

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

BENZAZA Khadidja

CHERIET Siham

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité: Biotechnologie et Valorisation des Plantes

THÈME

**Contribution à l'étude phytochimique et à
l'évaluation de quelques activités biologiques des
extraits des graines de *Nigella sativa* L.**

DEVANT LE JURY

Présidente	Mme HAMMADI K.	Grade Pr	U. Mostaganem
Examinatrice	Mme BELABED S.	Grade MCB	U. Mostaganem
Promotrice	Mme BELARBI A.	Grade MCA	U. Mostaganem

Année Universitaire : 2021/2022

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions le bon Dieu tout puissant de nous avoir donné la santé et la patience pour réaliser ce travail.

*Nos remerciements vont particulièrement à notre encadreur Dr **BELARBI Amaria**, pour avoir accepté de nous encadrer ainsi que pour ses précieux conseils et orientations, sa disponibilité, sa gentillesse, sa modestie et pour l'intérêt bienveillant manifesté pour notre travail.*

*Nous voulons exprimer ici, notre respectueuse gratitude à **Pr HAMMADI K.** d'avoir accepté de présider ce jury.*

*Nous tenons également à adresser nos vifs remerciements à **Dr BELABED S.**, pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.*

Nous remercions profondément, enfin, tous les enseignants relevant du département de "Biologie", Ainsi que tous ceux et celles qui nous ont aidés de près ou de loin dans la réalisation de ce modeste Mémoire.

Veillez accepter, l'expression de nos sentiments d'estime, et soyez rassurés de notre profonde gratitude et de notre profond respect.

Dédicace

Je tiens à dédier ce modeste travail d'abord :

*A Mes très chers parents qui m'ont accompagné dans
chaque pas dans ma vie, qui m'ont encouragée et soutenu.*

*J'espère qu'ils trouvent dans ce travail
l'expression de ma gratitude.*

A mes chers sœurs

*A mon encadreur Mme BELARBI AMARIA, d'avoir
acceptée de suivre mon mémoire et pour son
attention particulière qu'elle m'a donné au
cours de l'année .Merci Beaucoup*

Je ne pourrai jamais oublier d'exprimer ma profonde gratitude à:

Ma chère grande mère :Benzaza fatima zohra

Mon cher grand père : Benzaza khelil

Ma chère amie : Bakreti dehiba

Et à tous ceux qui m'ont aidé ou encouragé tout au long de mes études

A mon binôme siham.

Khadija

Dédicace

Grace à dieu tout puissant, Je dédie ce modeste travail à :

*Mes très chers **parents** qui m'ont toujours aidé tout au long de mon travail, que **DIEU** me les garde et protège.*

J'espère qu'ils trouvent dans ce travail l'expression de ma gratitude.

A ma chère sœur Souhila et son marie Houari.

A Mes chers frères Ahmed et Abderrahmane.

A Mes nièces Aïcha et Alaa.

A mes grands parents Djilali et Ahmed.

A toutes les familles qui portent le nom Cheriet et Zenati.

A tous ceux qui m'ont aidé ou encouragé tout au long de mes études

A mon binôme Khadidja.

A tous ceux qui m'ont aidé ou encouragé tout au long de mes études.

Síham.

Table des matières

Dédicace	
Remerciement	
Résumé	
Abstract	
المخلص	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	

PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction générale.....	01
----------------------------	----

Chapitre I . Généralités sur *Nigella Sativa* L.

1. Etymologie.....	03
2. Histoire de <i>Nigella sativa</i> L.....	03
3. Description botanique	04
4. Systématique	05
5. Culture de <i>Nigella sativa</i> L.....	06
6. Composition chimique des graines de <i>Nigella Sativa</i> L.....	06
5.1. Lipides et stérols	07
5.2. Composés aromatiques.....	08
5.3. Saponosides	08
5.4. Polyphénols et flavonoïdes	09
5.5. Protéines	09
5.6. Alcaloïdes	10
5.7. Vitamines et sels minéraux.....	11
7. Usage à travers le monde	11
6.1. Usage culinaire.....	11
6.2. Médecine traditionnel	12
8. Activités biologiques et propriétés pharmacologiques de <i>Nigella sativa</i> L.....	13
8.1. Activité antioxydante.....	13
8.1.1. Études <i>In Vitro</i>	13
8.1.2. Études <i>In Vivo</i>	14
8.2. Propriétés anti-allergiques.....	14
8.3. Activité anti-inflammatoire et analgésique.....	15
8.4. Propriétés immunomodulatrices.....	15
8.5. Propriétés anti-infectieuses.....	15
8.5.1. Propriétés antibactériennes.....	15
8.5.1. Propriétés antifongiques.....	16
8.5.2. Propriétés antivirales.....	16
8.5.3. Propriétés antiparasitaires.....	16
8.5.4. Propriétés antidiabétiques.....	17
8.6. Propriétés cardiovasculaires.....	17
8.7. Propriétés gastro-intestinales.....	18
8.8. Propriétés antihépatotoxiques, hépatoprotectrices et antinéphrotoxiques...	18
8.8.1. Action de protection hépatique.....	18
8.8.2. Action sur les reins.....	18
8.9. Propriétés neurologiques.....	18
8.10. Propriétés sur les fonctions de reproduction et de fertilité.....	19
8.11. Propriétés antitumorales.....	19
9. Toxicité de <i>Nigella sativa</i> L.....	19

Chapitre II. Activités biologiques

1. Activité antioxydante	20
1.1. Stress oxydant.....	20
1.2. Radicaux libres.....	20
1.2.1. Origine des radicaux libre.....	21
1.2.2. Production des radicaux libre.....	21
1.2.2.1. Production endogène	21
1.2.2.2. Production exogène.....	22
1.3. Espèces réactives de l'oxygène.....	23
1.3.1. Radical superoxyde	23
1.3.2. Peroxyde d'hydrogène	23
1.3.3. Radical hydrogène	24
1.3.4. Oxygène singlet.....	24
1.4. Conséquences biochimiques et biologiques du stress oxydant.....	24
1.5. Type des antioxydants.....	26
1.5.1. Antioxydant enzymatique	26
1.5.2. Antioxydant non-enzymatique	28
1.5.3. Antioxydants synthétiques	32
1.6. Amplification pathologique d'ERO	33
1.7. Mécanisme d'action des antioxydants.....	34
2. Activité antibactérienne.....	35
2.1. Définition	35
2.2. Souches bactériennes étudiées	36
2.2.1. Famille des <i>Enterobacteriaceae</i>	36
2.2.1.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	36
2.2.1.1.1. Classification.....	37
2.2.1.1.2. Habitat	37
2.2.1.1.3. Pouvoir pathogène	37
2.2.2. Famille de <i>Pseudomonadaceae</i>	38
2.2.2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
2.2.2.1.1. Classification.....	39
2.2.2.1.2. Habitat	39
2.2.2.1.3. Pouvoir pathogène	39
2.2.3. Famille des <i>Staphylococcaceae</i>	40
2.2.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	40
2.2.3.1.1. Classification.....	40
2.2.3.1.2. Habitat	40
2.2.3.1.3. Pouvoir pathogène	41
2.2.4. Famille des <i>Enterococcaceae</i>	41
2.2.4.1. <i>Enterococcus faecalis</i>	41
2.2.4.1.1. Classification.....	41
2.2.4.1.2. Habitat	41
2.2.4.1.3. Pouvoir pathogène	42
2.3. Définition de l'Activité antibactérienne.....	42
2.4. Technique d'évaluation de l'activité antibactérienne.....	43

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

Chapitre I : Matériels et Méthodes

1. objectif	44
2. Matériel végétal.....	44
3. Micro-organismes utilisés dans les tests antibactériens.....	44
4. Matériels et produits de laboratoire.....	45
5. Préparation des extraits Méthanolique et Aqueux à partir des graines.....	45
5.1. Broyage et tamisage.....	45
5.2. Extraction méthanolique	46
5.2.1. extraction méthanolique par soxhlet	46
5.2.1.1. Rendement d'extrait méthanolique	47
5.2.2. Extraction méthanolique par macération	47
5.3. Extraction aqueuse	48
6. Analyse des extraits MET et AQ des graines du <i>Nigella sativa</i> L	48
6.1. Analyse qualitative des extraits MET et AQ.....	48
6.1.1. Test des composés phénoliques.....	48
6.1.2. Caractérisation des Flavonoïde.....	49
6.1.3. Caractérisation des Tannins.....	49
6.1.3.1. Différentiation des tannins.....	49
6.1.4. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	50
6.2. Analyse quantitative des extraits MET et AQ	52
6.2.1. Dosage des composés phénoliques.....	52
6.2.2. Dosage des flavonoïdes.....	53
7. Activités biologiques	54
7.1. Activité antioxydante.....	54
7.1.1. Effet scavenger du radical DPPH.....	54
7.2. Activité antimicrobienne	55
7.2.1. Préparation et Choix des milieux de culture	55
7.2.1.1. Préparation du milieu de culture.....	55
7.2.1.2. Stérilisation du matériel	56
7.2.1.3 préparations des dilutions d'extraits de <i>Nigella sativa</i> L....	56
7.2.1.4. Préparation de l'inoculum.....	57
7.2.3. Étude de l'activité d'un principe actif sur une souche bactérienne.....	58
7.2.3.1. Préparation des disques.....	58
7.2.3.2. Ensemencement et dépôt des disques.....	58
7.2.3.3. expressions des résultats	59

...

Chapitre II : Résultat Et Discussions

1. détermination du rendement d'extrait aqueux et méthanolique des graines de <i>Nigella sativa</i> L.	60
2. Analyse des extraits aqueux et méthanolique des graines de <i>Nigella sativa</i> L.....	61
2.1. Analyse qualitative de l'extrait AQ et MET.....	61
2.1.1. Tests préliminaires	61
2.1.2. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	67
2.2. Analyse quantitative de l'extrait AQ et MET.....	69
2.2.1. Dosage polyphénols.....	69
2.2.2. Dosage Flavonoïdes	70
3. Activités biologiques des extraits	71
3.1. Activités antioxydantes.....	71
3.1.1. Effet scavenger du radical DPPH	71
3.2. Activité antibactérienne des extraits méthanolique (MET□ et MET□) et aqueux (AQ)	73

Conclusion Générale.....	78
--------------------------	----

Références Bibliographiques	80
-----------------------------	----

ANNEXES

Résumé

La Nigelle est une plante aromatique très utilisée en médecine traditionnelle en Algérie, elle présente de nombreux principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques.

Dans la présente étude, les extraits méthanolique et aqueux des graines de *Nigella Sativa* L. ont été étudiés pour quantifier leurs teneurs en polyphénols et en flavonoïdes en utilisant le Folin-Ciocalteu et $AlCl_3$, respectivement. De plus, l'activité antioxydante est également testée par la méthode de la réduction du radical DPPH. En outre, le pouvoir antibactérien de ces extraits a été étudié par la méthode de diffusion en milieu solide, sur des souches bactériennes de références.

L'analyse qualitative de ces extraits par les tests préliminaires a révélé la présence des composés phénoliques, les tannins et les flavonoïdes ; ceci est confirmé par une analyse quantitative basée sur le dosage des ces derniers.

L'analyse qualitative de ces trois extraits par CCM a révélé la présence de nombreux constituants parmi lesquels : l'acide gallique, le quercétine et vanilline.

Nous avons tenté sur l'analyse de ces extraits qui ont révélé la richesse l'extrait AQ et METI et METII en composés phénoliques ce qui confirme les résultats du dosage des polyphénols par la méthode de Folin-Ciocalteu, où les teneurs sont respectivement : 2.35, 0.058 et 0.82 μg EAG/mg et en flavonoïdes avec des teneurs de 0.211, 1.29 et 0.322 $\mu\text{g}/\text{mg}$. De même, l'évaluation quantitative du pouvoir antioxydant de ces extraits, confirme que l'extrait méthanolique par macération a montré une meilleure activité antiradicalaire inhibitrice de DPPH• avec la plus faible IC_{50} (14.71 $\mu\text{g}/\text{ml}$) suivi de l'extrait méthanolique par soxhlet (IC_{50} 33.82 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et de l'extrait aqueux avec IC_{50} (80.75 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Concernant l'activité antimicrobienne, les extraits méthanolique et aqueux des graines de *Nigella Sativa* L. ont présenté un effet antimicrobien apprécié en inhibant la croissance des différentes souches pathogènes (*Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*). Tandis que, aucun effet antibactérien na été révélé chez les souches (*Klebsiellapneumoniae* et *Enterococcus faecalis*).

Tous ces résultats mettent en valeur les différentes applications thérapeutiques de cette plante dans la médecine traditionnelle et encourage la recherche de nouvelles molécules naturelles à caractères antioxydant et antibactérien dont le but de les investir dans les différentes industries : pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires, etc.

Mots clés : *Nigella Sativa* ; Extraits Aqueux ; Extraits Méthanoliques ; Composés phénoliques, flavonoïdes, tannins, activité Antioxydante, activité Antibactérienne.

Abstract

Nigella is an aromatic plant widely used in traditional medicine in Algeria, it presents many active principles known by their therapeutic properties.

In the present study, methanolic and aqueous extracts of *Nigella Sativa* L. seeds were studied to quantify their polyphenol and flavonoid contents using Folin-Ciocalteu and AlCl₃, respectively. In addition, the antioxidant activity is also tested by the DPPH radical reduction method. In addition, the antibacterial power of these extracts was studied by the solid-state diffusion method, on reference bacterial strains.

