156
Ethanol	25 /150	4320	0.625	1.250
(Digestion + décoction) par l'eau distillée	25 /150	(180 + 180)	0.625	0.625

(-): Résistante; non exécuté

Les extraits de *Camellia sinensis* L ont été active sur la souche de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736 plus que clinique car ce dernier a donné des valeurs supérieur (0.156, 0.312) mg/ml à celle donné sur la souche *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736 (1.25, 0.625) mg/ml avec les extraits de digestion au bout de 3 heures à 10 g et extrait de dichlorométhane au bout de 3 jours à 25 g de *Camellia sinensis* L respectivement.

➤ **Sur la croissance de *Pseudomonas aerogenosa***

Les résultats de l'étude de la détermination de CMI des extraits de *Camellia sinensis* L sur les deux souches de *Pseudomonas aerogenosa* sont résumés dans le tableau 34.

Tableau 34: La Concentration Minimal Inhibitrice CMI en (mg/ml) des extraits de *Camellia sinensis* L relatives aux souches de *Pseudomonas aerogenosa*; cliniques et référence ATCC 27853

<i>Camellia sinensis</i> L			Souches	
Extrait	Concentration (mg/ml)	Temps (minutes)	REF <i>Pseudomonas aerogenosa</i> ATCC 27853	CLI <i>Pseudomonas aerogenosa</i>
Décoction par l'eau distillée	10 /100	5	0.039	0.156
		10	0.078	0.156
		15	0.156	0.312
Macération par l'eau distillée	10 /100	4320	1.250	-
Digestion à 50 °C par l'eau distillée	10 /100	180	0.078	0.312
Infusion par l'eau distillée	0.8 /100	5	0.078	1.250
		10	0.078	0.312
		15	0.156	0.156
	1.6 /100	5	0.078	0.312
		10	0.156	-
		15	0.156	0.312
	3.2 /100	5	0.156	0.312
		10	0.156	0.156
		15	0.156	0.156
Ether de pétrole	25 /150	4320	0.039	0.312
Dichlorométhane	25 /150	4320	0.156	0.625
Méthanol	25 /150	4320	0.039	0.312
Ethanol	25 /150	4320	0.039	1.250
(Digestion + décoction) par l'eau distillée	25 /150	(180 + 180)	0.312	0.312

(-): Résistante; non exécuté

Les extraits de *Camellia sinensis* L ont provoqués une inhibition sur la croissance des deux souches de *Pseudomonas aerogenosa* traduisait par des valeurs de CMI qui en atteints une moyenne de 1.25 mg/ml.

Au même temps, la souche de référence a été fortement sensibilisé par les extraits organiques de *Camellia sinensis* L 0.039 mg/ml et qui a marqué une valeur de CMI du 1.25 mg/ml avec l'extrait de macération au bout de 3 jours par comparaison au souche clinique qui a été moyennement sensible avec les extraits organiques avec des valeurs de CMI allant de (0.312 au 1.25) mg/ml, tableau 34.

➤ **Sur la croissance de *Staphylococcus aureus***

La détermination de la CMI des extraits de *Camellia sinensis* L des deux souches de *Staphylococcus aureus* ont donné les résultats suivants consignés dans le tableau 35.

Tableau 35: La Concentration Minimal Inhibitrice CMI en (mg/ml) des extraits de *Camellia sinensis* L relatives aux souches de *Staphylococcus aureus*; cliniques et référence ATCC 33862

<i>Camellia sinensis</i> L			Souches	
Extrait	Concentration (mg/ml)	Temps (minutes)	REF <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862	CLI <i>Staphylococcus aureus</i>
Décoction par l'eau distillée	10 /100	5	-	0.156
		10	-	0.156
		15	-	0.078
Macération par l'eau distillée	10 /100	4320	-	1.250
Digestion à 50 °C par l'eau distillée	10 /100	180	-	0.156
Infusion par l'eau distillée	0.8 /100	5	-	0.312
		10	-	0.156
		15	-	0.156
	1.6 /100	5	-	0.156
		10	-	0.078
		15	-	0.078
	3.2 /100	5	-	0.156
		10	-	0.078
		15	-	0.078
Ether de pétrole	25 /150	4320	0.078	0.078
Dichlorométhane	25 /150	4320	0.078	0.156
Méthanol	25 /150	4320	0.078	0.039
Ethanol	25 /150	4320	0.156	0.625
(Digestion + décoction) par l'eau distillée	25 /150	(180 + 180)	0.156	0.312

(-): Résistante; non exécuté

A la lumière de tableau 35, nous pouvons noter que la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 a été résistante aux extraits aqueux et fortement sensible aux extraits organiques avec des valeurs de CMI de (0.156 et 0.078) mg/ml avec les extraits d'éthanol, digestion + décoction et l'extraits d'éther de pétrole, dichlorométhane et méthanol respectivement.

Par contre, la souche clinique a été moyennement sensible avec la totalité des extraits avec des valeurs comprises entre (0.625 et 0.078) mg/ml.

➤ **Sur la croissance de *Candida albicans***

Les résultats obtenus à partir des tests effectués sur les deux souches de *Candida albicans* pour déterminer son CMI sont résumés dans le tableau 36.

Tableau 36: La Concentration Minimal Inhibitrice CMI en (mg/ml) des extraits de *Camellia sinensis* L relatives aux souches de *Candida albicans*; cliniques et référence ATCC 10231

<i>Camellia sinensis</i> L			Souches	
Extrait	Concentration (mg/ml)	Temps (minutes)	REF <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	CLI <i>Candida albicans</i>
Décoction par l'eau distillée	10 /100	5	0.156	0.156
		10	0.156	0.156
		15	0.156	0.312
Macération par l'eau distillée	10 /100	4320	0.312	0.625
Digestion à 50 °C par l'eau distillée	10 /100	180	0.078	0.156
Infusion par l'eau distillée	0.8 /100	5	0.156	0.156
		10	0.156	0.156
		15	0.156	0.156
	1.6 /100	5	0.156	0.156
		10	0.078	0.312
		15	0.156	0.156
	3.2 /100	5	0.156	0.312
		10	0.156	0.312
		15	0.156	0.312
Ether de pétrole	25 /150	4320	0.625	0.312
Dichlorométhane	25 /150	4320	0.156	0.312
Méthanol	25 /150	4320	0.078	0.156
Ethanol	25 /150	4320	0.312	1.250
(Digestion + décoction) par l'eau distillée	25 /150	(180 + 180)	0.312	-

(-): Résistante; non exécuté

En effet, la comparaison de deux souches de *Condida albicans* ATCC 10231 et clinique tableau 36, nous révèle que les extraits aqueux et organiques de *Camellia sinensis* L sont fortement actifs. Elles présentes une sensibilisation plus ou moins modérée sur les deux souches de *Condida albicans* avec des valeurs de CMI allant de (0.078 au 0.625) mg/ml pour *Condida albicans* ATCC 10231 contre 0.156 mg/ml au 1.25 mg/ml pour *Condida albicans* clinique avec les extraits de digestion au bout de 3 heures à 10 g de *Camellia sinensis* L et l'extrait d'éthanol au bout de 72 heures à 25 g de *Camellia sinensis* L respectivement.

5.7.3. *Erica multiflora* L

➤ Sur la croissance d'*E. coli*

La détermination de CMI sous l'effet des extraits d'*Erica multiflora* L sur les deux souches d'*E. coli* est présentée dans le tableau 37.

Tableau 37: La Concentration Minimal Inhibitrice CMI en (mg/ml) des extraits d'*Erica multiflora* L relatives aux souches d'*E. coli*; cliniques et référence ATCC 25922

<i>Erica multiflora</i> L			Souches	
Extrait	Concentration (mg/ml)	Temps (minutes)	REF <i>E. coli</i> ATCC 25922	CLI <i>E. coli</i>
Décoction par l'eau distillée	10 /100	5	1.250	-
		10	1.250	1.250
		15	1.250	-
Macération par l'eau distillée	10 /100	4320	1.250	-
Digestion à 50 °C par l'eau distillée	10 /100	180	0.312	1.250
Infusion par l'eau distillée	1.5 /100	5	1.250	1.250
		10	-	-
		15	1.250	1.250
	3 /100	5	0.625	1.250
		10	1.250	1.250
		15	1.250	1.250
	6 /100	5	1.250	1.250
		10	0.625	0.625
		15	0.156	1.250
Ether de pétrole	25 /150	4320	-	-
Dichlorométhane	25 /150	4320	-	-
Méthanol	25 /150	4320	-	-
Ethanol	25 /150	4320	-	-
(Digestion + décoction) par l'eau distillée	25 /150	(180 + 180)	-	-

(-): Résistante; non exécuté

Apparemment, les extraits organiques de l'espèce végétale *Erica multiflora* L n'ont pas été exécutés car elles ne présentent aucun effet inhibiteur sur la croissance de deux souches de *E. coli*.

Au contraire, les extraits aqueux ont faiblement sensibilisé la souche *E. coli* clinique car on a enregistré des valeurs élevées de CMI 1.25 mg/ml. Par ailleurs, *E. coli* ATCC 25922 a donné des valeurs comparables à celle d'*E. coli* clinique sauf avec l'extrait d'infusion au bout de 15 minutes à 6 g et l'extrait de digestion qui ont enregistré des valeurs de CMI (0.312, 0.156) mg/ml respectivement, tableau 37.