The qualitative analysis of these extracts by the preliminary tests revealed the presence of phenolic compounds, tannins and flavonoids; this is confirmed by a quantitative analysis based on the dosage of the latter.

The qualitative analysis of these three extracts by TLC revealed the presence of numerous constituents among which: gallic acid, quercetin and vanillin.

We tried on the analysis of these extracts which revealed the richness of the extract AQ and METI and METII in phenolic compounds which confirms the results of the dosage of polyphenols by the method of Folin-Ciocalteu, where the contents are respectively: 2.35, 0.058 and 0.82 µg EAG/mg and in flavonoids with contents of 0.211, 1.29 and 0.322 µg/mg. Similarly, the quantitative evaluation of the antioxidant power of these extracts, confirms that the methanolic extract by maceration showed better DPPH-inhibitory antiradical activity with the lowest IC₅₀ (14.71 µg/ml) followed by the methanolic extract by Soxhlet (IC₅₀ 33.82 µg/ml) and the aqueous extract with IC₅₀ (80.75 µg/ml).

Regarding the antimicrobial activity, the methanolic and aqueous extracts of *Nigella Sativa* L. seeds showed an appreciated antimicrobial effect by inhibiting the growth of different pathogenic strains (*Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*). While, no antibacterial effect was revealed in the strains (*Klebsiella pneumoniae* and *Enterococcus faecalis*).

All these results highlight the different therapeutic applications of this plant in traditional medicine and encourage the search for new natural molecules with antioxidant and antibacterial properties, with the aim of investing them in different industries: pharmaceutical, cosmetic, food, etc.

Key Words: *Nigella Sativa* ; Aqueous Extract ; Methanol Extract; Phenolic Compound ; Flavonoids ; Tannins ; Antioxidant Activity ; Antimicrobial Activity.

الحبة السوداء هي نبات عطري يستخدم على نطاق واسع في الطب التقليدي في , ويحتوي العديد من المكونات النشطة المعروفة بخصائصها العلاجية.

هذه الدراسة تمت دراسة المستخلصين الميثانولي البولي فينول والفلافونويد باستخدام AICI3 Folincioaltea . حبة البركة لتقدير محتوياتها من لك يتم أيضا اختبار .
ضاد للأكسدة عن طريق التقليل الجدي DPPH .
للبيكتيريا لهذه المستخلصات من خلال طريقة الانتشار في وسط صلب على سلالات بكتيرية مرجعية.

أظهر التحليل النوعي لهذه المستخلصات من خلال الاختبارات الأولية وجود المركبات الفينولية باغ والفلافونويدات . يتم تأكيد ذ التحليل الكمي على أساس جرعة هذ لأخير .

كشف التحليل النوعي لهذ تة بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة عن وجود العديد حمض الغاليك والكيرسيتين والفانيلين .

حاولنا تحليل هذه الفينولية مما يؤكد نتائج اختبار البولي فينول بطريقة Folin-Ciocaltea حيث كانت المحتويات على التوالي :
0.82 0.058 2.35 :ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك/مليغرام وفي مركبات الفلافونويد بمحتويات
0.322 1.29 0.211 ميكروغرام / .

وبالمثل يؤكد التقييم الكمي لهذه المستخلصات أن المستخلص الميثانولي عن طريق النقع أظهر نشاطا أفضل لمضادات الأكسدة التي تثبط DPPH مع أدنى تركيز
IC50 (14.71 ميكروغرام /) يليه المستخلص الميثانولي بواسطة soxhlet (IC50
33.82 ميكروغرام /) (IC50 80.75 يكوغرام /) .

فيما يتعلق بالنشاط المضاد للميكروبات فقد قدمت المستخلصات المائية والميثانولية اتيرا
كبيراً مضاداً للميكروبات من خلال تثبيط نمو السلالات المرصدة المختلفة ((
ية هبية) بينما لم يظهر أي تأثير مضاد للجراثيم (لكبسيلة لرئوية
ية) لمعوية

هذه النتائج تسلط الضوء على التطبيقات العلاجية المختلفة لهذا النبات في الطب التقليدي وتشجع البحث عن جزيئات طبيعية جديدة ذات خصائص مضادة للأكسدة ومضادة للبيكتيريا والتي تهدف إلى استثمارها في الأدوية مستحضرات التجميل .

الكلمات المفتاحية : المستخلص الميثانولي المركبات الفينولية الفلافونويد

النشاط المضاد للميكروبات

Liste des tableaux

Tableau 01 : Composition des graines de <i>Nigella sati</i>	07
Tableau 02 : composition d'acide gras de l'huile végétal de <i>nigella sativa L.</i>	07
Tableau 03 : Répartition en acides aminés des protéines de graines de <i>Nigella sativa</i>	10
Tableau 04 : Principaux radicaux libres et leurs formules chimique	20
Tableau 05 : Les principales maladies liées à la production des radicaux libres	34
Tableau 06 : Références des souches bactériennes utilisées.	44
Tableau 07 :Différentes concentrations utilisées pour préparation des dilutions.	56
Tableau 08 : Souches bactériennes testées.	57
Tableau 09 : Résultats des tests préliminaires de quelques métabolites secondaires de l'extrait METII de <i>Nigella sativa L</i>	61
Tableau 10 : Colorations obtenues par le criblage sur l'extrait METII	62
Tableau 11 : Résultats des tests préliminaires de quelques métabolites secondaires de l'extrait METI de <i>Nigella sativa L.</i>	63
Tableau 12 : Colorations obtenues par le criblage sur l'extrait METI	64
Tableau 13 : Résultats des tests préliminaires de quelques métabolites secondaires de l'extrait AQ de <i>Nigella sativa L.</i>	65
Tableau 14 : Colorations obtenues par le criblage sur l'extrait AQ	66
Tableau 15 : Rapports frontaux des spots issus de la séparation des deux extraits aqueux (AQ) et méthanolique (METI et METII) des graines de <i>Nigella sativa</i> ainsi que ceux des témoins utilisés	68
Tableau 16 : Teneur en polyphénols totaux dans les extrais des graines de <i>Nigella sativa L</i>	69
Tableau 17 : Teneur en polyphénols totaux dans les extrais des graines de <i>Nigella sativa L.</i>	70

Tableau 18 : Activité antiradicalaire des extraits des graines de <i>Nigella sativa</i> L.	72
Tableau 19: Diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne (en mm) obtenus par différentes concentrations dans l'extrait METI.	73
Tableau 20: Diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne (en mm) obtenus par différentes concentrations dans l'extrait METII.	74
Tableau 21: Diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne (en mm) obtenus par différentes concentrations dans l'extrait aqueux	75

Liste des figures

Figure 01 : Aspect morphologique de la plante <i>Nigella sativa</i> L	05
Figure 02 : Représentation chimique de la thymoquinone et de ses dérivés retrouvés dans l'huile essentielle de <i>N. sativa</i>	08
Figure 03 : Structure chimique des principaux alcaloïdes de <i>N. sativa</i> L.	11
Figure 04 : Composition du mélange d'épices de Panchphoron	12
Figure 05 : Production de l'anion radicalaire superoxyde (O^{2-}) par respiration	21
Figure 06 : Principales voies de formation des espèces réactives de l'oxygène.	23
Figure 7 : Produit de l'oxydation de la base de l'ADN, la guanine.	26
Figure 08 : Schéma de défenses antioxydantes enzymatiques	27
Figure 9 : Structure chimique de la vitamine C.	28
Figure 10 : Structure chimique de l' α -tocophérol.	29
Figure 11 : Structure de base des flavonoïdes.	30
Figure 12 : Structures chimiques des tannins.	31
Figure 13 : Structures chimiques de quelques coumarines.	32
Figure 14 : Structure chimique d'un polyphénol de synthèse.	32
Figure 15 : Structure chimique d'un polyphénol de synthèse.	33
Figure 16 : Mécanisme d'action d'un antioxydant donneur d'hydrogène comme le tocophérol.	35
Figure 17 : Formes principales de la bactérie.	35
Figure 18 : Aspect microscopique (Coloration de Gram) de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	36
Figure 19 : Aspect macroscopique des colonies de <i>Klebsiella pneumoniae</i> sur milieu gélosé	38
Figure 20 : Aspect microscopique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (G x 2400)	39
Figure 21 : Aspect microscopique de <i>Staphylococcus aureus</i> .	41
Figure 22 : Aspect microscopique d' <i>Enterococcus faecalis</i> en Microscopie Electronique à Balayage (MEB)	42
Figure 23 : Graines de <i>Nigella sativa</i> L.	44
Figure 24 : Broyage des graines de <i>Nigella sativa</i> .	45
Figure 25 : Préparation de l'extrait méthanolique par Soxhlet	46
Figure 26 : Préparation de l'extrait méthanolique par macération.	47
Figure 27 : Préparation de l'extrait aqueux.	48
Figure 28 : Test des composés phénoliques	49
Figure 29 : Test de différenciation des tanins	50

Figure 30 : Chromatographie sur couche mince	51
Figure 31 : Méthode de calcul le rapport frontal	51
Figure 32 : Révélation par solution de DPPH.	51
Figure 33 : Différentes concentrations d'acide gallique	52
Figure 34 : Différentes concentrations quercétine	53
Figure 35 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH	54
Figure 36 : Test de l'activité antiradicalaire de l'extrais des graines de <i>Nigella sativa</i> L.	55
Figure 37 : Différentes dilutions de l'extrait de <i>Nigella sativa</i> L.	56
Figure 38 : Ensemencement des bactéries.	58
Figure 39 : Dépôt des disques.	59
Figure 40 : Rendement des extraits aqueux et méthanoliques des graines de <i>Nigella sativa</i> L.	60
Figure 41 : Chromatographie sur couches minces des extraits de graines des <i>Nigella sativa</i> L.	68
Figure 42 : Activité antiradicalaire des extraits des graines de <i>Nigella sativa</i> L.	71
Figure 43 : Observation de zones d'inhibition (en mm) de l'extrait METI sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	74
Figure 44 : Observation de zones d'inhibition (en mm) de l'extrait METII sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	75
Figure 45 : Observation des zones d'inhibition (en mm) de l'extrait aqueux sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	76
Figure 46 : Observation des zones d'inhibition (en mm) de l'extrait aqueux sur <i>Staphylococcus aureus</i>	76

Liste des abréviations

Abs : Absorbance.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

AlCl₃ : Trichlorure d'aluminium.

APR : Pouvoir antiradicalaire.

AQ : aqueux.

BMH : bouillon Mueller Hinton.

CAT : Catalase.

CCl₄ : tétrachlorométhane.

ClO⁻ : hypochlorite.

CMI : La concentration minimale inhibitrice.

COX : cyclooxygénase.

DL50 : dose létale artériel.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

DO : Densité Optique.

DPPH : diphényl picryl-hydrate.

EAG/mg d'extrait : Equivalent Acide Gallique/miligramme d'extrait.

ERO : espèces réactives de l'oxygène.

Fe²⁺: Ions Ferreux.

Fe³⁺: Ions Ferriques.

FeCl₂ : chlorure de fer.

FeCl₃ : Le chlorure ferrique.

g : gramme.

GC-MS : chromatographie en phase gazeuse spectrométrie de masse.

GPx : Glutathion peroxydase.

GR : glutathion réductase.

h : heure.

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène.

HTA : L'hypertension artérielle.

HCL : Acide Chlorhydrique.

HO• : Hydroxyle.

IC50: Concentration inhibitrice a 50%.

IFN- : Interféron gamma.

Ig-E : Immunoglobuline E.

LOX : lipoxygenase.

MET : Méthanolique.

METI : Extrait méthanolique par soxhlet.

METII : Extrait méthanolique par macération.

Mg : Magnésium.

Min : minute.

Mm : millimètre.

NK : naturel killer.

NS : *Nigella sativa*.

O₂ - : anion superoxyde.

OH : hydroxyle.

OMS: Organisation Mondiale de la Santé.

SOD : Superoxyde dismutase.

µg EAG/mg d'extrait : équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait.

µg EQ/mg d'extrait : microgramme Equivalent Quercétine/ milligramme d'extrait.

µL : microlitre.

µm : micromètre.

% : pourcentage.

°C : degré celsius.

Introduction

Les plantes ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines grâce à leurs richesses en composants des valeurs thérapeutiques. Le pouvoir de guérison des plantes provient des effets de leurs métabolites secondaires. Ces métabolites interviennent dans la défense contre les parasites pathogènes. On distingue plusieurs groupes de métabolites notamment les phénols (simples phénols, acides phénoliques, flavonoïdes, tannins et coumarines) **(Khadhri, 2013)**.

En effet, l'organisation mondiale de la santé (OMS) estime en 2002 que, pour se soigner, 80% de la population recourt toujours à la médecine traditionnelle pour laquelle la majeure partie des thérapies implique l'exploitation des principes actifs des plantes. Ces espèces végétales de grande utilité pour la santé des populations méritent d'être étudiées afin de justifier et valider scientifiquement leur usage pour une meilleure utilisation **(Ennadir et al., 2014)**. Le traitement des infections bactériennes est en général basée sur l'utilisation des antibiotiques et la fréquence élevée des bactéries résistantes aux antibiotiques complique la conduite thérapeutique de cette pathologie, et justifie d'une part d'une évaluation de l'efficacité de ces médicaments et d'autre part la recherche de nouvelles molécules antimicrobiennes. Parmi les sources prometteuses de molécules bioactives, les plantes médicinales **(Peyramaure, 2008)**.

Nigella sativa est l'une des plantes médicinales la plus utilisée à travers le monde. Depuis plus de 2000 ans, cette plante a été employé comme remède naturel au Moyen-Orient et en Extrême-Orient, et plus particulièrement chez les musulmans influencés par la parole prophétique «*Soignez-vous en utilisant la graine de nigelle, c'est un remède contre tous les maux à l'exception de la mort...*» **(Tariq, 2008)**.

Nigella sativa L. (*Ranunculaceae*), communément appelée nigelle cultivée, est une plante annuelle, traditionnellement utilisée depuis des millénaires à des fins culinaires et médicinales dans les pays arabes, dans le sous-continent indien et en Europe. C'est un remède naturel pour de nombreuses pathologies, notamment pour le traitement de l'asthme, de l'inflammation, de la toux, de l'eczéma et des états grippaux. L'huile issue de la graine est employée comme diurétique, carminatif, cholagogue et vermifuge **(Ghedira, 2010)**.

Les extraits de ses graines sont largement utilisés dans la médecine traditionnelle pour traiter les troubles bronchopulmonaires et gastro-intestinaux, et contre plusieurs pathologies notamment comme antidiabétique, antihypertenseur, anti-inflammatoire et antimicrobiennes. Des dizaines d'études ont été réalisées sur la composition chimique de ces graines en corrélation avec leurs propriétés pharmacologiques. Ces recherches ont confirmé *In Vivo* comme *In Vitro* les propriétés pharmacologiques (anti-inflammatoire, antioxydante antidiabétique, anticancéreuse,

antimicrobienne, etc.) des différents extraits de ces graines et ont montré que parmi les principes actifs responsables de ces activités pharmacologiques sont les huiles essentielles (**Tariq, 2008**).

Dans le cadre de notre mémoire, nous apporterons une l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antibactérienne et antioxydants des graines de *Nigella sativa* L. Pour cela, notre travail sera développé selon le plan suivant:

Etude bibliographique nous reportons une série de deux chapitres :

Dans le premier chapitre de ce manuscrit, nous avons présenté un rappel bibliographique qui englobe et rassemble des données théoriques sur les plante médicinale *Nigella sativa* L. et leurs substances bioactives ;

Le deuxième chapitre portera sur le problème du stress oxydant, son origine, et ses graves conséquences sur la santé humaine. Ainsi qu'une étude bibliographique sur quelques activités biologiques (antibactériennes et antioxydants).

Une seconde partie, décrit d'une manière objective le matériel et les méthodes utilisées pour répondre à diverse hypothèses expérimentales posées. Elle même est présentée sous forme de deux volets :

Une étude phytochimique des extraits méthanoliques et aqueux des graines de *Nigella sativa* L. et une étude des activités antioxydantes et une évaluation du potentiel antibactérien de ces extraits, par la méthode de diffusion des disques sur un milieu de culture solide.

Une dernière partie enfin a été orientée à la discussion des résultats expérimentaux obtenus.

Enfin, nous présenterons une conclusion générale de ce travail avec des perspectives de recherche développement.

PREMIERE PARTIE :
SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

1. Etymologie

Les grecs nommaient *Nigella sativa* « μελανθιον » melanthion, de « melas » qui veut dire noir et « anthos » fleur, donc l'étymologie tire du même attribut (**Dioscorides, 2002**). *Nigella sativa* L. est connue sous différents noms ; en arabe elle est nommée comme "Habbah Sawda" ou "Habbat el Baraka". En Inde, elle est appelée "*Kalonji*" tandis qu'en Chine elle est connue comme "Hak Jung Chou" (**Adel et al., 2013**), et en vieux Latin, elle était connue sous le nom de *Panacea* (qui guérit tout) ou aussi "*mecon agria melana*". En hébreux, elle est "*Kezah*". Dans la Bible, selon les différentes éditions, on la retrouve sous les noms de Cumin noir curatif, Nielle, Aneth, Vesce et AchChawnîz (**kokdil et al., 2006 ; Toparslan, 2012**).

2. Histoire de *Nigella sativa* L.

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 (**Dioscorides, 2002**).

La première référence à la Nigelle se trouve dans le livre d'Isaïe dans l'Ancien Testament où il est écrit que la sagesse du cultivateur sachant planter et battre ses semences (Nigelle, Cumin, Blé, Orge et Millet) selon l'exigence de l'espèce, est à l'image de la sagesse de Dieu dans la conduite de son peuple mémoire (**Orsi-Llinares, 2005**).

La nigelle est utilisée depuis la nuit des temps surtout chez les Egyptiens ainsi que les arabes et les indiens. A l'arrivée de l'islam, cette utilisation est devenue beaucoup plus accentuée au niveau de la communauté musulmane en se référant à la parole du prophète (*Hadit Nabawi*) en disant : « Soignez-vous en utilisant la graine noire, car elle contient un remède pour toutes les maladies à l'exception de celle qui est toxique, donc équivaut la mort (**Semmar et Bensikhelifa, 2017**).

N. sativa fut utilisée dans la médecine empirique jusqu'à l'apparition de la médecine actuelle héritée des civilisations précédentes (grecque, hindoue, chinoise, etc.). Les médecins arabomusulmans se sont intéressés à elle, comme le célèbre médecin Avicenne (Ibn Sina 980-1037) (**Karrandou, 2016**).

La civilisation gréco-romaine a également excellé en terme de thérapie par les plantes, notamment grâce à Hippocrate (460-377 Avant J-C.), surnommé le père de la médecine. Son Corpus Hippocraticum, un ensemble de textes, mentionne près de 400 remèdes à base de plantes dont la nigelle (**Chamseddine, 2006**).

Selon certaines sources, l'huile de Nigelle 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 (Saidi,2012).

3. Description botanique

Nigella sativa L., communément appelée nigelle cultivée est une plante herbacée, annuelle qui appartient à la famille « ranunculaceae », elle est connue sous différents noms "Cumin noir" en français "Black cumin" en anglais, "Kalonji" et "Sanoudj", "habbet es souda" et "habbet el baraka" dans presque tous les pays arabes (Beloue, 1998 ; Akhram Khan, 1999).

Cette plante est caractérisée par sa tige dressée côtelée, anguleuse et rameuse, de 60 cm de hauteur (Benyoussef *et al.*, 2001). Ses feuilles vertes, brillantes sont basales et caulinaires, alternes, bi à tri pennatiséquées, composées de segments linéaires (Ghedira et Jeune, 2010 ; Orientica., 2010). Ses fleurs sont solitaires, axillaires et terminales, bisexuées, radiales, très riches en nectar (Fig.01) (Cihan, 2012).

- Le calice Il est régulier, à 5 sépales pétaloïdes (colorés), bleu clair, ou bleu mêlé de vert, rarement blanc.
- La corolle 5 à 8 pétales beaucoup plus petits que les sépales. Ils sont tubuleux à la base, à deux lèvres ; la lèvre inférieure est divisée en deux (Bonnier et Douin, 1993 ; Coste L'abbé, 1993).

L'androcée (ensemble des étamines) comporte de nombreuses étamines libres, centripètes, avec anthères à déhiscence longitudinale.

Le gynécée (ensemble des ovaires), est constitué d'un ovaire supère à carpelles libres, parfois soudés (Semmar et Bensikhelifa, 2017).

Son fruit est une capsule formée de 3 à 6 carpelles soudés entre eux jusqu'à la base des styles persistants. Chaque capsule contient plusieurs graines triangulaires blanchâtres et à maturité, elles s'ouvrent et l'exposition des graines à l'air les rend noire (Bonnier, 1990 ; Ghedira, 2006),

Nigella sativa et surtout reconnue pour ses graines oléagineuses, dont la saveur est âcre et piquante. Ses graines sont ovoïdes, mesurant de 2 à 3,5 mm Elles présentent 3 à 4 angles avec une face supérieure finement granuleuse et réticulée. Au broyage, elles dégagent une odeur fortement aromatique (Wichtl et Anton, 2003).



Figure 01 : Aspect morphologique de la plante *Nigella sativa* L. (Emaoui, 2011).

A : Fleurs ; B : Bourgeon floral ; C : Graines de *Nigella sativa* L.

4. Systématique

La classification des végétaux permet de distinguer les procaryotes (bactéries et cyanobactéries) des eucaryotes. Selon la classification botanique des Angiospermes de **Cronquist (1988)** basée sur les critères morphologiques, anatomiques et chimiques, *Nigella* est une plante à graines (**Cihan, 2012**), donc elle fait partie de :

- **Règne** : *Plantae*
- **Sous-règne** : *Tracheobionta*
- **Embranchement** : *Spermaphytes*
- **Sous embranchement** : *Angiospermes*
- **Classe** : *Magnoliopsida* (dicotylédone)
- **Famille** : *Ranunculaceae*
- **Genre** : *Nigella*
- **Espèce** : *Nigella sativa* (**Guignard, 2001**)

5. Culture de *Nigella Sativa* L.

N. sativa est originaire d'Asie occidentale. Sa culture s'est propagée depuis l'Asie jusqu'en Afrique. Elle se trouve très répandue en Inde, en Iraq et dans certains pays de la méditerranée, notamment la Syrie, la Turquie et les pays d'Afrique du nord (**Karrandou, 2016**). Le principal pays producteur est l'Egypte (**Wichtl et Anton, 2003**). En France, elle peut être exceptionnellement présente en région méditerranéenne (**Karrandou, 2016**).

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 (**Anton et al., 2005**).

Dans les pays d'Afrique du Nord, la Nigelle est cultivée dans les régions côtières. Elle fleurit au mois de mai et les graines sont récoltées au mois de juillet ((**Karrandou, 2016**).

6. Composition chimique des graines de *Nigella Sativa* L.

La plus par des études phytochimiques exécuter pour déterminer la composition chimique et les principes actifs des graines de *Nigella sativa* L., ont révélées qu'elle est riche par: des lipides, protéines, acides aminés, glucides et des métabolites secondaires en quantité bien moins grande : terpénoïdes, polyphénols, alcaloïdes, acides organiques (Ces métabolites secondaires jouent un rôle de protection contre les attaques d'herbivores ou de pathogènes et améliorent l'efficacité de la reproduction) (**Zahoor et al., 2004**).

D'après une analyse réalisée sur des graines de Nigelle de Turquie en 1993 (**Nergiz et Otles, 1993**), la composition générale des graines de *Nigella sativa* montre une teneur relativement importante en glucides (37,4%), en lipides (32%) et en protéines (20%) (**Orsi-Llinares, 2005**).

Les valeurs et les proportions fournies par la littérature diffèrent d'un auteur à l'autre ; la variété et l'origine des échantillons peuvent en être partiellement responsables. Une approximation de la composition est donnée dans le (**Tab.01**) (**Semmar et Bensikhelifa, 2017**).

Tableau 01 : Composition des graines de *Nigella sativa* (Greenish, 1880).

Constituants	Quantité (%)
Lipides	30- 35
Protéines	16-21
Glucides	33-34
Fibre alimentaire	4.5- 6.5
Sels minéraux	3.7-7
Saponines	0.013
Eau	6

6.1. Lipides et stérols

Les graines constituent environ 0,4-2,5% d'huile essentielle, plus de 30% d'huiles fixes (Hashim et El-kiey, 1982 ; Dominic *et al.*, 1991) et 38% de lipides totaux dont les phospholipides (Martin *et al.*, 2001). Les deux acides gras principaux de l'huile de *Nigella sativa* L. sont les acides oléique et linoléique et ils constituent 75% des acides gras totaux (Tab.01) (Abdel-aal et Attia, 1993). Les stérols représentent environ 2% de l'huile fixe (Cheikh-rouhou *et al.*, 2008). Les graines contiendraient 26,6% d'huiles dont 64,6% d'acide linoléique et 20,4% d'acide palmitique (Sener *et al.*, 1985). Le Tableau ci-dessous représente la composition d'huile fixe des graines de *N.sativa* selon l'origine

Tableau 02 : Composition d'acide gras de l'huile végétal de *Nigella Sativa* L. (Houghton *et al.*, 1995).

Compositions d'acides	Formule brute	Pourcentage
Acide laurique	$C_{12}H_{24}O_2$	0.6
Acide myristique	$C_{14} :0$	0.5
Acide palmitique	$C_{16}H_{30}O_2$	12.5
Acide stéarique	$C_{18}H_{36}O_2$	3.4
Acide oléique	$C_{18}H_{34}O_2$	23.4
Acide linoléique	$C_{18}H_{30}O_2$	55.6
Acide Linoléique	$C_{18}H_{30}O_2$	0.4
Acide Eicosadienoï	$C_{20}H_{36}O_2$	3.1
Total des acides gras	/	99.5

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% (Cheikh- Rouhou *et al.*, 2008 ; Hamrouni-Sellami *et al.*, 2008).

6.2. Composés aromatiques

Burits et Bucar (2000) ont identifié par GC-MS, 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%) (Burits et Bucar, 2000).

La présence de thymohydroquinone, de thymol, de produits d'oxydation de la thymoquinone, comme la dithymoquinone sont signalés dans la figure 02.