➤ **Sur la croissance de *Proteus mirabilis***

Le tableau 38 regroupe les différents résultats obtenus sur l'étude de la détermination de la CMI des extraits d'*Erica multiflora* L sur les deux souches de *Proteus mirabilis*.

Tableau 38: La Concentration Minimal Inhibitrice CMI en (mg/ml) des extraits d'*Erica multiflora* L relatives aux souches de *Proteus mirabilis*; cliniques et référence ATCC 7002

<i>Erica multiflora</i> L			Souches	
Extrait	Concentration (mg/ml)	Temps (minutes)	REF <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 7002	CLI <i>Proteus mirabilis</i>
Décoction par l'eau distillée	10 /100	5	1.250	0.312
		10	0.625	1.250
		15	1.250	1.250
Macération par l'eau distillée	10 /100	4320	0.625	0.625
Digestion à 50 °C par l'eau distillée	10 /100	180	0.625	0.312
Infusion par l'eau distillée	1.5 /100	5	0.625	-
		10	1.250	-
		15	1.250	1.250
	3 /100	5	0.625	1.250
		10	0.625	0.312
		15	0.625	0.312
	6 /100	5	0.312	0.625
		10	0.625	0.312
		15	0.625	0.078
Ether de pétrole	25 /150	4320	-	-
Dichlorométhane	25 /150	4320	-	-
Méthanol	25 /150	4320	-	-
Ethanol	25 /150	4320	-	-
(Digestion + décoction) par l'eau distillée	25 /150	(180 + 180)	0.625	-

(-): Résistante; non exécuté

Globalement, les extraits aqueux d'*Erica multiflora* L ont provoqué une inhibition sur la croissance des germes avec des valeurs de CMI allant de (0.078 à 1.25) mg/ml.

Ainsi, ces extraits aqueux ont inhibé la croissance de *Proteus mirabilis* ATCC 7002 avec des valeurs comprise entre (1.25 et 0.625) mg/ml. Par contre, la souche clinique a été plus sensible aux extraits d'*Erica multiflora* L où on signale des valeurs plus bas de l'ordre de (0.078, 0.312) mg/ml avec l'extrait d'infusion au bout de 15 minutes à 6 g et l'extrait de digestion au bout de 3 heures et l'extrait d'infusion au bout de 5, 10 minutes à 3 g de matériel végétale respectivement, tableau 38.

➤ **Sur la croissance de *Klebsiella pneumoniae***

Nous avons rapportés les résultats tirés de tests de CMI effectués sur les deux souches de *Klebsiella pneumoniae* avec les différents extraits d'*Erica multiflora* L et se sont présentées dans le tableau 24.

Tableau 39: La Concentration Minimal Inhibitrice CMI en (mg/ml) des extraits d'*Erica multiflora* L relatives aux souches de *Klebsiella pneumoniae*; cliniques et référence ATCC 27736

<i>Erica multiflora</i> L			Souches	
Extrait	Concentration (mg/ml)	Temps (minutes)	REF <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 27736	CLI <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Décoction par l'eau distillée	10 /100	5	-	1.250
		10	0.625	0.625
		15	1.250	1.250
Macération par l'eau distillée	10 /100	4320	1.250	0.625
Digestion à 50 °C par l'eau distillée	10 /100	180	-	0.312
Infusion par l'eau distillée	1.5 /100	5	0.625	-
		10	1.250	-
		15	0.625	0.312
	3 /100	5	1.250	1.250
		10	-	0.625
		15	-	1.250
	6 /100	5	0.625	0.625
		10	1.250	0.625
		15	1.250	1.250
Ether de pétrole	25 /150	4320	-	-
Dichlorométhane	25 /150	4320	-	-
Méthanol	25 /150	4320	-	-
Ethanol	25 /150	4320	-	-
(Digestion + décoction) par l'eau distillée	25 /150	(180 + 180)	1.250	1.250

(-): Résistante; non exécuté

Du tableau 39, après la détermination de la concentration minimale inhibitrice on a pu juger que les deux souches *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736 et clinique sont faiblement sensibles aux extraits d'*Erica multiflora* L vu les hautes valeurs de CMI comprises entre (1.25 et 0.625) mg/ml, au même temps elle a été résistante vis-à-vis des extraits organiques.

➤ **Sur la croissance de *Pseudomonas aerogenosa***

Les résultats de mesure de CMI issu suite au test par les extraits d'*Erica multiflora* L sur les deux souches de *Pseudomonas aerogenosa* sont regroupés dans le tableau 40.

Tableau 40: La Concentration Minimal Inhibitrice CMI en (mg/ml) des extraits d'*Erica multiflora* L relatives aux souches de *Pseudomonas aerogenosa*; cliniques et référence ATCC 27853

<i>Erica multiflora</i> L			Souches	
Extrait	Concentration (mg/ml)	Temps (minutes)	REF <i>Pseudomonas aerogenosa</i> ATCC 27853	CLI <i>Pseudomonas aerogenosa</i>
Décoction par l'eau distillée	10 /100	5	0.625	0.312
		10	0.625	1.250
		15	0.625	0.625
Macération par l'eau distillée	10 /100	4320	1.250	-
Digestion à 50 °C par l'eau distillée	10 /100	180	0.625	1.250
Infusion par l'eau distillée	1.5 /100	5	1.250	-
		10	0.625	1.250
		15	0.625	1.250
	3 /100	5	0.312	0.625
		10	0.625	-
		15	0.156	0.625
	6 /100	5	0.312	0.625
		10	0.156	0.625
		15	0.625	1.250
Ether de pétrole	25 /150	4320	-	-
Dichlorométhane	25 /150	4320	-	-
Méthanol	25 /150	4320	-	-
Ethanol	25 /150	4320	-	-
(Digestion + décoction) par l'eau distillée	25 /150	(180 + 180)	1.250	1.250

(-): Résistante; non exécuté

L'ensemble des extraits aqueux d'*Erica multiflora* L ont provoqué des inhibitions à des hautes valeurs de CMI qui atteint (1.25 et 0.625) mg/ml.

Ce pendant il faut signalé que les extraits organiques n'ont pas été exécutés car elles ne possèdent aucun effet inhibiteur sur la croissance de *Pseudomonas aerogenosa* clinique et référence, tableau 40.

➤ **Sur la croissance de *Staphylococcus aureus***

Les résultats concernant l'étude de détermination de la CMI des extraits d'*Erica multiflora* L sur les deux souches de *Staphylococcus aureus* est donnée dans le tableau 41.

Tableau 41: La Concentration Minimal Inhibitrice CMI en (mg/ml) des extraits d'*Erica multiflora* L relatives aux souches de *Staphylococcus aureus*; cliniques et référence ATCC 33862

<i>Erica multiflora</i> L			Souches	
Extrait	Concentration (mg/ml)	Temps (minutes)	REF <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862	CLI <i>Staphylococcus aureus</i>
Décoction par l'eau distillée	10 /100	5	0.625	1.250
		10	0.625	1.250
		15	0.625	1.250
Macération par l'eau distillée	10 /100	4320	0.312	0.625
Digestion à 50 °C par l'eau distillée	10 /100	180	0.312	0.625
Infusion par l'eau distillée	1.5 /100	5	0.625	1.250
		10	0.625	-
		15	0.312	0.625
	3 /100	5	0.312	1.250
		10	0.625	1.250
		15	0.625	1.250
	6 /100	5	0.625	0.312
		10	0.156	0.625
		15	0.156	0.625
Ether de pétrole	25 /150	4320	-	-
Dichlorométhane	25 /150	4320	1.250	-
Méthanol	25 /150	4320	0.625	0.312
Ethanol	25 /150	4320	-	-
(Digestion + décoction) par l'eau distillée	25 /150	(180 + 180)	0.625	0.312

(-): Résistante; non exécuté

Selon le tableau 41, les extraits d'*Erica multiflora* L ont présenté une certaine activité modérée dont les CMI atteint une valeur moyenne de 0.156 mg/ml. Une bonne activité, pour *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 0.156 mg/ml a été remarquée avec l'extrait d'infusion au bout de 10 et 15 minutes à 6g de matériel végétale. Par contre la CMI la plus élevée 0.312

mg/ml qui a été enregistré sur *Staphylococcus aureus* clinique, avec l'extrait de méthanol et l'extrait de digestion + décoction.

On rapporte que les extraits d'éther de pétrole et éthanol n'ont pas été exécutée car elles n'ont aucun effet inhibiteur sur les deux souches.

➤ **Sur la croissance de *Candida albicans***

Le tableau 42 résume les différents résultats obtenus suite au test de détermination de CMI des extraits d'*Erica multiflora* L sur les deux souches de *Candida albicans*.