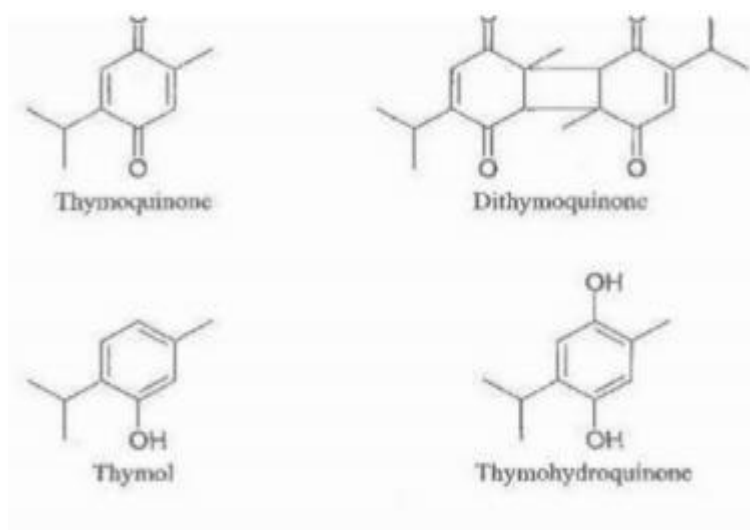


Figure 02 : Représentation chimique de la thymoquinone et de ses dérivés retrouvés dans l'huile essentielle de *N. sativa* L., d'après Cihan et Toparslan (2012).

6.3. Saponosides

Les saponosides sont des hétérosides de stérols ou de triterpènes. Ils libèrent par hydrolyse un ou plusieurs oses et une génine (sapogénine). De nombreux saponosides ont pu être déterminés à partir des graines, de l'extrait éthanolique et des huiles de *N. sativa* (Ansari *et al.*, 1975 ; Greenish, 1880 ; Abdel-Aal et Attia, 1993).

Dans une étude réalisée par Kumara et Huat (2001), il a été possible d'isoler et de caractériser à partir des graines de *Nigella sativa* une saponoside triterpénique douée de propriétés antitumorales appelée l' β -hederine.

6.4. 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 (**Benzine Ouahid, 2014**).

Comme beaucoup de renonculacées, la *Nigella sativa* L. cultivée est riche en flavonols. Plusieurs flavonols triglycosylés ont été isolés à partir des grains de *Nigella sativa* L., la quercétine-3- glycosyl, (1-2), galactosyl, (1-2) glucoside, kœmpférol, 3-glycosyl, (1-2) galactosyl, (1-2) glucoside et quercétine-3-(6 feruloglucosyl), (1-2) galactosyl, (1-2) glucoside (**Merfort et al., 1997**).

En Turquie **Nergiz et Otles (1993)** ont déterminé la teneur en dérivés phénoliques de graines de Nigelle turques. La teneur totale de dérivés phénoliques trouvée était de 1744 ± 10.6 mg/g d'huile.

6.5. Protéines

Les graines de *Nigella sativa* sont très riches en protéines (environ 16 %). Ces protéines sont composées de 17 acides aminés dont 8 sont des acides aminés essentiels. Les acides aminés les plus dominants sont de l'acide glutamique (22,4%), d'acide aspartique (10,05%) et d'arginine (9,18%) (**Tab.03**) (**Meziti, 2009**).

Tableau 03 : Répartition en acides aminés des protéines de graines de *Nigella sativa* (Al-jassir, 1992).

Acides aminés	% de contribution a l'apport protéique
Acides aminés essentiels (AAE)	
Leucine	5,82
Valine	4,61
Lysine	4,04
Thréonine	3,65
Phénylalanine	3,61
Isoleucine	3,46
Histidine	3,35
Méthionine	1,65
Total AAE	30,19
Acides aminés non essentiels (AANE)	
Acide glutamique	24,74
Arginine	9,19
Acide aspartique	8,94
Glycine	5,61
Proline	4,90
Sérine	4,31
Alanine	3,73
Tyrosine	3,59
Ammonium	2,84
Cystine	1,96
Total AANE	69,81

6.6. Alcaloïdes

Dans les graines de *Nigella sativa* 12 alcaloïdes ont été retrouvés (**Fig.03**) :

- Nigellicine (**Atta-Ur-Rahman et al., 1985a**) ;
- Nigellimine N-oxyde (**Atta-Ur-Rahman et al., 1985b**) ;
- Nigellidine, ayant un noyau indazol (**Atta-Ur-Rahman et al., 1993**) ;
- L'isoquinone nigellimine (**Atta-Ur-Rahman et al., 1992**) ;
- les alcaloïdes diterpènes Dollabllane- types Nigellamines A1, A2, B1, B2 (**Morikawa, 2004b**), A3, A4, A5, et C (**Morikawa, 2004a**).

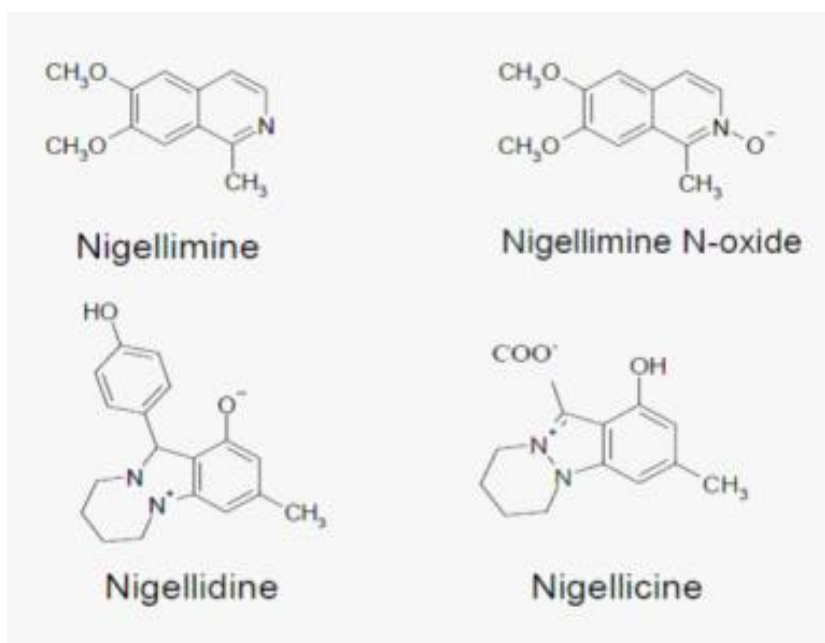


Figure 03 : Structure chimique des principaux alcaloïdes de *N. sativa* L., d'après **Atta et al. (1985a)**.

6.7. Vitamines et sels minéraux

La composition en vitamines a été déterminée et révèle la présence des vitamines B1, B2, B6, PP et de l'acide folique (**Nergiz et Otles, 1993**).

Des travaux sur la composition minérale de la graine de *N. sativa* ont rapporté que sa teneur en potassium est importante (1.18 % de poids total de la graine) et que le calcium, le fer, le sodium représentent 0.188, 0.0575, et 0.0853 % respectivement, la teneur des graines en sélénium a été également déterminée, elle représente 0,27-0,54 mg/kg des graines (**Al-Saleh et al., 2006**).

7. Usage à travers le monde

7.1. Usage culinaire

Les graines de nigelle sont usitées comme épice. Elles servent à saupoudrer le pain et les gâteaux pour les rendre plus appétissant (**Mahi, 2016**).

De par ses teneurs en vitamines B, minéraux, lipides et par la qualité de ses protéines, la graine de Nigelle constitue une excellente source complémentaire de nutriments essentiels. Son incorporation dans les aliments pour améliorer leur valeur nutritionnelle est tout à fait intéressante (**Orsi-Llinares, 2005**).

Dans la région du Bengale, entre l'Inde et le Bangladesh, le cumin noir entre dans les recettes de légumes secs et dans la composition de certains mélanges d'épices comme le panchphoron, composé de cinq épices : le cumin, le fenouil, la moutarde, le fenugrec et la nigelle (**Fig.04**) (**Antwerpen, 2006**).



Figure 04: Composition du mélange d'épices de Panchphoron (Antwerpen, 2006).

7.2. Médecine traditionnelle

Elles sont énumérées également à d'autres emplois du point de vue médicinal. La décoction à la dose de 5g dans un quart d'eau et de vinaigre, calme en bain de bouche les maux de dents (Mahi, 2016).

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 (Aggarwal et Kunnumakkara, 2009).

Les médecins musulmans et arabes se sont plus préoccupés de la graine de Nigelle après l'avoir découverte dans la Tradition Prophétique.

Les formes galéniques les plus utilisées sont :

- Les graines broyées ou réduites en poudre qui sont ensuite ingérées ou utilisées en application locale (mélangées ou non à d'autres ingrédients) ;
- L'huile est beaucoup utilisée par voie interne ou externe (en application sur les affections cutanées comme l'eczéma, les furoncles et l'acné par exemple) ;
- Les graines broyées ou la poudre peuvent être inhalées contre les affections respiratoires (Karrandou, 2016) ;
- Les graines de Nigelle sont aussi utilisées en médecine chinoise surtout comme antibiotique naturel (Orientica, 2015).

8. Activités biologiques et propriétés pharmacologiques de *Nigella sativa* L.

Un très grand nombre d'études concernant les effets pharmacologiques des graines de nigelle ont été réalisées depuis les années soixante. La nigelle est très utilisée dans les maladies de l'hiver (rhume et grippe) et les problèmes pulmonaires comme l'asthme ainsi qu'en pommade dans divers problèmes cutanés (dont le vitiligo) et neurologiques (**Kooti et al., 2016**).

8.1. Activité antioxydante

8.1.1. Etude *In Vitro*

Une étude sur l'auto-oxydation de l'huile de maïs a permis de déterminer le pouvoir antioxydant de *N. sativa*. En effet, les extraits éthanolique et aqueux ont retardé l'oxydation des triglycérides de l'huile de maïs à 100°C, l'extrait éthanolique ayant un pouvoir antioxydant plus fort que l'extrait aqueux. L'activité antioxydante de l'extrait éthanolique est à celle de la tert-butylhydroquinone (2-(1,1-diméthyléthyl) - 1,4-benzènediol), un antioxydant utilisé dans les cosmétiques, et utilisé comme conservateur des acides gras insaturés dans l'alimentation (**Atta et Imaizumi, 1998**).

Une étude de comparaison de l'action de sept plantes médicinales, dont *N. sativa*, sur la déformation des érythrocytes, leur fragilité osmotique à 37°C pendant 60 minutes dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 10 mM, leur dégradation protéique et peroxydation lipidique, a mis en évidence une action protectrice de la nigelle sur la dégradation érythrocytaire suite au stress oxydatif. *Nigella sativa*, à activité antioxydante, anti-radicalaire, peut donc être bénéfique dans les pathologies rhéologiques (**Suboh et al., 2004**).

8.1.2. Études *In Vivo*

Une étude, mettant en œuvre la toxicité du tétrachlorométhane (CCl₄) sur des souris, a montré que l'huile de *Nigella sativa* a rétabli le profil lipidique sérique et a joué un rôle protecteur contre l'hépatotoxicité. Les taux anormalement élevés de potassium et calcium et la numération de la formule sanguine abaissée par le CCl₄ ont été restaurés par l'huile de nigelle (**Nagi et al., 1999 ; El-dakhakhny et al., 2000**).

Elle a diminué les enzymes hépatiques élevées et augmenté les enzymes antioxydantes diminuées ; *N. sativa* a lutté contre la fibrose hépatique par le CCl₄ (**Turkdogan, M et al, 2001**).

Une autre étude montre que l'huile de nigelle augmente la concentration en glutathion et le système de défense antioxydant au niveau du cortex rénal, de façon dose-dépendante du point de vue biochimique et histologique, ce qui implique une protection contre la néphrotoxicité (**Salem, 2005**).

8.2. Propriétés antiallergiques

El-Dakhakhny (1965) et son équipe ont isolé le dimère de dithymoquinone, la nigellone, de l'huile volatile de graine de nigelle. La nigellone administrée par voie orale aux patients atteints de bronchite asthmatiforme a eu un effet bénéfique en supprimant les symptômes. Par la suite elle a été administrée également aux enfants et n'a présenté aucun effet toxique.

Dans une étude clinique avec des patients allergiques, ayant comme symptômes une rhinite, une bronchite asthmatiforme ou un eczéma atopique, une diminution des polynucléaires éosinophiles, des Ig-E et du cortisol endogène plasmatique et urinaire a été observée après administration d'huile volatile de *N. sativa* (**El-dakhakhny, 1965**).

Des études *In Vitro*, sur des chaînes trachéales isolées et contractées à l'avance, ont démontré l'effet relaxant et anti-histaminique de l'extrait aqueux de *N. sativa* ; l'expérience a été réalisée sans calcium et en présence du cycle de Krebs. Ce qui montre que l'effet relaxant musculaire de la nigelle n'a aucun lien avec son effet de bloqueur de canaux calciques, même si son effet relaxant est identique à celui du vérapamil, inhibiteur calcique qui diminue les mouvements transmembranaires du calcium. Quand aucune contraction n'est provoquée par le chlorure de potassium, aucun effet n'est observé (**Ali et Blunden, 2002 ; Boskabady et al., 2004**).

Il a été admis que les différents constituants actifs de l'huile essentielle de *Nigella sativa* n'ont pas la même action sur la libération d'histamine. Le constituant actif de l'huile essentielle de nigelle, la nigellone, est bloqueur des canaux calciques, ce qui fait que *N. sativa* peut être utilisée en cas de diarrhée, d'asthme et d'hypertension (**Salem, 2005**).

8.3. Propriétés anti-inflammatoires et analgésiques

Plusieurs travaux proposés que l'huile fixe de la nigelle soit responsable d'une importante activité analgésique, cette action ayant été antagonisée par la naxolone. Cette huile présente en outre un effet réducteur significatif sur le SNC. qui ont mis en évidence un effet antinociceptif d' aussi bien à l'huile fixe qu'à la thymoquinone par activation indirecte des récepteurs Superspinaux et kappa. Le mécanisme par lequel l'huile fixe de *Nigella sativa* et la thymoquinone exercent leurs effets antiinflammatoires a été étudié et s'est affirmé être un puissant inhibiteur du thromboxane B2 et des leucotriènes B4 par inhibition respective des cyclo-oxygénase et lipo-oxygénase (**Allouat et Boulkelia, 2014**).

8.4. Propriétés immunomodulatrices

L'emploi traditionnel de la Nigelle dans certaines pathologies comme les infections et les affections inflammatoires amène à rechercher d'éventuelles propriétés immunomodulatrices.

El-Kadi et al. (1987) furent les premiers à montrer que la Nigelle avait des effets immunomodulateurs sur des lymphocytes T humains *In Vitro* (**Alib et Blunden, 2003**).

8.5. Propriétés anti-infectieuses

8.5.1. Propriétés antibactériennes

L'extrait méthanolique possède un effet inhibiteur très considérable sur *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* et *Candida albicans* (**Sokmen, 1999**). L'huile fixe présente un large spectre vis-à-vis de nombreuses souches bactériennes, ainsi l'huile de la nigelle possède un pouvoir inhibiteur supérieur à celui de la gentamicine sur une vingtaine de souches de *Listeria monocytogenes* (**Nair et al., 2005**).

8.5.2. Propriétés antifongiques

Les différents extraits étudiés sur les bactéries ont également été utilisés pour déterminer l'activité antifongique. L'essai de l'huile essentielle diluée au centième par la méthode de diffusion sur disque, cité précédemment, a été réalisé sur des champignons du genre *Aspergillus* et *Microsporum*. L'effet antifongique de l'huile essentielle de nigelle a été observé au même titre que l'effet antibactérien (**Ali et Blunden, 2002**).

L'huile fixe présente aussi une excellente activité antifongique, notamment à l'égard d'*Aspergillus flavus* (**Amrouche et al., 2011**). Par ailleurs, la thymoquinone exerce une activité inhibitrice vis-à-vis de huit espèces de dermatophytes (**Aljabre et al., 2005**).

Une étude comparant les propriétés antifongiques de 16 huiles essentielles dont *Nigella sativa*, a permis d'évaluer leur concentration minimale inhibitrice (CMI) sur différents champignons. L'huile volatile de nigelle s'est révélée être la plus efficace contre *Candida albicans* à une CMI de 2,5 mg/mL, et en deuxième lieu contre *Chaetomium olivaceum* à la même CMI (**Aboul ela, 1996**). Cette huile pourrait éventuellement être utilisée dans les cultures de riz, blé et coton fréquemment touchées par *C. olivaceum*.

8.5.3. Propriétés antivirales

L'huile de *Nigella sativa* possède également un effet antiviral vis-à-vis du virus de l'herpès: cytomégalovirus murin (MCMV) (Salem et Hossain, 2000).

Une étude *In Vivo* de l'action de l'huile de nigelle sur des souris infectées par un cytomégalovirus (CMV) a montré l'activité antivirale de *N. sativa*. Après inoculation du CMV et l'injection intra-péritonéale d'huile de nigelle à des souris, l'observation a porté sur l'immunité non-spécifique c'est-à-dire sur les cellules NK et les macrophages, et sur l'immunité spécifique constituée par les lymphocytes T. Les lymphocytes T cytotoxiques constituent la réponse retardée avec leurs médiateurs comme les interférons, alors que les cellules NK et les macrophages constituent la réponse précoce de l'immunité. Dans les organes étudiés, le foie et la rate, une diminution du CMV a été observée ; en même temps une augmentation des IFN- et des macrophages explique l'effet antiviral (Salem et Hossain, 2000 ; Su *et al.*, 2001 ; Salem, 2005).

Dans les foyers infectieux viraux, une diminution du nombre de lymphocytes par apoptose est observée. Les agents antioxydants peuvent inhiber ces morts cellulaires autant de fois qu'il y a de réplifications virales dans les cellules cibles. L'effet antioxydant de *Nigella sativa* serait donc impliqué dans son activité antivirale (Salem, 2005).

8.5.4. Propriétés antiparasitaires

De nombreuses études ont montré l'efficacité des extraits de la nigelle. Des propriétés anti-cestodales et anti-nématiques (*Entameba histolytica*) de différents extraits de la graine ont été rapportées par (Raza *et al.*, 1999).

L'huile fixe de graine de *Nigella sativa* L. présente des propriétés anticestodales et anti-nématodiques comparables à celles de la pipérazine (Agrawal *et al.*, 1979). D'autres travaux montrent que ce l'huile fixe administrée par voie orale à raison de 2,5 à 5 ml/kg pendant deux semaines, est responsable de la réduction du nombre de *Schistosoma mansoni* dans le foie et diminue le nombre des œufs déposés dans le foie et les intestins (Mahmoud *et al.*, 2002).

8.5.5. Propriétés antidiabétiques

Les effets de *Nigella sativa* sur certaines complications du diabète expérimental induit chez les animaux ont fait l'objet de nombreux travaux, Al-Hader *et al.* (1993) rapportent que l'huile essentielle de la graine administrée par voie intra-péritonéale (à raison de 50 mg/kg) abaisse de façon significative (de 15 à 23 %) la glycémie à jeun chez les animaux normo et hyperglycémiques. L'insulinémie n'ayant pas été affectée par les traitements. L'effet hypoglycémiant observé se

manifeste selon un mécanisme non encore identifié n'impliquant pas l'insuline (**Hawsawi et al., 2001 ; El-Dakhakhny et al., 2002**).

D'autres auteurs ont mis en évidence un effet hypoglycémiant via l'oxyde nitrique de la Thymoquinone chez l'animal rendu diabétique par la Streptozotocine (**El-mahmoudy et al., 2005**). Le traitement des rats avec l'extrait de *Nigella sativa* seul ou combiné avec les hormones thyroïdiennes humaines a montré une augmentation de la production d'insuline par les cellules du pancréas (**Altan et al., 2007**).

8.6. Propriétés cardiovasculaires

Nigella sativa L. possède des propriétés anti-hypertensives directes et elle protège le système cardiovasculaire par son effet hypolipémiant, anticoagulant et antiagrégant plaquettaire. Elle lutte contre l'athérosclérose et pourrait être utilisée dans la prévention d'accidents vasculaires (**Cihan, 2012**).

L'OMS a déclaré que les décès dus aux causes cardiovasculaires touchent environ 23,6 millions d'habitants, principalement chez les patients présentant une dyslipidémie. Les étiologies des maladies cardiovasculaires sont très diverses : HTA, athérosclérose, dyslipidémie. Ces maladies sont en augmentation permanente dans le monde entier (**Al-hader, 1993**).

La Nigelle a traditionnellement été utilisée pour traiter l'hypertension, l'excès de cholestérol et pour stopper les saignements de nez (**Orsi-Llinares, 2005**).

8.7. Propriétés gastro-intestinales

Les effets gastro-intestinaux des graines de *Nigella sativa* ont été étudiés auprès de patients présentant une dyspepsie non ulcéreuse à *Helicobacter pylori*. L'effet de la Nigelle a été comparé au traitement habituel qui repose sur une trithérapie par Amoxicilline, Clarythromicine et Oméprazole (**Salem, 2010**).

Les graines de *Nigella sativa* sont largement utilisées dans la médecine traditionnelle pour le traitement des désordres gastro-intestinaux, L'extrait aqueux des graines réduit de 32 à 36% l'indice d'ulcère induit par l'acide acétylsalicylique (aspirine) et diminue l'activité peptique et la production d'acide chez le rat (**Ghedira, 2006**).

8.8. Propriétés antihépatotoxiques, hépatoprotectrices et antinéphrotoxiques

8.8.1. Action de protection hépatique

L'extrait décocté des graines de *Nigella sativa* exerce une forte activité cytotoxique sur les cellules hépatiques cancéreuses, notamment sur la synthèse d'ADN (**Thabrew et al., 2005**).

Les travaux menés par **Houcher et al. (2007)** sont en concordance avec les études antérieures, ils ont montré que le traitement des rats diabétiques avec l'extrait brut et l'huile commerciale provoque une réduction importante de la glycémie de 58.09 et 73.27 %, respectivement. Le mécanisme d'action impliqué n'est pas relié à l'inhibition de l'absorption intestinale du glucose ni à la stimulation de l'insulinosécrétion, mais il est probablement dû à l'inhibition des enzymes de la néoglucogénèse hépatique (**Houcher et al., 2007**).

8.8.2. Action sur les reins

La *Nigella sativa* L. avec ses propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires lutte efficacement contre les lésions rénales. La thymoquinone a eu les meilleurs résultats, ce sont ses propriétés inhibitrices de la peroxydation lipidique microsomale et stimulante des polynucléaires qui protègent contre les actions des radicaux libres. Son effet Anti-inflammatoire qui se manifeste par l'inhibition des COX et de la LOX, lutte également contre l'état inflammatoire induit au niveau du rein (**Ragheb, A et al., 2009**).

En outre, les résultats de **Khan (2003)** ont prouvé que les extraits de la graine de *N. Sativa* possèdent une activité *In Vivo* contre *C. albicans* infectant la rate, le foie, et les reins.

8.9. Propriétés neurologiques

Du fait de ses propriétés antioxydantes, il apparaît que la graine de *N. sativa* exerce des effets protecteurs sur le système nerveux central. En prévenant l'inhibition des enzymes antioxydantes (SOD, GPx et CAT) et en diminuant les marqueurs du stress oxydant, *N. sativa* associée la méthylprednisolone, protège les neurones des tissus nerveux de rats souffrant d'une atteinte de la moelle épinière (**Kanter et al., 2006**). La vitamine C est essentielle à la synthèse du collagène, de la carnitine et de certains neurotransmetteurs. Elle joue le rôle d'agent réducteur qui réagit avec la vitamine E pour se donner à elle-même un radical lui permettant de régénérer la vitamine E (**Abdesselam, 2015**).

8.10. Propriétés sur les fonctions de reproduction et de fertilité

Une étude de l'action de l'extrait aqueux de la nigelle, administré par voie orale à 300mg/kg pendant 60 jours, sur la fertilité du rat mâle, montre une augmentation du poids des organes reproducteurs, ainsi qu'une stimulation de différents paramètres de reproduction (la motilité et la densité du sperme, l'activité sécrétoire des vésicules séminales et de la prostate) (**Mukhallad et al., 2009**).

Deux études ont été rapportées dans la littérature (**Kreshri et al., 1995 ; El-Tahir et al., 1999**), elles ont démontré un effet abortif important provoqué chez la rate par l'ingestion de la fraction lipidique de la graine de Nigelle, et stimule la lactation de la rate allaitante. La qualité nutritionnelle de l'huile de Nigelle permet une élévation du poids du fœtus (**Kreshri et al., 1995 ; El-Tahir, 1999**).

8.11. Propriétés antitumorales

L'extrait de *Nigella sativa* L. diminue le diamètre des tumeurs induites par des substances chimiques carcinogènes. Des chercheurs ont déterminé que *Nigella sativa* L. possède un effet antitumoral envers plusieurs types de cellules malignes. Cette action est due à une inhibition de l'incorporation de thymidine au niveau de l'ADN (**Salomi et al., 2000**).

Aussi L'extrait d'acétate d'éthyle de *Nigella sativa* L. agit contre la prolifération chez différentes lignées cellulaires cancéreuses (**Swamy et Tan, 2000**).

L'huile des graines de *Nigella sativa* réduit le potentiel fibrinolytique des cellules tumorales lié à leur phénotype de malignité. Cette action conduit à l'inhibition des invasions tumorales locales et de la métastase (**Awad, 2005**).

9. Toxicité de *Nigella sativa* L.

Les propriétés toxiques de la thymoquinone (TQ) et de la thymohydroquinone (THQ) ont été étudiées afin de déterminer leur DL50. La TQ avec une DL50 à 10 mg/kg de poids corporel, serait plus toxique que la THQ à 25 mg/kg (**El-Dakhakhny, 1965**). Une étude publiée en 2012 a confirmé l'effet toxique de l'huile végétale de *N. sativa*. à des doses journalières de 15 et 25 ml/kg de poids corporel (**Zaghlol et al., 2012**).

La toxicité de la Nigelle est pratiquement nulle en ce qui concerne la consommation des graines, de l'huile ou de l'extrait aqueux. La plupart des études montrent clairement que la nigelle possède un index thérapeutique élevé et une excellente innocuité à des doses inférieures à 4 g/kg/jour de *N. sativa* (**Orsi-llinares, 2005**).

1. Activité antioxydante

1.1. Stress oxydant

Le stress oxydant se traduit par un déséquilibre profond de la balance entre la formation des espèces réactives de l'oxygène à caractère pro-oxydant et les antioxydants qui régulent leur production, en faveur des premières (**Telaidji, 2018**). Ce déséquilibre peut se produire quand le système de défense antioxydant est surmené par l'augmentation des oxydants, ou lorsque les défenses sont affaiblies par une carence d'apport et/ou de production d'antioxydants (**Kirschvink et al., 2008**).