Tableau 42: La Concentration Minimal Inhibitrice CMI en (mg/ml) des extraits d'*Erica multiflora* L relatives aux souches de *Candida albicans*; cliniques et référence ATCC 10231

<i>Erica multiflora</i> L			Souches	
Extrait	Concentration (mg/ml)	Temps (minutes)	REF <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	CLI <i>Candida albicans</i>
Décoction par l'eau distillée	10 /100	5	0.625	-
		10	0.625	1.250
		15	1.250	1.250
Macération par l'eau distillée	10 /100	4320	0.312	1.250
Digestion à 50 °C par l'eau distillée	10 /100	180	0.156	0.625
Infusion par l'eau distillée	1.5 /100	5	0.625	1.250
		10	0.625	1.250
		15	0.625	0.625
	3 /100	5	0.312	1.250
		10	0.312	0.312
		15	0.312	0.312
	6 /100	5	0.312	0.312
		10	0.312	0.312
		15	0.312	0.312
Ether de pétrole	25 /150	4320	-	-
Dichlorométhane	25 /150	4320	-	-
Méthanol	25 /150	4320	1.250	0.625
Ethanol	25 /150	4320	-	0.625
(Digestion + décoction) par l'eau distillée	25 /150	(180 + 180)	1.250	1.250

(-): Résistante; non exécuté

A la lumière de tableau 42, nous pouvons noter que la levure *Condida albicans* ATCC 10231 a été résistante aux extraits d'éther de pétrole et dichlorométhane et fortement sensible aux

extraits aqueux avec des valeurs de CMI de (0.625 et 0.156) mg/ml avec les extraits de décoction, d'infusion à 1,5 g et extraits de digestion respectivement.

Par contre, la souche clinique a été moyennement sensible avec des valeurs comprises entre (1.25 et 0.312) mg/ml.

Discussion Générale

Discussion générale

Au cours des dernières décennies, une attention particulière a ciblé l'utilisation des plantes médicinales dans le traitement et le contrôle de différentes pathologies conformément aux recommandations de l'OMS.

En Algérie, la recherche des plantes dotées d'une activité pharmacologiques a connu ces dernières années un essor à travers les enquêtes ethnopharmacologiques et l'évaluation scientifique de ces plantes, parmi elles; *Nigella sativa* L, *Camellia sinensis* L et *Erica multiflora* L objets de ce travail.

Parmi ces plantes prometteuses, nous citons la nigelle qui est connue sous le nom vernaculaire arabe «habet el-baraka» ou « habba sawda ». Notre prophète Mohammed au 7^e siècle nous les a recommandés [1] «Soignez-vous en utilisant la graine de nigelle, c'est un remède contre tous les maux à l'exception de la mort ».

En outre, la préparation des tisanes joue un facteur primordial dans l'extraction des principes actifs et le traitement envisagé; la décoction ou l'infusion sont souvent les méthodes de préparation des plantes médicinales les plus utilisées et les plus citées dans la littérature. Dans de très rares cas, d'autres méthodes de préparation et d'utilisation ont été enregistrées comme des applications directes du matériel végétal en poudre ou sous la forme d'inhalation de vapeurs [2, 3]. Les limites majeures de ces modes de préparation sont le non-respect des règles d'asepsie, la non-maîtrise des posologies, le non contrôle des temps de préparation et un défaut de conservation.

L'analyse approfondie de l'inventaire de plante dans notre étude nous a permis de dégager les faits marquants suivants:

- ❖ l'islamisation du pays a joué un rôle primordial dans le développement culturel médicinal. Parmi les plantes citées comme antimicrobien *Camellia sinensis* L et antilithiasiques *Nigella sativa* L, et certaines sont tirées directement du Coran et des manuscrits religieux. C'est le cas notamment de; *Nigella sativa*, *Zingiber officinale*.
- ❖ Parmi les plantes citées, certaines sont communes avec d'autres pharmacopées traditionnelles, surtout celles du bassin méditerranéen. Le brassage culturel favorise l'échange de savoir-faire relatif aux systèmes de soin traditionnels.
- ❖ Les habitudes alimentaires et les facteurs nutritionnels sont considérés comme la pierre angulaire dans l'urolithiase, et du même pour son traitement et prévention. La cuisine algérienne est caractérisée par sa diversité et sa richesse en espèces végétales

(légumes, épices, fruits) utilisées à la fois comme ingrédients alimentaires et pour leurs propriétés thérapeutiques.

D'autres études systématiques sur la composition chimique, les actions pharmacologiques et la toxicité des matières végétales seront nécessaires pour prouver leur valeur médicinale.

En outre, les mécanismes cellulaires et moléculaires des plantes enregistrées doivent encore être déterminés chez des modèles animaux et des informations détaillées sur leur utilisation, la durée et la posologie; doivent être étudiées avant la prescription au profil de la santé humaine.

Dans ce contexte la présente étude constitue, une approche expérimentale à travers laquelle nous contribuons à l'évaluation de l'activité antilithiasique d'huile essentielle brute de la partie aérienne (graine) de *Nigella sativa* L. Au même temps, tester le pouvoir antimicrobien avec *Nigella sativa* L, *Camellia sinensis* L et *Erica multiflora* L contre quelques germes responsables d'induire une infection urinaire.

Les recherches préliminaires nous a permis de conclure que la plupart des activités pharmacologiques sont attribuées à *Camellia sinensis* L [4, 5], *Erica multiflora* L [6, 7] et l'huile essentielle de *Nigella sativa* L [8-17].

De ce fait, ceci nous a poussés à l'étude *in-vivo* afin d'évaluer les effets antilithiasiques de l'extrait huileux de *Nigella sativa* L, *in-vitro* pour déterminer le pouvoir antimicrobien de *Nigella sativa* L, *Camellia sinensis* L et *Erica multiflora* L ainsi que la mise en évidence des différentes familles de composés chimiques présents dans les extraits testés.

Les rendements les plus importants d'huile essentielle des graines de *Nigella sativa* L, feuilles de *Camellia sinensis* L et feuilles et fleurs de *Erica multiflora* L sont de l'ordre de 1,82%, 34,6% et 26,6% du poids total, respectivement.

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

Phytochimie

Les tests phytochimiques réalisés sur *Nigella sativa* L, *Camellia sinensis* L et *Erica multiflora* L montrent leurs richesse en plusieurs composés pouvant être à l'origine des effets antilithiasiques, antioxydants et antimicrobiens trouvés au cours de cette étude. La graine de nigelle et les feuilles de thé vert, qui sont l'axe de cette contribution, contient la majorité de composés décelés dans la plante ce qui peut être ardemment lié à son efficacité.

Nigella sativa L est très riche en saponosides, les huiles volatiles, les acides aminés, les glucosides cardiotoniques [18], les alcaloïdes [19], les tannins, les flavonoïdes, calcium et

thymoquinone [19, 20]. Cependant, *Erica multiflora* L est riche en matière de flavonoïdes, les tannins, saponosides [21]. *Camellia sinensis* L a réclaté les mêmes constituants que *Nigella sativa* L [22-28].

Les composés phénoliques constituent un groupe vaste de molécules dont font partie les tannins, les flavonoïdes, les coumarines, les anthraquinones, les phénols simples et les acides phénoliques. Dans ce modeste travail, nous avons confirmé la richesse des trois plantes en tannins. Ce dernier est, dans certaines conditions, un précurseur des flavonoïdes [29]. En ce qui concerne les minéraux, les graines de *Nigella sativa* L, a semblé contenir des quantités utiles de calcium (536 mg/g); ces montants étant comparables aux valeurs correspondantes (572 mg/g) rapporté dans la littérature [30].

Récemment, la présence de TQ (Thymoquinone) en graine de *Nigella sativa* L a été confirmée en utilisant des méthodes à rendement très poussé (TLC) et la méthode (HPLC) [20, 31]. Une méthode de (HPTLC) pour mesurer le constituant pharmacologiquement actif (TQ) dans l'huile des graines de *Nigella sativa* L a été récemment décrite par Ghosheh et *al* [32].

La totalité des composants volatils extraits par les solvants organiques montrent la présence d'un pourcentage bas de Thymoquinone ($2.7 \pm 0.05\%$). Ces résultats sont tout à fait semblables à ceux obtenus par D'Antuono dans le cas d'hydrodistillation des graines de *Nigella sativa* L provenus du Maroc [33] et d'Iran [34].

La composition chimique d'une plante reflète directement sa physiologie qui peut être le résultat d'une adaptation à un environnement. Pour discuter les teneurs en composés détectés chez les trois plantes, il faut, avant tout, maîtriser les notions de physiologie végétale.

Activité antilithiasique

La discussion du mode opératoire est souvent négligée malgré son importance capitale. Le choix de la plante, la voie d'administration, l'induction de la pathologie ainsi que les paramètres suivis sont des points essentiels à fixer afin d'avoir des résultats discutables.

Dans cette approche, nous avons fixé comme objectif l'étude de l'activité antilithiasique de l'huile essentielle de *Nigella sativa* L en suivant l'évolution de quelques paramètres urinaires (Volumes, Oxalate, Phosphate, Calcium, Acide urique et Magnésium), biochimiques sériques (Urée nitrogène BUN, Créatinine et l'Acide urique) et finalement biochimiques rénaux (Oxalate, Calcium et Phosphate).

Ces paramètres sont les plus recherchés dans la thérapie de la lithiase rénale.

Dans ce cadre, différents modèles expérimentaux d'induction de la lithiase urinaire sont approuvées; parmi elles l'éthylène glycol et chlorure d'ammonium qui sont très utilisées pour son induction d'une urolithiase [35].

Dans la présente étude, l'administration chronique de 0,75% d'éthylène glycol et 1% de chlorure d'ammonium aux rats males Wistar a eu comme conséquence une hyperoxalurie.

Des études précédentes ont indiqué que l'administration d'éthylène-glycol aux rats males résulte la formation des calculs rénaux composées principalement d'oxalate de calcium après 14 jours d'administration. Le précurseur principal d'acide oxalique dans les mammifères est l'acide glyoxalique [36].

Le mécanisme biochimique pour ce processus est lié à une augmentation de la concentration urinaire en oxalate. La formation des calculs qu'est provoquée par une hyperoxalurie, et qui cause en conséquence la plus grande conservation rénale et l'excrétion d'oxalate, d'autres études plus tôt ont prouvé que la quantité de calculs formés chez les rats femelles était moins significative par comparaison aux rats males [37]

Le dépôt rénal en oxalate de calcium par l'éthylène glycol et chlorure d'ammonium chez les rats est fréquemment employé. Chlorure d'ammonium est rapporté qu'elle accélère l'induction de lithiase rénale [38, 39].

La dose testée de NSGH est de 5 ml/kg [40]. De moment que ce dernier est doué d'une activité antilithiasique remarquable.

La formation des calculs urinaires aura lieu en raison des changements quantitatives en paramètres urinaire, telle que l'hyperoxalurie et l'hypercalciurie, menant à la sursaturation urinaire, qui se cristallise plus tard, on formant des agrégats et finalement des calculs [41-43].

La conversion oxydante enzymatique du glucolate en oxalate par l'intermédiaire de glyoxylate est la voie métabolique principale impliquée dans la synthèse endogène d'oxalate. Les perturbations enzymatiques sont les facteurs causatifs pour l'hyperoxalurie idiopathique; tandis que, l'absorption intestinale déficiente de l'oxalate joue un rôle essentiel dans l'hyperoxalurie et en conséquence provoque une augmentation de la concentration urinaire en oxalate [44].

L'excrétion d'oxalate et de calcium en urine ont été excessivement augmentées chez les rats rédu lithiasiques. Puisque il a été prouvé que l'hyperoxalurie est un facteur de risque plus significatif dans la pathogénie des calculs rénaux que l'hypercalciurie, les changements des taux d'oxalate urinaires sont relativement beaucoup plus importants que ceux du calcium [45]. L'élévation de calcium urinaire est un facteur favorisant la nucléation et la précipitation de CaOx ou apatite (CaPh) [46]. L'augmentation du dépôt de calcium dans les reins et son

excrétion urinaire peut être due au mal reabsorption tubulaire rénal [47]. L'huile essentielle de *Nigella sativa* L diminue les taux d'oxalate et de calcium dans l'urine et leurs rétentions dans les reins. On a observé une augmentation remarquable en concentration urinaire en phosphate chez des rats lithiasiques. L'excrétion urinaire en phosphate accrue avec l'oxalate semble fournir un environnement approprié pour la formation des cristaux de CaPh, qui induit le dépôt de CaOx [48]. Le traitement avec l'extrait des graines de *Nigella sativa* L rétablit le niveau de phosphate urinaire, en réduisant le risque de formation des calculs.

Dans l'urolithiase, les taux de filtration glomérulaires diminuent (GFR), dues à l'obstruction de la sortie d'urine par des calculs dans le système urinaire. En raison de ceci, des déchets, en particulier des substances azotées telles que l'urée, créatinine et l'acide urique qui s'accumulent dans le sang [49]. En outre, la plus grande peroxydation de lipide et la diminution du potentiel antioxydant ont été rapportés dans les reins des rats traités avec un inducteur de lithiase [50, 51].

Dans ce contexte, il a été rapporté que l'oxalate peut induire la peroxydation de lipide et endommager le tissu rénal par réaction avec des acides gras polyinsaturés dans les cellules de membrane [52]. En parallèle, Chez les mêmes sujets, les niveaux sériques élevés de créatinine, BUN et acide urique indiquent des dommages rénaux marqués. Cependant, dans la médecine traditionnelle, *Nigella sativa* L est employé comme diurétique. En conséquence accélère la dissolution des calculs préformés dans le régime préventif.

L'étude histopathologique a soutenu ces résultats. Les niveaux sériques nettement élevés en BUN, créatinine et acide urique chez les rats lithiasiques étaient indicatifs de la nécrose en avant de l'épithélium rénal. De cela, les dommages se sont localisés à la dernière partie de néphron et le système collecteurs. Le taux élevé d'oxalate dans l'urine et même dans les reins peuvent être l'un des facteurs causatifs d'une dégénération peroxydative de l'épithélium rénal. Cependant, le traitement préventif empêche la peroxydation des lipides induits par l'oxalate et cause la régénération de l'épithélium rénal.

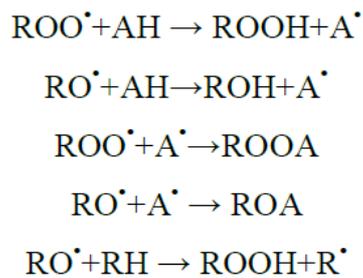
Activité antioxydant

Diverses études ont déterminé expérimentalement les capacités des extraits naturels à piéger les radicaux libres. Cette activité dépend d'un certain nombre de paramètres; la dose, la structure, les substituants et le degré de polymérisation de la molécule. Le DPPH est un radical libre stable, qui accepte un électron ou un proton pour donner une molécule diamagnétique stable. Il est très utilisé dans le criblage des activités de piégeage des radicaux libres. Les antioxydants réagissent avec le DPPH pour le convertir en α - α ,diphényl- β -picryl-hydrazine, de couleur jaune. Le degré de décoloration exprime le potentiel de piégeage de l'antioxydant.

On considère les terpèneoïdes, flavonoïdes, alcaloïdes et les tannins comme des substances potentiellement antioxydants. Ce pendant, la présence de ces substances indique que nos extraits sont dotés d'une activité antioxydante. Les meilleurs antioxydants naturels sont l'huile essentielle *Nigella sativa* L et l'extrait méthanolique de *Camellia sinensis* L. Les piègeurs les plus efficaces du radical libre DPPH sont ceux qui possédant des valeurs EC₅₀ les plus basses: l'extrait méthanolique de *Camellia sinensis* L (214,41 µg/ml) et l'huile essentielle *Nigella sativa* L (451,09 µg/ml)

Nos extraits, *Camellia sinensis* L, *Erica multiflora* L et l'huile essentielle de *Nigella sativa* L sont actifs, cela est due surement à la complexité d'extrait brute en substances polyphénoliques et la synergie entre eux pour une meilleure activité antioxydante [53].

Des savants ont postulé les réactions selon lesquelles les composés phénoliques (AH) interfèrent avec l'oxydation des lipides en cédant leurs hydrogènes aux radicaux lipidiques, puis entrent en compétition avec les réactions de propagation [54].



L'efficacité de l'antioxydant (AH) augmente si la force de la liaison A-H est faible et le radical (A) résultant doit être le plus stable possible [54], chélateurs des ions métalliques [55, 56]. Plusieurs études ont montrés que les groupements hydroxyles dans les composés phénoliques et flavonoïdes sont responsables de leurs pouvoirs antioxydants [57, 58], et aussi les sites d'hydroxylation des différents noyaux affectent la potentialité antioxydante [59].

À des fins comparatives, un antioxydant standard est utilisé; l'acide ascorbique. Il a montré une activité antiradicalaire très puissante avec des EC₅₀ de l'ordre de 104,07 µg/ml et un APR de l'ordre de 0,0096.

Les extraits testés, représente des pouvoirs actifs avec des EC₅₀ de l'ordre 214,41 µg/ml à 12248,57 µg/ml pour des APR qui varie de 0,0047 à 8,1642, respectivement.

En comparaison avec l'antioxydant standard, on aura cet ordre;

Acide ascorbique > *Camellia sinensis* L > *Nigella sativa* L >>>> *Erica multiflora* L

Acide ascorbique est 2 fois plus active que l'extrait de *Camellia sinensis* L et 4 fois plus que l'huile essentielle mais 118 fois plus active que l'extrait d'*Erica multiflora* L. L'effet fort est probablement attribué à leur richesse en composés phénoliques et en flavonoïdes. Ce dernier possède une activité significativement supérieure ($p \leq 0,05$), ceci peut être dû à la contribution des huiles essentielles ainsi qu'à d'autres composés lipidiques dont l'activité antiradicalaire qui a été largement étudiée. Le carvacrol, le *t*-anthenol et le 4-terpineol aussi bien que la thymoquinone, sont de puissants agents réducteurs du radical DPPH, et piègeurs du radical hydroxyle [60].

L'activité antiradicalaire d'huile des graines de la nigelle et les feuilles de *Camellia sinensis* L a été investiguée par [61] et [4], respectivement. Cette étude a été menée sur l'huile fixe et ses fractions, en utilisant deux radicaux libres stables; le DPPH et le radical glavinoxyl. L'activité antiradicalaire manifestée par l'huile brute a été interprétée par une action combinée des différents antioxydants endogènes contenus dans l'huile et elle est corrélée avec la teneur en acides gras polyinsaturés, en composés insaponifiables et en phospholipides, de même que la valeur de peroxyde initiale d'huile brute.