1.2. Radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié) sur leur couche externe. La présence d'un électron célibataire leur confère une grande réactivité (**Halliwell et Whiteman, 2004**). D'après **Dacosta (2003)** les principaux radicaux libres qu'on rencontre dans le corps humain sont : l'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$) ; le radical hydroxyle OH° ; Le radical alcoxyle (RO°) ; l'oxyde nitrique (NO°) et le radical hydroperoxyde HOO° (**Tab.04**). Il existe des mécanismes de défense cellulaires qui détruisent les radicaux oxygénés (peroxydases cellulaires) ou qui piègent les radicaux libres (molécules antioxydantes). Un antioxydant est défini comme étant toute substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substances biologiques. Ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs (**Mohammedi, 2006**).

Tableau 04: Principaux radicaux libres et leurs formules chimiques (**Haton, 2005**).

Radicaux libres	Structures chimique
Radical hydroxyle	OH°
Radical hydroperoxyde	HOO°
Radical peroxyde	ROO°
Radical alcoxyle	RO°
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Peroxynitrite	$ONOO^{\circ}$
Anion superoxyde	$O_2^{\circ-}$

1.2.1. Origine radicaux libres

Des radicaux libres sont produits en permanence dans l'organisme, dans les mitochondries ou lors de phagocytose. Ils peuvent également se former au cours de mécanismes de détoxification après exposition à certaines espèces chimiques ou sous l'effet de radiations. Mais l'essentiel de leur production est associé au métabolisme cellulaire de l'oxygène et aux réactions d'oxydoréduction (Tison *et al.*, 1989 ; Dobet, 1991).

1.2.1. Production des radicaux libres

Les radicaux libres sont produits en permanence en faible quantité comme les résidus des réactions énergétiques, de défense ou les médiateurs tissulaires, cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense (Favier, 2003). Ils sont des espèces réactives de l'azote (RNS) ainsi que espèces réactives de l'oxygène (ROS). Lorsqu'ils sont en surcharge, ils ne peuvent pas être détruit, leur accumulation alors dans le corps provoque le stress oxydatif (Lien AI Pham-Huy *et al.*, 2008).

1.2.1.2. Production endogène

La formation endogène de radicaux libres s'effectue au niveau de divers organites cellulaires.

Les mitochondries : Une des plus grandes sources endogènes de production de radicaux libres, organite utilisant de l'oxygène pour produire de l'ATP. Au cours de la respiration cellulaire, 95 à 99 % de l'oxygène consommé est réduit en eau. La réduction de l'oxygène moléculaire par les cytochromes respiratoires cellulaires s'accompagne d'une formation parallèle d'environ 2% d'ions superoxyde, d'eau oxygénée et éventuellement de radicaux (OH) (Sturtz *et al.*, 2001).

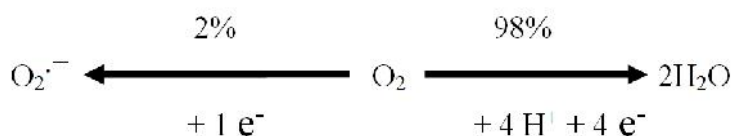


Figure 05 : Production de l'anion radicalaire superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot -}$) par respiration (Sturtz *et al.*, 2001).

Les microsomes : La production des radicaux libres ensuivre parallèlement une activation de l'oxygène par le cytochrome P-450 pour assurer les biotransformations.

Le cytosol: C'est localisation des différentes réactions enzymatiques responsables à la production du ($\text{O}_2^{\cdot -}$). La réduction de l'oxygène par un électron pour devenir un anion superoxyde nécessite d'un cofacteur c'est le NADPH et des différentes enzymes. Parmi ces enzymes qui ont permettant cette réaction les plus important sont: La xanthine oxydase (responsable de la transformation de l'hypoxanthine en xanthine), la NADPH oxydase (présente dans les neutrophiles

où elle intervient dans leur propriété bactéricide) et aussi les enzymes du réticulum endoplasmique lisse (cytochrome P450) et celles de la chaîne respiratoire mitochondriale (**Cia et Harrison, 2000**).

1.2.1.3. Production exogène

Les agents exogènes générateurs des ROS continue d'attaquer toujours l'organisme humain est obéissante à leur agression (**Favier, 2003**).

Les rayonnements UV: les radiations UV provoquent particulièrement des démâtements au niveau de l'ADN. Les radiations ionisantes induisent la synthèse de radicaux libres dérivés de l'oxygène tels que : ($O_2^{\cdot-}$), (OH^{\cdot}), (O_2) et les molécules génératrices des radicaux libres par l'intermédiaire d'agents photo sensibilisants.

Le monoxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO₂): Sont formés par les Nitric Oxyde synthases (NOS). Ils sont des toxiques présents dans notre environnement comme par exemple: suie, goudron, tabac, polluants industriels. En plus, sont également responsables de la synthèse des radicaux libres.

L'alimentation: comme l'alcool, café, les aliments riches en protéines et en lipides pouvant être à l'origine de la production des radicaux libres, donc ils ont une faible consommation des antioxydants (**Hu Yet al. 2006**).

Certains médicaments: les médicaments qui sont utilisés comme un traitement contre le cancer (anticancéreux comme les anthracyclines) peuvent provoquer aussi la production des radicaux libres (**Moller et al., 1996**).

1.3. Espèces réactives de l'oxygène

Notre organisme a besoin d'énergie pour fonctionner correctement. Les cellules transforment les nutriments apportés par l'alimentation en énergie et en eau. Cette transformation génère environ 2% de molécules d'oxygène (**Edeas, 2005**). L'oxygène (**Fig.06**) peut s'avérer délétère en raison de son caractère oxydant, il est à l'origine de la formation de dérivés plus réactifs appelés espèces réactives de l'oxygène (**Ichai et al., 2011**).

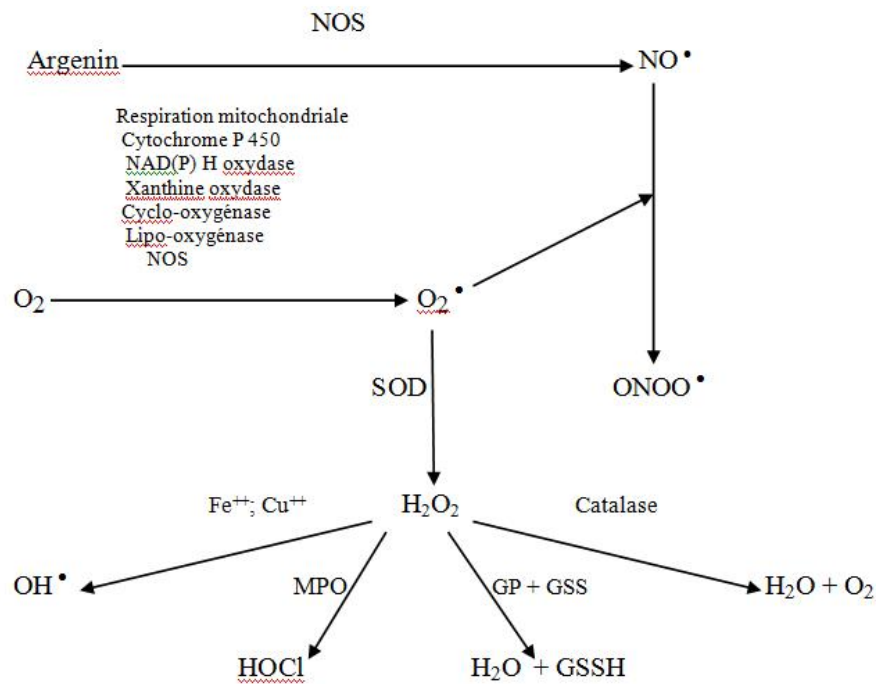


Figure 06: Principales voies de formation des espèces réactives de l'oxygène (Ichai *et al.*, 2011).

1.3.1. Radical superoxyde

Dans l'organisme une partie de l'oxygène moléculaire peut capter de manière univalente et séquentielle un électron conduisant alors la formation du chef de file des espèces oxygénées réactives : l'anion superoxyde ($O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$) (Koechlin-Ramonatxo, 2006 ; Al-Mamun *et al.*, 2007).

1.3.2. Peroxyde d'hydrogène H₂O₂

Il est relativement stable, possède une demi-vie longue, et les membranes biologiques lui sont perméables. Il est peu dangereux en soi pour la cellule, mais il constitue la source du radical hydroxyle HO• par la réaction de Fenton : $H_2O_2 + Fe^{2+} = Fe^{3+} + HO^\bullet + HO^-$ (Mandelker, 2008).

Certains auteurs préfèrent alors considérer la réaction de l'anion superoxyde avec le peroxyde d'hydrogène, catalysée par un ion métallique tel que le fer ; cette réaction est appelée réaction d'Haber-Weiss : $O_2^{\cdot-} + H_2O_2 = O_2 + HO^\bullet + HO^-$ (Powers et Jackson, 2008).

L'importance *In Vivo* de cette réaction est encore largement débattue, dans la mesure où l'ion ferreux Fe²⁺ existe rarement à l'état libre, et souvent maintenu par le potentiel redox de la cellule en ion ferrique Fe³⁺ (Halliwell et Gutteridge, 1990).

1.3.3. Radical hydroxyle HO•

❖ Production de HO•

HO• est donc généré essentiellement à partir de H₂O₂ via la réaction de Fenton (**Wink et Coll, 1994**). Cependant, les rayonnements UV (rupture homolytique de H₂O₂), les ultrasons (cassures des liaisons de l'eau) et les radiations ionisantes (radiolyse de l'eau) sont également capables de générer HO• (**Von Sonntag, 2008**).

❖ Réactivité de HO•

Le couple HO•/OH⁻ possède un potentiel d'oxydoréduction de + 1.2 V/ENH et une demi-vie en milieu biologique, d'environ 10⁻⁹ s à 37 °C (**Pryor, 1986**). Le radical hydroxyle est très réactif. C'est le plus puissant oxydant qui puisse être généré au sein des cellules. Il réagit instantanément de façon non sélective, aux limites de la vitesse de diffusion, avec toutes les macromolécules biologiques, sucres, acides aminés, phospholipides, nucléotides ainsi qu'avec les acides organiques (**Valentine et Coll, 1998**). Il est donc extrêmement toxique pour la cellule. En général, il réagit par arrachement d'un atome d'hydrogène d'une liaison C-H, conduisant à la formation concomitante d'un radical organique.

1.3.4. Oxygène singlet 1O₂

Il correspond à une forme excitée de l'oxygène O₂ : il possède la même structure électronique que l'oxygène mais 'agencée' différemment, à savoir que les électrons de la couche externe initialement non appariés se sont appariés. Il n'est donc pas radicalaire. Son état 'excité' lui confère un potentiel oxydant supérieur à celui de l'oxygène (**Halliwell et Gutteridge, 2007**).

1.4. Conséquence biochimique et biologique du stress oxydant

❖ Les conséquences biochimiques

1- Peroxydation lipidique

Les lipides notamment les acides gras insaturés sont les cibles privilégiées des radicaux libres (**Baudin, 2006**). En présence de dioxygène, la réaction des radicaux sur les doubles liaisons initie une réaction en chaîne menant à des peroxydes ou à des hydroperoxydes (**Houée-Levin et al., 2005**). Les hydroperoxydes ainsi formés peuvent subir plusieurs transformations: être réduits et neutralisés par la glutathion peroxydase ou continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhyde et en alcane qui, par leur volatilité, sont éliminés par voie pulmonaire (**Favier, 2003; Guichardant et al., 2006**).

L'attaque des lipides peut concerner les lipoprotéines circulantes ou les phospholipides membranaires, les conséquences seront différentes:

- ▶ L'attaque des lipides circulants aboutissent à la formation de LDL (lipoprotéines de légère densité) oxydées, qui seront captées par des macrophages formeront ainsi des dépôts lipidiques de la plaque d'athérome responsables des maladies cardiovasculaires (**Favier, 2003**) ;
- ▶ L'attaque des phospholipides membranaires a une action sur la fluidité des membranes et donc sur le fonctionnement de nombreux récepteurs, les aldéhydes ainsi libérés dans le cytosol réagissent avec les protéines (**Favier, 2003; Houée-Levin et al., 2005**).

2-Oxydation des protéines

La toxicité des ERO s'exerce également sur les protéines. Les ERO sont en effet capables de réagir avec les différents acides aminés des protéines. Les plus sensibles aux actions des ERO sont :

- Les acides aminés aromatiques comme le tryptophane et la tyrosine sur lesquels le radical OH• s'additionne en modifiant la conformation de la protéine (**Baudin, 2006; Koechlin-Ramonatxo, 2006**) ;
- Les acides aminés contenant un atome de soufre tels que la cystéine et la méthionine; leur oxydation par les radicaux libres conduit à la formation de ponts disulfures, donc à l'agrégation de plusieurs molécules de protéines (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**);
- Les acides aminés basiques : l'histidine, la lysine et l'arginine, sont également sensibles au radical hydroxyle et forment ainsi des dérivés carbonyles ou hydroxyles semi-aldéhydes (**Baudin, 2006**).

3-Oxydation de l'ADN

L'ADN qu'il soit nucléaire ou mitochondrial est également la cible majeur des ERO (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**). Les radicaux hydroxyles sont les plus actifs, ils ont la capacité d'oxyder rapidement les bases azotées. La guanine est la base la plus exposée à l'oxydation et le principal produit formé est la 8-hydroxyguanine (**Fig.07**). Ces radicaux peuvent aussi attaquer la fraction glucidique de l'ADN. L'oxydation du désoxyribose est moins probable que celle des bases, elle mène soit à une perte de base adjacente et donc à la formation des sites abasiques ou bien à une rupture de la liaison phosphodiester créant une coupure du simple brin d'ADN (**Favier, 2003 ; Houée-Levin et al., 2005**).