Globalement, les résultats obtenus dans le présent travail indiquent l'existence d'une corrélation remarquable et significative entre le pouvoir antiradicalaire d'extrait de nigelle et leurs composés phénoliques. Comme l'on montré un grand nombre de travaux réalisés sur l'activité antiradicalaire d'extraits des plantes [62-64].

En effet, les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes sont reconnus comme des substances potentiellement antioxydants ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène, l'effet scavenger des flavonoïdes (FLOH) est attribué à leur faible potentiel redox qui les rend thermodynamiquement capable de réduire les radicaux libres ($R\bullet$) par un transfert d'atome d'hydrogène à partir des groupements hydroxyle. Cette réaction donne naissance au radical aroxyle ($FLO\bullet$) et à la molécule radicalaire rendu stable (RH), le ($FLO\bullet$) subira par la suite un réarrangement structurale permettant la redistribution de l'électron célibataire sur le cycle aromatique et la stabilisation de radicaux aroxyle [65].

Pouvoir antimicrobien

On note ici que la méthode utilisée est celle de Vincent, que le disque déposé à la surface du milieu gélosé est chargé de 20 μ l d'extrait naturel.

L'huile essentielle de *Nigella sativa* L et les extraits de *Camellia sinensis* L ont présenté une puissante activité dont les diamètres des zones d'inhibition ont atteints les 24 mm, 32.7 mm respectivement. Dans cette étude, l'huile de *Nigella sativa* L et l'extrait méthanolique de

Camellia sinensis L ont manifestés comme des bons inhibiteurs de croissance sur les Gram⁺ que les Gram⁻; ce qu'est confirmé par [66-68]. Un certain nombre de composés issus de plantes possèdent une activité considérable souvent contre les bactéries de Gram⁺ mais pas contre les bactéries Gram⁻ de faite qu'elles sont dotés d'une barrière efficace à la perméabilité, consistée en membrane externe, qui limite la pénétration des composés exogènes et une résistance au multi-drug qui expulsent des toxines à travers cette barrière. Il est possible que l'inefficacité s'apparente à la plantes antimicrobiennes soit en grande partie due à cette barrière [69].

Une bonne activité la plus élevée à été remarqué contre la souche *S. aureus* ATCC 33862 dont la valeur moyenne de l'auréole d'inhibition a été de 24 mm avec l'huile de *Nigella sativa* L mais 32,7 mm avec l'extrait méthanolique de *Camellia sinensis* L.

Nos résultats se concorde avec ceux trouvé par [70], qui parlent d'une très bonne activité antimicrobienne de *S. aureus* MTCC 737 et que l'huile essentielle testé par la technique des disques, les a permis d'obtenir des zones d'inhibitions de 18mm, 14mm, 16mm, 14mm contre respectivement *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumonia* et *P. aeruginosa*.

La présence des composés biologiquement actifs tels que α -thujène, 2(1H)-naphthalenone, α -pinène, α -phellandrene, limonène, thymoquinone, myristicine etc.. en huile volatile de *Nigella sativa* L ont contribué à l'activité antimicrobienne d'huile volatile [70-74].

Nous avons remarqué aussi, que *C. albicans* et *P. aeruginosa* (Clinique) se sont montré insensibles contre l'action d'huile essentielle de la nigelle. Nos résultats se concordent avec les travaux de [70, 75], observant une faible activité contre les mêmes souches de *Nigella sativa* L récolté de l'Inde.

Références:

- [1].Alami, S. *La phytothérapie ancestrale actuelle et d'avenir*. Thèse de Médecine, Casablanca, 1989.
- [2].Aburjai T., Hudaib M., Tayyema R., Yousef M., Qishawi M., Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Jordan, the Ajloun Heights region. *J. Ethnopharmacology*. 2007, 110: 294-304.
- [3].Al-Qura'n S., Ethnopharmacological survey of wild medicinal plants in Showbak, Jordan. *J. Ethnopharmacology*. 2009, 123: 45-50.
- [4].M. Pilar Almajano, Rosa Carbó, J. Angel Loópez Jimé'nez, Michael H. Gordon. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*. 2008, 108: 55-63.
- [5].J. M. T. Hamilton-Miller. Antimicrobial Properties of Tea (*Camellia sinensis* L.). *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1995, 39 (11): 2375-2377.
- [6].Naïma Guendouze-Bouchefa, Khodir Madani, Mohamed Chibane, Lila Boulekbache-Makhlouf, Didier Hauchard, Martin Kiendrebeogo, Caroline Stévigny, Philippe Ndjolo Okusa, Pierre Duez. Phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activities of three Ericaceae from Algeria. *Industrial Crops and Products*. 2015, (70): 459-466.
- [7].F. Amezoua, W. Badri, M. Hsaine, N. Bourhim, H. Fougrach. Evaluation des activités antioxydante et anti-inflammatoire de *Erica arborea* L. du Maroc. *Pathologie biologique*, 2013, 61: 251-258.
- [8].Mahfouz, M., & El-Dakhakhny, M. The isolation of a crystalline active principle from *Nigella sativa* seeds. *J Pharm Sci UAR*. 1960. 1: 9-19.
- [9].El-Tahir KE, Ashour MM, Al-Harbi MM. The respiratory effects of the volatile oil of the black seed (*Nigella sativa*) in guinea pigs: elucidation of the mechanism(s) of action. *Gen Pharmacol*. 1993a, 24:1115-1122.
- [10]. El-Tahir KE, Ashour MM, Al-Harbi MM. The cardiovascular actions of the volatile oil of the black seed (*Nigella sativa*) in rats: elucidation of the mechanism of action. *Gen Pharmacol*. 1993b, 24:1123-1131.
- [11]. El-Dakhakhany M. Some pharmacological properties of some constituents of *Nigella sativa* L. seeds. The carbonyl fraction of the essential oil. In: *Proceedings of the Second International Conference on Islamic Medicine*, 12th April. Kuwait: *Studies in Islamic Medicine and Advantages of Herbal treatment*. 1982, 246-431.
- [12]. Al-Hader AA, Aqel MB, Hasan ZA. Hypoglycemic effects of the volatile oil of

Nigella sativa seeds. Int J Pharmacogn. 1993, 31: 96-100.

- [13]. Zaoui A, Cherrah Y, Alaoui K, Mahassine N, Amarouch H, Hassar M. Effects of *Nigella sativa* fixed oil on blood homeostasis in rat. J Ethnopharmacology. 2002a, 79: 6-23.
- [14]. Fararh KM, Atoji Y, Shimizu Y, Takewaki T. Insulinotropic properties of *Nigella sativa* oil in streptozotocin plus nicotinamide diabetic hamster. Res Vet Sci. 2002, 73: 279-282.
- [15]. El-Dakhakhny M, Mady N, Lembert N, Ammon HP. The hypoglycemic effect of *Nigella sativa* oil is mediated by extrapancreatic actions. Planta Med. 2002b, 68: 465-466.
- [16]. Labhal A, Settaf A, Bennani-kabchi N, Cherrah Y, Slaoui A, Hassar M. Actio antiobesite, hypocholesterolemiant et hypotriglyceridemiant de *Nigella sativa* chez le *Psammomys obesus*. Caducee. 1997, 27: 8-26.
- [17]. Enomoto S, Asano R, Iwahori Y, Narui T, Okada Y, Singab AN, Okuyama T. Hematological studies on black cumin oil from the seeds of *Nigella sativa* L. Biol Pharm Bull. 2001, 24: 307–310.
- [18]. Khan MA. Chemical composition and medicinal properties of *Nigella sativa* Linn. Inflammopharmacology. 1999, 7: 15-35.
- [19]. ur-Rahman A, Malik S, Cuncheng H, Clardy J. Isolation and structure of determination of nigellicine, a novel alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*. Tetrahedron Lett. 1985, 26: 2759-2762.
- [20]. Aboul-Enein YH, Abou-Basha IL. Simple HPLC method for the determination of thymoquinone in black seed oil (*Nigella sativa* Linn). J Liquid Chrom. 1995, 18: 895-902.
- [21]. Amezouara, W. Badri, M. Hsaine, N. Bourhim, H. Fougrach. The hypolipidaemic activity of aqueous *Erica multiflora* flowers extract in Triton WR-1339 induced hyperlipidaemic rats: A comparison with fenofibrate. Journal of Ethnopharmacology. 2007, 109: 156-160.
- [22]. Karakaya, S., & Kavas, A. Antimutagenic activities of some foods. Journal of the Science of Food and Agriculture. 1999, 79(2): 237-242.
- [23]. Nihal, M., Ahmad, N., Mukhtar, H., & Wood, G. S. Antiproliferative and proapoptotic effects of ()-epigallocatechin-3-gallate on human melanoma: Possible implications for the chemoprevention of melanoma. International Journal of Cancer. 2005, 114(4): 513–521.