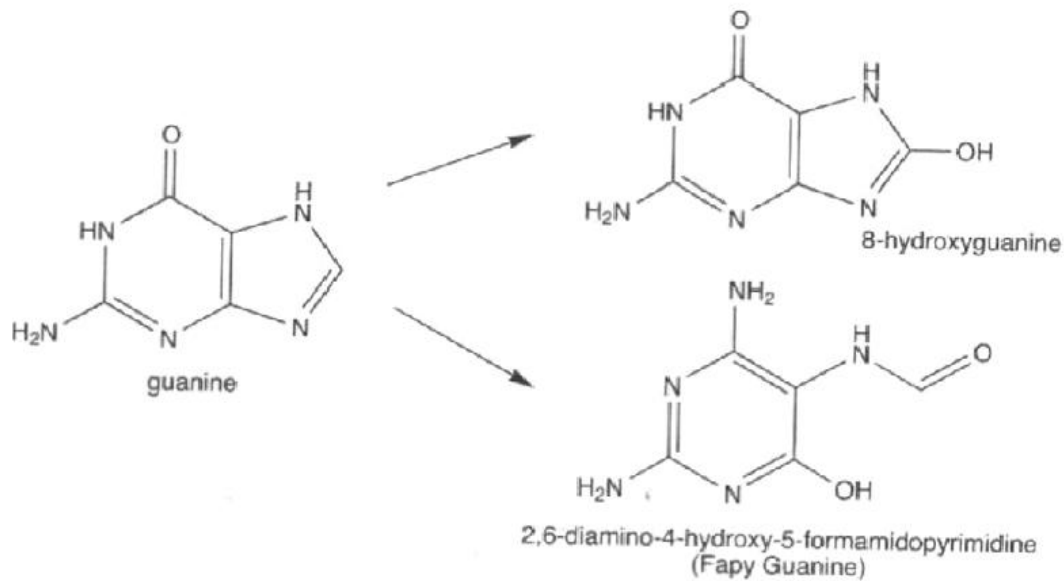


Figure 7: Produit de l'oxydation de la base de l'ADN, la guanine (Houée-Levin *et al.*, 2005).

❖ Conséquences biologiques

Elles sont extrêmement variables selon la concentration des ERO :

- Des légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines;
- Des stress moyens faciliteront l'apoptose;
- Des forts stress provoqueront une nécrose;
- Les stress violents désorganiseront la membrane cellulaire et entraîneront des lyses immédiates (Favier, 2003).

De nombreuses autres anomalies biologiques sont induites par le stress oxydant tels que les mutations, la carcinogénèse, les malformations du fœtus, les dépôts de protéines anormales, les fibroses, la formation d'auto-anticorps, les dépôts de lipides oxydés, et les immunosuppressions (Favier, 2003).

1.5 Type des antioxydants

1.5.1 Antioxydants enzymatique

Ces systèmes sont composés d'enzymes telles que le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPX), capables d'éliminer les radicaux libres et d'autres espèces réactives (Fig.08).

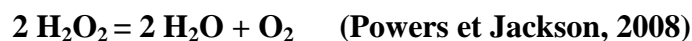
• SUPEROXYDE DISMUTASE (SOD)

Le SOD est une métalloprotéine qui catalyse la dismutation du superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène. Pour cette raison, cette enzyme représente une partie importante du système de défense contre les radicaux libres (Halliwell et Gutteridge, 1999). Cette métalloprotéine est classée en trois catégories, la SOD cytosolique (Cu^- et Zn^- dépendante), la SOD mitochondriale

(Mn-dépendante), et la SOD extracellulaire. La structure de SOD est bien conservée lors de l'évolution et présente un puits hydrophobe au centre de la protéine dans lequel se glisse l'anion superoxyde et puis l'élimination de ce dernier (Zelko *et al.*, 2002).

• CATALASE (CAT)

La catalase se trouve dans les peroxysomes essentiellement. Elle assure la transformation en eau et dioxygène du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , pour lequel elle a une moins forte affinité que la GPX. Elle fonctionne avec un cofacteur : le fer (Tessier et Marconnet, 1995). Là encore des concentrations plus élevées en CAT ont été retrouvées dans les fibres musculaires oxydatives (i.e. type I) (Powers, Criswell *et al.*, 1994).



• Glutathion peroxydase GPX

La glutathion peroxydase est une enzyme tétramérique permettant également la décomposition du H_2O_2 . Elle agit plus lentement que la catalase mais elle a une meilleure affinité pour le H_2O_2 que cette dernière. La GPX est donc essentielle à la décomposition du H_2O_2 produit de manière continue et à des niveaux physiologiques dans la cellule. Les GPX sont des enzymes sélénium-dépendantes ou sélénium-indépendantes et sont soit cytosolique, comme c'est le cas de la première GPX identifiée (Mills, 1957), soit extracellulaire.

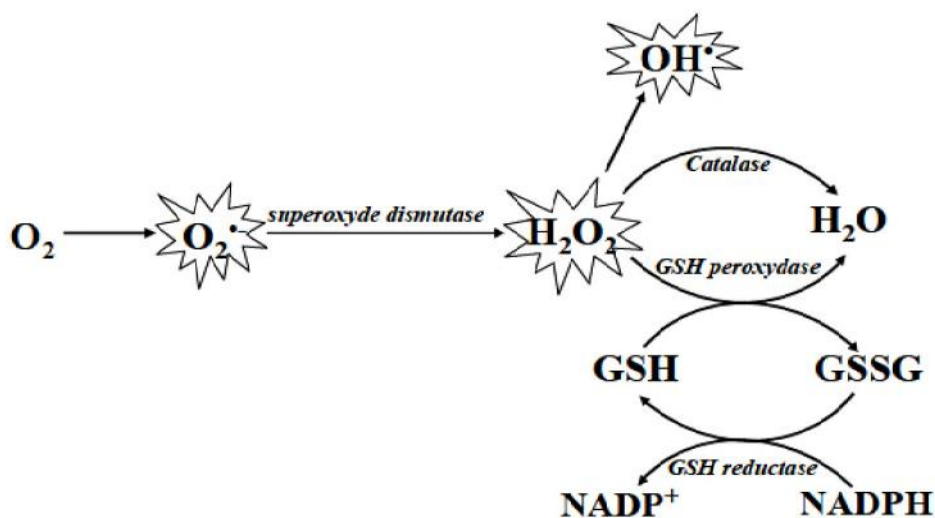


Figure 08 : Schéma de défenses antioxydantes enzymatiques. D'après Favier (2006).

1.5.2. Antioxydants non enzymatiques

***La thioredoxine** : C'est une protéine à deux fonctions thiols. La thioredoxine réduite (TRX-(SH)₂) est générée à partir du thioredoxine oxydée (Trx-SS) par la thioredoxine réductase (**Houée-Levin et al., 2005**); elle intervient dans la réduction des ponts disulfures des protéines oxydées en thiols (**Houée-Levin et al., 2005**).

***Le glutathion** : C'est le thiol le plus abondant dans les organismes et les systèmes vivants (**Baudin et al., 2006**).

***L'acide urique** : C'est un piègeur de l'O₂, des radicaux peroxydes et hydroxyles (RO₂^{*} et HO^{*}), de l'ozone et de HClO (**Delattre et al., 2005**).

***La vitamine C** : La vitamine C ou acide ascorbique n'est pas synthétisée par l'organisme. C'est un excellent piègeur des ERO qui peut protéger divers substrats biologiques (protéines, acides gras, ADN) de l'oxydation. Cette molécule contient trois formes moléculaires les plus connus de Vitamine C sont : l'acide D-ascorbique, l'acide L-ascorbique et sa forme oxydée dite acide déhydroascorbique (DHA) dont ces deux dernières possèdent une activité biologique (**Bourgeois, 2003**).

La vitamine C a également un pouvoir antioxydant indirect en recyclant les caroténoïdes et la vitamine E. D'un autre côté, la vitamine C permet le recyclage de Fe³⁺ en Fe²⁺ favorisant ainsi la réaction de Fenton et donc de manière indirecte une action pro-oxydante. L'acide urique est issu du métabolisme des purines et peut réagir avec HO^{*} (**Ames et al., 1981**) et être régénéré par la vitamine C.

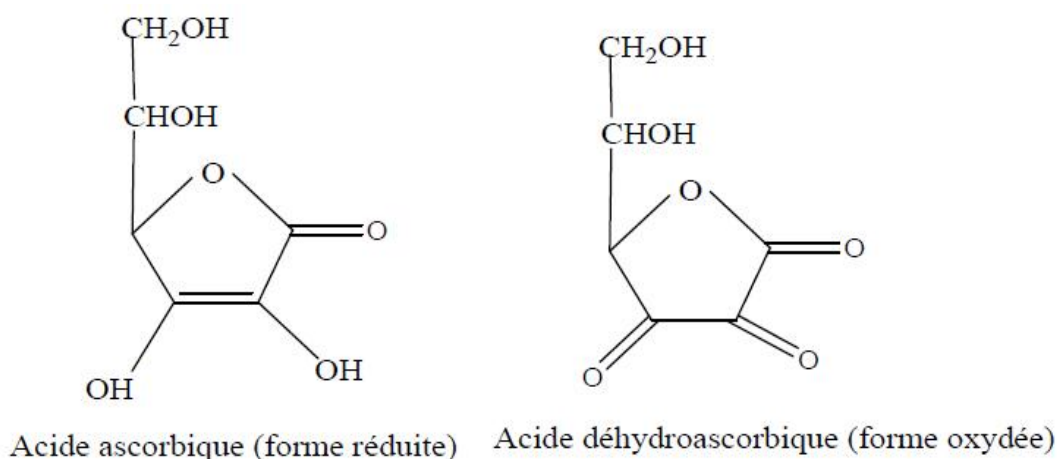


Figure 9: Structure chimique de la vitamine C (**Grusse, 2003**).

***La vitamine E** : Le terme « vitamine E » désigne en fait de nombreux isomères de tocophérols et de tocotriénols. L'isomère qui possède l'activité *in vivo* la plus importante chez l'animal est le **RRR- -tocophérol**. Les teneurs plasmatiques importantes en RRR- -tocophérol par rapport aux autres isomères sont dues à une plus grande affinité d'une protéine hépatique (la protéine de transfert de l' -tocophérol ou -PTT) pour la forme RRR- -tocophérol ; cette protéine assure l'incorporation de ce dernier dans les VLDL, alors que les autres formes subissent un *turn-over* rapide (Halliwell et Gutteridge, 2007).

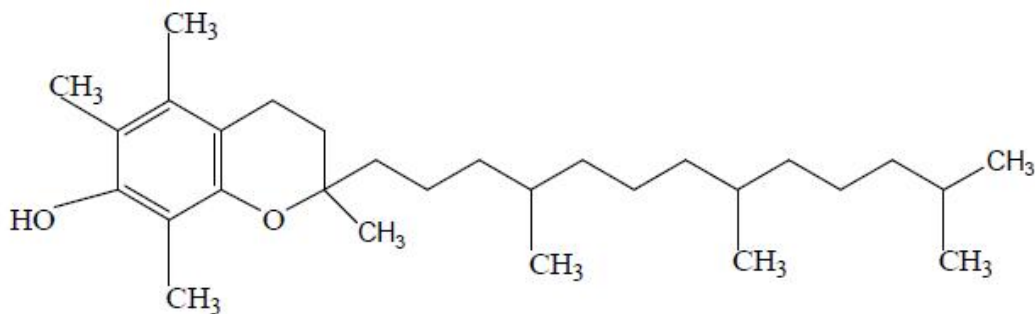


Figure 10: Structure chimique de l' -tocophérol (Berset, 2006).

***Les oligo-éléments** : Le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont des métaux essentiels dans la défense contre les radicaux libres dont ces oligo-éléments interviennent comme cofacteurs d'enzymes indispensables dans la lutte contre les radicaux libres (Tableau IV) (Médale, 2008). Les organismes aquatiques puisent ces oligo-éléments à la fois dans leur nourriture et dans l'eau, tel que les poissons qui sont une source majeure des minéraux environ 65% stocké chez les vertèbres (Lall, 1995).

***Les polyphénols** : L'appellation « polyphénols » ou « composés phénoliques » regroupe un vaste ensemble de plus de 8 000 molécules d'une extrême diversité (Edeas, 2007), allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire, tels les acides phénoliques, à des composées hautement polymérisés comme les tannins (Lugasi *et al.*, 2003 ; Cheynier, 2005) ; ces molécules présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (Hennebelle *et al.*, 2004 ; Lotito et Frei, 2006).

***Les flavonoïdes** : Les flavonoïdes sont des composés phénoliques généralement produit par cyclisation d'un intermédiaire dérivé de l'acide cinnamique et de trois molécules de malonyl-CoA (Judd *et al.*, 1999), ils possèdent un squelette de base à quinze atomes de carbone constitué de deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3 (Heller et Forkmann, 1993).

Leur fonction principale semble être la coloration des plantes, ils sont beaucoup utilisés en leur systématique probablement parce que leur extraction et leur identification sont assez faciles. Ils sont parfois utiles pour estimer les relations phylogénétiques au niveau supérieur (**Judd *et al.*, 1999**). Les flavonoïdes sont connus principalement pour leur activité antioxydante. Ils sont présentés dans des organismes très divers. Ils ont tous une origine biosynthétique commune, ce qui explique qu'ils partagent la même structure de base (**Bruneton, 2008**).