- [24]. Chattopadhyay, P., Besra, S. E., Gomes, A., Das, M., Sur, P., Mitra, S., et al. Anti-inflammatory activity of tea (*Camellia sinensis*) root extract. *Life Sciences*. 2004, 74(15): 1839-1849.
- [25]. Frei, B., & Higdon, J. V. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: Evidence from animal studies. *Journal of Nutrition*. 2003, 133(10): 3275S-3284S.
- [26]. Lau, K. M., He, Z. D., Dong, H., Fung, K. P., & But, P. P. H. Anti-oxidative, anti-inflammatory and hepato-protective effects of *Ligustrum robustum*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002, 83(1-2): 63-71.
- [27]. Wheeler, D. S., & Wheeler, W. J. The medicinal chemistry of tea. *Drug Development Research*. 2004, 61(2): 45-65.
- [28]. Rietveld, A., & Wiseman, S. Antioxidant effects of tea: Evidence from human clinical trials. *Journal of Nutrition*. 2003, 133(10): 3285S-3292S.
- [29]. Harbone JB. *Phytochemical Methods, a guide to modern techniques of plant analysis*. Ed Chapman et Hall, 3^{ème} Edition. 1998.
- [30]. Salma Cheikh-Rouhou a, Souhail Besbes, Basma Hentati, Christophe Blecker, Claude Deroanne, Hamadi Attia., *Nigella sativa* L.: Chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction. *Food Chemistry*. 2007, 101: 673-681.
- [31]. Abou Basha LI, Rashed MS, Aboul-Enein HY. TLC assay of thymoquinone in black seed oil (*Nigella sativa* Linn) and identification of dithymoquinone and thymol. *J Liquid Chrom*. 1995, 18: 105-115.
- [32]. Ghosheh OA, Houdi AA, Crooks PA., High-performance liquid chromatographic analysis of the pharmacologically active quinones and related compounds in the oil of the black seed. *J Pharm Biomed Anal*. 1999, 19: 757-762.
- [33]. D'Antuono, Moretti A., Lovato A.F.S., Seed yield, yield components, oil content and essential oil content and composition of *Nigella sativa* L. and *Nigella damascena* L. *Industrial Crops and products*. 2002, 59-69.
- [34]. Nickavar B., Mojab F., Javidnia K., Amoli M. A. R., Chemical composition of the fixed and volatile oils of *Nigella sativa* from Iran. *Z.Naturforsch*. 2003, 58(9-10): 629-630.
- [35]. Kalyani Divakar, A. T. Pawar, S. B. Dighe, Goli Divakar. Protective effect of the hydro-alcoholic extract of *Rubia cordifolia* roots against éthylène glycol induced urolithiasis in rats. *Food and chemical Toxicology*. 2010, 48: 1013-1018.

- [36]. Weinhouse S, Friedman B. Metabolism of labelled 2-carbon acids in the intact rat. *J Biol Chem.* 1951, 191: 707-717.
- [37]. Yagisawa T. et al. The influence of sex hormones on renal osteopontin expression and urinary constituents in experimental urolithiasis. *J. Urol.* 2001, 166(3): 1078-1082.
- [38]. Fan, J., Michael, A.G., Chandhoke, P.S., Impact of ammonium chloride administration on a rat ethylene glycol urolithiasis model. *Scanning Microsc.* 1999, 13: 299-306.
- [39]. Atmani, F., Slimani, Y., Mimouni, M., Hacht, B., Prophylaxis of calcium oxalate stones by *Herniaria hirsute* on experimentally induced nephrolithiasis in rats. *BJU Int.* 2003, 92: 137-140.
- [40]. Mehmet Kanter, Halit Demir, Cengiz Karakaya, Hanefi Ozbek., Gastroprotective activity of *Nigella sativa* L oil and its constituent, thymoquinone against acute alcohol-induced gastric mucosal injury in rats. *World J Gastroenterol.* 2005, 11(42): 6662-6666.
- [41]. http://www.healthworks2000.com/Enzyme_therapy_for_kidney_stones.htm.
- [42]. Pak CYC, Resnick MI. Medical therapy and new approaches to management of urolithiasis. *Urol. Clin. N. Am.* 2000, 27 (2): 243-253.
- [43]. Baggio B. et al. Calcium oxalate nephrolithiasis: an easy way to detect an imbalance between promoting and inhibiting factors. *Clinica. Chimica. Acta.*, 1982, 124 (2): 149-55.
- [44]. Williams HE, Wandzilak TR. Oxalate synthesis, transport and the hyperoxaluric syndromes. *J. Urol.* 1989, 141: 742-747.
- [45]. Tiselius HG. Solution chemistry of supersaturation. In: Coe FI, Favus MJ, Pak CYC, Parks JH, Preminger GM. eds. *Kidney stones: Medical and surgical management*; Philadelphia: Lippincott Reven; 1996.
- [46]. Lemann JJr, Worcester EM, Gray RW. Hypercalciuria and stones. *Am. J. Kidney Dis.* 1991, 27: 386-391.
- [47]. Hautmann R, Lehmann A. Intrarenal distribution of oxalic acid, calcium, sodium and potassium in man. *Eur. J. Clin. Invest.* 1980, 10: 173-176.
- [48]. Low RK, Stoller ML. Uric acid nephrolithiasis. *Urol. Clin. N. Am.* 1997, 24: 135-148.
- [49]. Ghodkar PB. *Textbook of medical laboratory technology*. 1st ed. Mumbai: Bhalani Publishing House; 1994.

- [50]. Sumathi R, Jayanthi S, Kalpanadevi V, Varalakshmi P. Effect of DL- α -lipoic acid on tissue lipid peroxidation and antioxidant systems in normal and glycollate treated rats. *Pharmacol. Res.* 1993, 27 (4): 1-10.
- [51]. Saravanan N, Senthil D, Varalakshmi P. Effect of L-cysteine on lipid peroxidation in experimental urolithiatic rats. *Pharmacol. Res.* 1995, 32 (3): 165-169.
- [52]. Ernster L, Nordenbrand K. Oxidation and phosphorylation. In: Ronald WE, Maynard EP. ed. *Methods in enzymology*. Vol. X. New York: Academic Press; 1967.
- [53]. Vermerris W. et Nicholson R. *Phenolic compound chemistry*; Ed: Springer. 2006, 1-70.
- [54]. Shahidi F. et Naczki M.; *Extraction and analysis of phenolics in food*; *Journal of Chromatography A* 1054. Ed: ELSEVIER. 2004, 95-111.
- [55]. Pratt D.E. et Hudson B.J.F.; *Natural antioxidants not exploited commercially in Food Antioxidants*; Ed: ELSEVIER. London. 1990, 171–192.
- [56]. Ladaniya M.; *Citrus Fruit: biology, technology and evaluation*; Ed 1: Academic press, ELSEVIER. 2008, 157-165.
- [57]. Heigen C.G.M., Haenen G.R.M.M., Vekemans J.A.J.M. et Bast A.; *Peroxy-nitrite scavenging of flavonoids: structure activity relationship*; *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2001, 10: 199-206.
- [58]. Heim K.E., Tagliaferro A.R., et Bobilya D.J.; *Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship*; *Journal. Nutr. Biochem.* 2002, 13: 572-584.
- [59]. URI N.; *Mechanism of antioxidation*; Ed: SCIENCE PUBLISHERS, New York. 1961, 133-169.
- [60]. Burits, M., & Bucar, F. Antioxydant activity of *Nigella sativa* L. essential oil. *Phytother Res.* 2000, 14 (5): 323-328.
- [61]. Ramadan, M.F., Kroh, L.W., Mörsel, J.T. Radical scavenging activity of black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.), and niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) crude seeds oils and oil fractions. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2003, 51: 6961-6969.
- [62]. Mansouri, A., Embarek, G., Kokkalou, E., Kefalas, P. Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry.* 2005, 89: 411-420.

- [63]. Beta, T., Nam, S., Dexter, J.E., Sapirstein, H.D. Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions. *Cereal chemistry*. 2005, 82: 390-393.
- [64]. Samaniego-Sánchez, C., González, A.M.T., García-Parrilla, M.C., Granados, J.J.Q., García de la Serrana, H.L., Martínez, M.C.L. Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Analytica Chimica Acta*. 2007, 593: 103-107.
- [65]. Javanovic, S.V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B., Simic, M.J. Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*. 1994, 116: 4846-4851.
- [66]. El-Fatratry, H., & El-Alfy, T. Isolation and structure assignment of an antimicrobial principle from the volatile oil of *Nigella sativa* L. seeds. *Die Pharmazie*, 1975. 30 (2): 109-111.
- [67]. Aboul Ela, M., El-Shaer, N., & Ghanem, N. Antimicrobial evaluation and chromatographic analysis of some essential and fixed oils. *Die Pharmazie*, 1996. 51 (12): 993-994.
- [68]. Hanafy, M., & Hatem, M. Studies on the antimicrobial activity of Black seed. *J Ethnopharmacol*, 1991. 34 (2/3): 275-278.
- [69]. Tegos G, Stermitz SR, Lomovskaya O and Lewiw K. Multidrog Pump Inhibitors uncover remarkable activity of plants antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002, 46 (10): 3133.
- [70]. Saptha Jyothi Gerige, Mahesh Kumar Yadav Gerige, Muralidhara Rao and Ramanjaneyulu. GC-MS Analysis of *Nigella sativa* Seeds and Antimicrobial Activity of its Volatile oil. *BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY*. 2009, 52, (5): 1189-1192.
- [71]. El-Fatratry, H., & El-Alfy, T. Isolation and structure assignment of an antimicrobial principle from the volatile oil of *Nigella sativa* L. seeds. *Die Pharmazie*. 1975, 30 (2) : 109-111.
- [72]. Aboul Ela, M., El-Shaer, N., & Ghanem, N. Antimicrobial evaluation and chromatographic analysis of some essential and fixed oils. *Die Pharmazie*. 1996, 51 (12): 993-994.
- [73]. Ferdous, A., Islam, S., Ahsan, M., Hasan, C., & Ahmad, Z. In vitro antibacterial activity of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds against multiple drug-

resistant isolates of *Shigella* species and isolates of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Phytother Res.* 1992, 6 (2): 137-140.

[74]. Hanafy, M., & Hatem, M. Studies on the antimicrobial activity of Black seed. *J Ethnopharmacology*, (1991), 34 (2/3): 275-278.

[75]. M T Salman, R A Khan, I Shkla. Antimicrobial activity of *Nigella sativa* Linn. Seed oil against multi-drug resistant bacteria from clinical isolates. *Natural product Radiance*. 2008, 7(1): 10-14

Conclusion Générale

Conclusion générale

A l'issue de ce travail, il en ressort que la phytothérapie demeure une pratique encore largement utilisée par la population algérienne pour le traitement de nombreuses maladies dont la lithiase urinaire, malgré le développement socioéconomique et meilleure prise en charge médicale des malades.

Notre pays est doté d'une biodiversité végétale immense et une grande partie de cette flore est constituée par des espèces médicinales qui restent à découvrir.

Ce présent travail a porté dans un premier temps l'identification des groupes phytochimiques, qui caractérisent les extraits des parties végétales des trois plantes choisis appartenant à des biotopes et familles botaniques différentes. Dans un deuxième temps, la recherche d'activités biologiques et les potentialités que peuvent avoir ces extraits *in vitro* et *in vivo* à savoir les capacités antibactériennes, antifongiques, antioxydantes et antiurolithiasique.

Sur le plan phytochimique, les résultats montrent une composition riche et variée en métabolites secondaires où les flavonoïdes, saponosides, les acides aminés, les tannins et les glycosides cardiotoniques ont caractérisé tous les extraits bruts, alors que les thymoquinones et les alcaloïdes particularisent l'espèce de *Nigella sativa* L. Nous nous sommes intéressés plus à cette dernière pour déterminer les taux de Calcium et d'oxalate de $536 \pm 18,93$ mg/g et $0,031 \pm 0,01$ mg/g respectivement.

Les résultats de cette présente étude montrent clairement que les substances naturelles sont capables d'inhiber la croissance des agents bactériens et fongiques qui sont responsables d'induire une infection urinaire. Pour l'huile essentielle, cette inhibition est témoignée par des diamètres des aréoles (souches cliniques) allant de 12 à 15 mm pour les bactéries Gram⁻ et 21 mm pour les Gram⁺ alors qu'elle est faible 09 mm pour la levure. Ces derniers sont soutenus par des concentrations minimales inhibitrices CMI qui varient entre 0,156 et 1,250 mg /ml ; alors qu'elle est importante avec les extraits aqueux et organiques de *Camellia sinensis* L., et *Erica multiflora* L. avec des diamètres des zones d'inhibitions de 08 à 18,3 mm pour les Gram⁻, 33,6 mm pour les Gram⁺ et 27 mm pour la levure. La CMI de ces derniers confirme cela avec des concentrations allant de 0,039 au 1,250 mg /mL.

Les potentialités antioxydantes de différents extraits méthanoliques et aqueux sont évaluées par piégeage directe des radicaux libres par la méthode du radical libre DPPH. Les

résultats *in vitro*, ont révélé des activités antioxydantes par l'ensemble des extraits bruts et particulièrement les extraits organiques. Un fort pouvoir de piégeage du DPPH similaire à l'acide ascorbique exercé par l'huile essentielle de *Nigella sativa* L et l'extrait méthanolique de *Camellia sinensis* L s'est manifesté; la valeur EC50 la plus basse est lue avec *Erica multiflora* L (12248,57 µg/ml).

Les capacités antioxydantes révélées *in vitro* sont en relation directe avec le contenu en métabolites secondaires de chaque extrait dépendent de l'ensemble des substances antioxydants, de leur nature, leur quantité, leur structure et de toutes les interactions moléculaires qui peuvent agir de façon synergique pour faire hausser cette activité. Cette étude suggère que non seulement les composés phénoliques sont les substances antioxydants par excellence mais d'autres substances non phénoliques pouvant être des antioxydants plus efficaces et plus puissantes et que les espèces les plus riches en polyphénols ne sont pas pour autant de bons antioxydants.

Dans ce travail, les effets néphroprotectifs et antiurolithiasiques d'huile des graines de *Nigella sativa* L (NS), qui est une plante algérienne traditionnelle généralement connue sous le nom de *Habba souda*, a été évalué. Cette étude a été menée pour déterminer si l'huile essentielle pourrait empêcher ou réduire l'agrégation de calculs d'oxalate de calcium dans les néphrolithiases expérimentales chez les rats Wistar.

L'huile a été administrée oralement et quotidiennement, pendant 28 jours aux rats néphrolithiasiques à une dose de 5 ml/kg. Les paramètres tels que : le poids corporel, le volume urinaire, l'oxalate, le phosphate, l'index rénal, le niveau créatinine sérique, l'acide urique sérique, l'urée sérique et les ions (Ca^{2+} , Mg^{2+}), ont été évalués durant et après 28 jours de traitement chez les rats. En outre, une étude histopathologique des coupes colorées avec l'hématoxyline et éosine des reins a été réalisée.

L'effet des extraits a pu être avantageux en empêchant la rétention des calculs urinaires, en réduisant la nécrose rénale et empêchant ainsi la rétention cristalline. Il est en ressort que l'huile a pu apporter des grammes de gains +32,53 g ($p < 0,01$) et augmentation de volume urinaire ce qu'explique l'effet diurétique 27,83 ml contre 9,33 ml chez les rats normaux en maintenant les taux des paramètres biochimiques urinaires ($p < 0,01$). Les résultats des coupes histologiques témoignent sur l'effet protecteur d'huile essentielle.

Dans ce travail, le traitement des rats lithiasiques par l'extrait l'huileux permet la mise en évidence d'un effet chémoprotecteur et préventif de ces substances contre l'induction de la lithiase urinaire.

Les principaux résultats de l'analyse pharmacologique de l'huile essentielle de notre plante sélectionnée pour cette étude; (*Nigella sativa* L) montrent bien que son extrait possède un effet antilithiasique chez les rats de laboratoire.

Potentiellement, les plantes médicinales antilithiasique et antimicrobiennes peuvent offrir une large réponse au problème complexe de la lithiase rénale et des perspectives thérapeutiques pour une meilleure prise en charge. En effet, elles peuvent jouer un rôle d'adjuvant alimentaire à titre préventif, ou augmenter l'efficacité d'agents antilithiasiques oraux afin de retarder l'apparition des complications dégénératives de la pathologie. Elles permettent également de lutter contre les effets délétères, tel que le stress oxydatif et la lipopéroxydation.

Dans ce contexte, les résultats de la recherche de mécanismes d'action de ces composés montrent une activité antioxydante permettant la neutralisation des radicaux libres oxygénés générés au niveau des cellules du parenchyme rénale.

Suivant les résultats qu'on a obtenu expérimentalement, nous pouvons prédire que les huiles essentielles sont plutôt des antimicrobiennes et des agents antioxydants de première classe.

Cependant, comme le recommande l'OMS, la validation d'usage des drogues végétales comme remède traditionnel dans le traitement de la lithiase urinaire devrait passer par l'évaluation de leur efficacité, de leur innocuité et la standardisation de leur emploi. Il pourrait constituer un moyen complémentaire dans le traitement de la lithiase urinaire et introduit dans le système de soin conventionnel. En effet, les plantes médicinales se caractérisent souvent par leur teneur en plusieurs composés actifs doués de modes d'action différents.

Enfin, la mise en œuvre de plantes médicinales reste un axe de recherche majeur qui devrait s'accomplir au travers de nouvelles collaborations notamment en pharmacologie.

Annexe

Exploration étiologique de la pathologie de lithiase urinaire

1. La clinique

Elle constitue la première étape dans l'exploration, par l'interrogatoire dont nous recherchons toutes les données relatives à la maladie lithiasique urinaire (antécédents lithiasique..), enfin l'examen clinique recherche les signes de gravité, et les manifestations pouvant être en relation avec une autre co-morbidité.

2. La radiologie

Elle est nécessaire pour objectiver la maladie lithiasique urinaire, et pour le suivi.

Les moyens radiologiques les plus courants sont: la radiologie standard, la tomodensitométrie, l'échographie, et dans une moindre proportion l'imagerie par résonance magnétique.

3. La biologie

L'exploration biologique des facteurs de risques de la maladie lithiasique doit être réalisée, en externe, dans les conditions habituelles d'activité, d'alimentation et de boissons du patient.

Idéalement, le bilan métabolique est guidé par les résultats de l'analyse morpho-constitutionnelle, et est débuté six semaines après un épisode lithiasique (colique néphrétique) ou une manœuvre thérapeutique (lithotripsie).

Le bilan biologique à réaliser comporte :

Un bilan sanguin, avec :

- glycémie à jeun
- calcium
- phosphore
- créatinine
- urée
- acide urique
- parathormone(PTH) intacte
- chlore
- réserve alcaline

Un bilan urinaire, avec :

- créatinine
- urée
- acide urique
- calcium
- sodium
- volume urinaire

- densité urinaire
- bandelette urinaire (BU) et/ou étude cyto bactériologique des urines (ECBU)
- cristallurie

4. Analyse morpho-constitutionnelle

4.1. Etude de la cristallurie

La cristallurie résulte d'une sursaturation urinaire et, plus précisément, d'une rupture d'équilibre entre promoteurs et inhibiteurs de la cristallisation urinaire.

La cristallurie peut s'observer en dehors de tout contexte pathologique, toutefois, la présence de cristaux particuliers (cystine, struvite par exemple), même en absence de signes cliniques, doit orienter vers des processus pathogènes spécifiques.

L'étude de la cristallurie, se fait selon le schéma suivant :

Recueil des urines

1^{ère} urines du réveil, couvrant une longue période du nyctémère, et correspondant à une sursaturation souvent importante, conservées entre 20°C et 37°C; jamais à 4°C et examinées au laboratoire dans les 2 heures

- Préparation de l'échantillon: urine homogénéisée par retournement; en aucun cas il ne faut chercher à sensibiliser la recherche de cristaux (pas de culot de centrifugation).
- Méthode d'étude: microscope optique avec polarisation
- Protocole d'étude standard:
 - ❖ Echantillon traité dès la réception
 - ❖ Mesure du pH à 0,1 ou 0,2 unités près
 - ❖ Mesure de la densité urinaire : très utile afin de juger de la bonne répartition nyctémérale des apports hydriques
 - 0 > 1020: apports hydriques mal répartis; risque de récurrence pendant la nuit
 - 0 < 1015: idéale au réveil
 - 0 < 1012: idéale dans la journée
- Examen au microscope à polarisation après homogénéisation par retournement, pour la:
 - ❖ Détermination des espèces cristallines (et non chimiques).
 - ❖ Détermination des faciès cristallins.
 - ❖ Comptage des cristaux par espèce cristalline.
 - ❖ Mesure des tailles moyenne et maximale des cristaux (cellule de Malassez ou équivalent)
 - ❖ Comptage des agrégats.

- ❖ Mesure des tailles moyenne et maximale (agrégats).
- ❖ Calcul du coefficient d'agrégation (37. 40).

Classification morpho-constitutionnelle des calculs urinaires

Tableau 1

Classification morpho-constitutionnelle des calculs urinaires selon Daudon et al.

Type et sous-type morphologiques	Composants chimiques		Aspect morphologique	Interprétation clinique
	Périphérie	Section		
I				
Ia	Whewellite	Mamelonné, ombilication, plaque de Randall. Brun généralement foncé	Concentrique à cristallisation radiale, brun foncé	Hyperoxalurie intermittente, Cacchi Ricci
Ib	Whewellite	Rugueux, mamelonné, mamelons souvent cassés, voire creux. Pas d'ombilication. Brun foncé à brun noir	Inorganisé, parfois lacunaire. Brun foncé	Hyperoxalurie avec stase urologique, hyperoxalurie ancienne
Ic	Whewellite	Lisse bourgeonné, couleur crème	Cristaux prismatiques plus ou moins soudés, inorganisé. Brun clair à crème	Oxalose, hyperoxalurie primaire
Id	Whewellite	Lisse, brun, jaune	Concentrique en très fines couches sans cristallisation radiale	Hyperoxalurie avec confinement anatomique souvent lié à des anomalies morphologiques des voies urinaires
Ie	Whewellite	Localement bourgeonnante, mamelonnée ou rugeuse. Brun jaune clair à brun	Localement inorganisée ou à structure radiale. Brun jaune clair à brun	Hyperoxalurie avec stase urologique, hyperoxalurie ancienne Hyperoxalurie absorptives, pathologies intestinales inflammatoires (maladie de Crohn et/ou résection de l'intestin grêle), diarrhées graisseuses
II				
IIa	Weddellite	Cristaux bipyramidaux brillants aux angles vifs. Brun clair, jaune	Cristallisation radiale lâche. Brun, jaune clair	Hypercalciurie
IIb	Whewellite et weddellite	Cristaux épais et termes aux angles émoussés, beige crème	Inorganisé, brun, jaune	Hypercalciurie intermittente et hyperoxalurie
IIc	Weddellite	Rugueux, beige à jaune	Concentrique en périphérie mais inorganisé au centre. Brun, jaune plus ou moins foncé	Hypercalciurie avec stase
III				
IIIa	Acide urique anhydre	Lisse ou très peu bosselé. De beige à orange	Concentrique à cristallisation radiale. Ocre à rouge	Hyperuricurie intermittente avec pH urinaire acide
IIIb	Acide urique anhydre et dihydraté	Rugueux, poreux. Crème à brun rouge	Inorganisé, compacte. Orange à rouge	Hyperuricurie, pH urinaire acide
IIIc	Urates	Rugueux, poreux. Crème à brun	Inorganisé, compacte. Gris à brun	Hyperuraturie et alcalinisation thérapeutique
IIId	URAM	Rugueux, poreux. Gris à brun	Inorganisé. Gris à brun	Avec phosphates : diarrhées infectieuses ou iatrogènes avec carence phosphorée et hyperuricurie Avec struvite : hyperuricurie + infection urinaire à germes uréasiques Avec acide urique : alcalinisation thérapeutique
IV				
IVa1	Carbapatite	Rugueux, bosselé. Blanc à beige	Friable, concentrique. Blanc à beige	Infection urinaire, hypercalciurie, hyperparathyroïdie primaire, acidose tubulaire secondaire
IVa2	Carbapatite et protéines	Bosselé, craquelé, vermissé, brun jaune	Concentrique en couches de couleurs alternées, blanc et brun	Troubles de l'acidification rénale (acidose d'Albright, Sjögren, Cacchi Ricci)
IVb	Carbapatite, struvite et URAM	Bosselé, rugueux avec des dépôts blancs à brun foncé	Concentrique en couches de couleurs alternées, blanc et brun	Infection urinaire avec alcalinisation
IVc	Carbapatite et struvite	Cristaux soudés aux angles peu vifs, blanc	Lâche, concentricité et structure radiale floue blanchâtre	Infection urinaire à germes uréasiques
IVd	Brushite	Rugueux ou pommelé, légèrement translucide. Crème à beige	Concentrique radiale. Crème à grège	Hypercalciurie, hyperparathyroïdie, hyperphosphaturie
V				
Va	Cystine	Granuleux ou bosselé, creux, translucide brun à jaune	Radiale, grossier. Jaune à brun clair	Cystinurie
Vb	Cystine et carbapatite	Plus ou moins lisse. Crème à jaune	Finement concentrique, jaune au centre et blanchâtre en périphérie	Cystinurie traitée par alcalinisation
VI				
VIa	Protéines et phosphates	Souvent mou, lisse. Blanc à brun	Inorganisé, brun à blanchâtre en condensation variable	Pyélonéphrite
VIb	Protéines et divers constituants	Rugueux, écaillé. Brun à noir	Feuilleté, friable. Brun à noir	Lithiases médicamenteuses et sécrétion de protéines tubulaires
VIc	Protéines et whewellite	Lisse. Brun noir	Inorganisé ou composé d'une couche protéique, contenant des éléments cristallins brun noir	Dialyse



Figure 1 : Section inorganisée brune résultant d'une conversion progressive de weddellite en whewellite (type IIb). Calcul composé de whewellite (80 %), de weddellite (15 %) et de carbapatite (5 %)



Figure 2 : Section concentrique diffuse. Calcul de composition mixte : carbapatite au centre, cystine en périphérie



Figure 3 : Section radiale diffuse brun-jaune plus ou moins clair. Calcul de type IIa composé de weddellite (90 %), whewellite (8 %) et carbapatite (2 %)



Figure 4 : Section concentrique compacte. Ce calcul vésical d'acide urique anhydre de couleur orangée contient des couches bleues qui marquent la prise d'antiseptiques urinaires à base de bleu de méthylène



Figure 5 : Calcul de type Ia, mamelonné, brun foncé, présentant une ombilication papillaire et développé à partir d'un moule tubulaire de carbapatite beige



Figure 6 : Calculs multiples à surface presque lisse de couleur beige à brun correspondant à des faces d'accolement résultant du frottement de plusieurs calculs les uns contre les autres. Composition : whewellite



Figure 7 : Calcul coralliforme



Figure 8 : Calcul d'indinavir

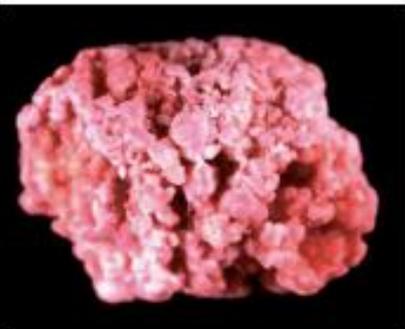


Figure 9 : Calcul pur de N-acétylsulfadiazine de morphologie et de couleur caractéristiques



Figure 10 : Calcul d'amoxicilline