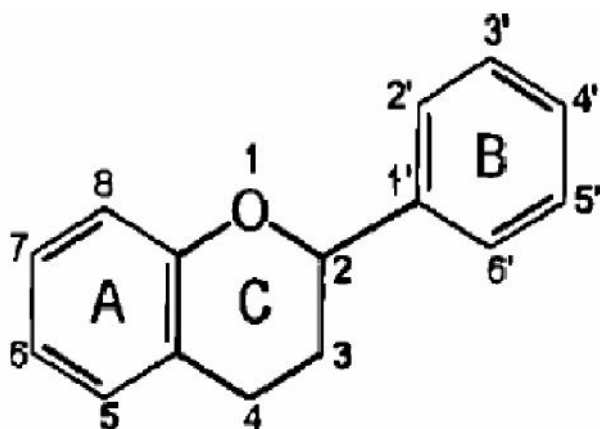


Figure 11: Structure de base des flavonoïdes (**Richter, 1993**).

***Tannins** : Les tannins sont des polyphénols polaires du poids moléculaires compris entre 500 et 3000 Da. Ils sont caractérisés par leur capacité antioxydante et leur propriété thérapeutique (**Cowan, 1999**). Ils peuvent avoir plusieurs activités biologiques dont l'activité antioxydante, anti-inflammatoire, antifongique, antitumorale, antivirale et anti diarrhéique (**Bruneton, 1999**). Les tannins sont subdivisés en deux classes différentes, largement distribuées chez les végétaux supérieurs:

✚ **Tannins hydrolysables** : qui sont des esters d'un sucre (généralement le glucose) et d'un nombre variable de molécules d'acide phénolique (acide gallique, dans le cas des tanins galliques, ou acide hétéroxydiphénolique (HHDP), dans le cas des tannins ellagiques) ;

✚ **Tannins condensés** : qui sont formés par la condensation des unités flavan-3-ols et flavan-3-4-diols (**Vermerris et Nicholson, 2006**).

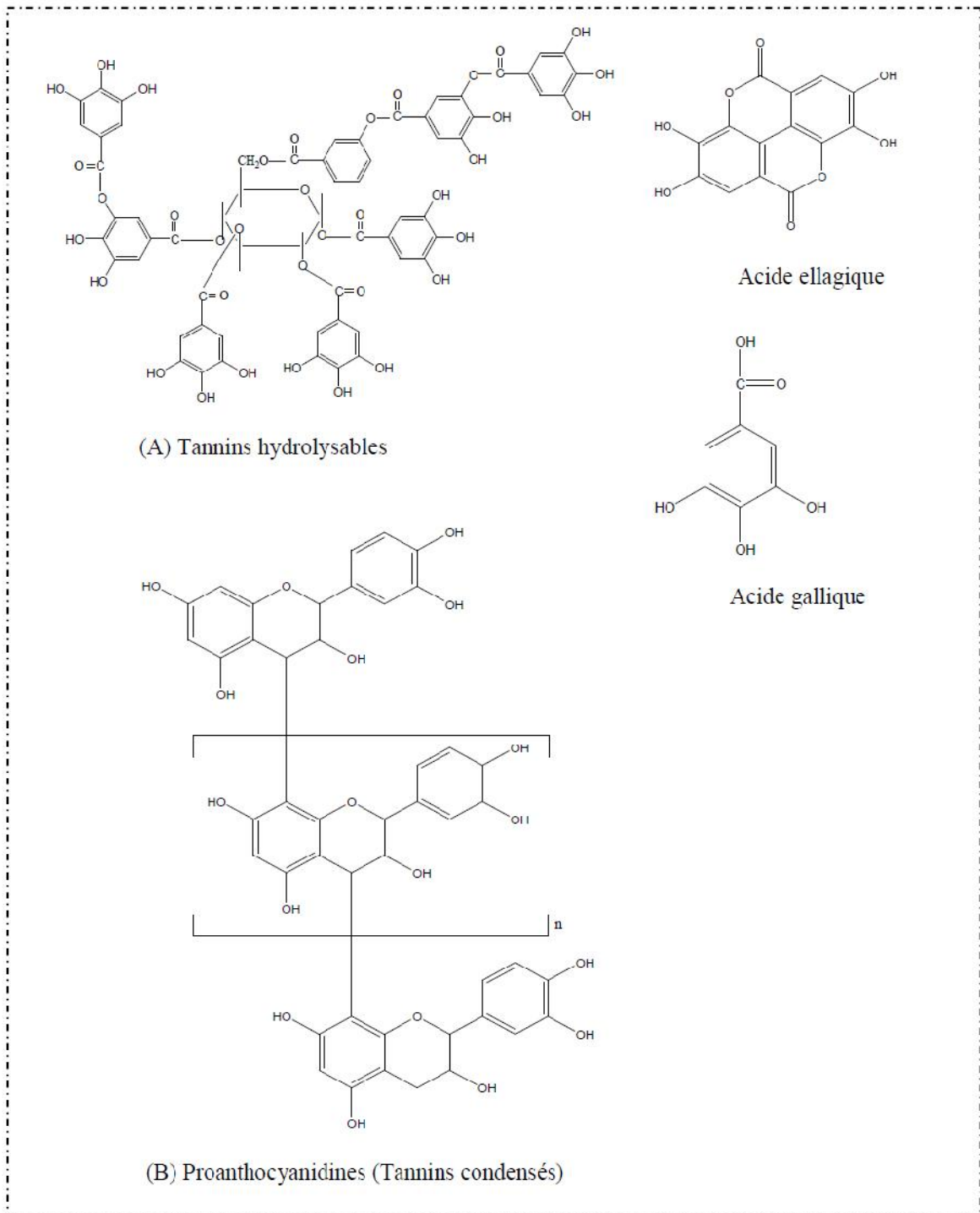


Figure 12: Structures chimiques des tannins ; (A) Tannins hydrolysables, (B) Tannins condensés (Naczki et Shahidi, 2004).

***Les coumarines :** Coumarines sont des substances phénoliques hétérocycliques oxygénées de la structure C6- C3. Elles sont isolées pour la première fois par Vogel en 1820 dans le coumarona odorat (Echevin, 1964).

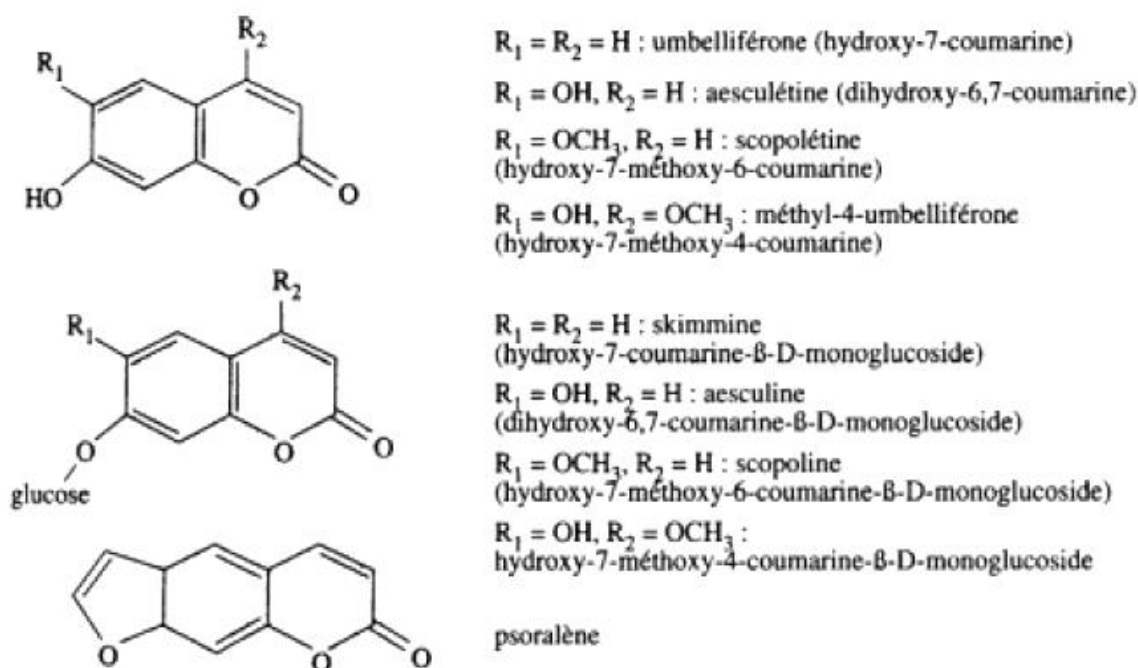


Figure 13 : Structures chimiques de quelques coumarines.(Vivas de Gaulejac, 2001).

1.5.3. Antioxydants synthétique

Il existe de nombreux antioxydants synthétiques dont les squelettes sont souvent dérivés des antioxydants naturels (Lee *et al.*, 2009). Pour une utilisation pratique, les antioxydants doivent remplir les conditions suivantes : Ils ne doivent pas être toxiques, ils doivent être hautement actifs à des faibles concentrations (0.01-0.02%) et doivent être présents à la surface ou dans la phase grasse de l'aliment (Bauer *et al.*, 2010). Cependant, il reste à les considérer comme des corps étrangers au système biologique. Parmi les polyphénols de synthèse, on peut citer à titre d'exemple : la 3,3',5,5'-Tétra-*t*-butyl-biphényl-4,4'-diol (Fig.14) qui a montré un effet protecteur des cellules neuronales (Duong *et al.*, 2008).

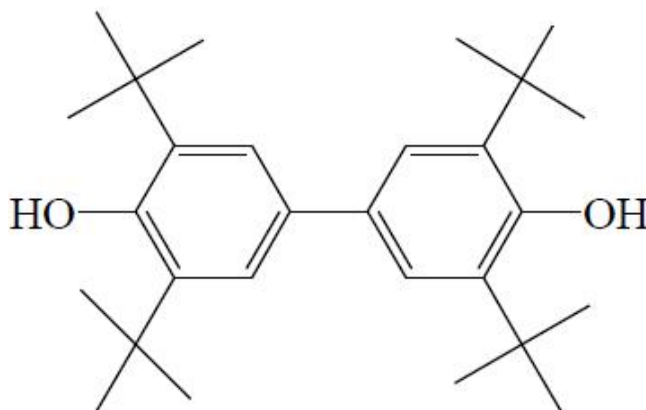


Figure 14: Structure chimique d'un polyphénol de synthèse (3,3',5,5'-Tétra-*t*-butyle-biphényl-4,4'-diol) (Duong *et al.*, 2008).

Et le polyphénol dendrimère de synthèse syringaldehyde (**Fig.15**) qui a montré une activité antioxydant puissante selon le test du DPPH qui a été respectivement deux fois et 10 fois plus fort que la quercétine et trolox. Ce polyphénol de synthèse a montré aussi un effet protecteur des LDL humain contre les attaques des radicaux libres (**Lee et al., 2009**).

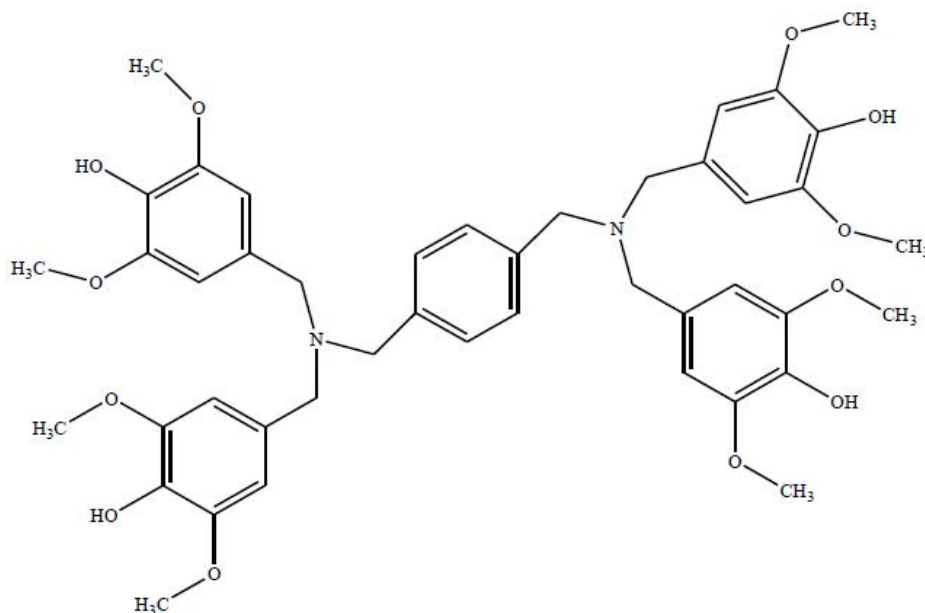


Figure 15 : Structure chimique d'un polyphénol de synthèse (Dendrimère de syringaldehyde) (**Lee et al., 2009**).

1.6 Amplification pathologique d'ERO

En raison de leur réactivité élevée, les radicaux libres interagissent avec toute une série de substrats biologiques conduisant à l'altération de l'homéostasie cellulaire de l'organisme. Le dysfonctionnement des systèmes de régulation de l'oxygène et de ses métabolites est à l'origine de phénomènes du stress oxydant dont l'importance dans de nombreuses pathologies comme facteur déclenchant ou associé à des complications lors de leur évolution est maintenant largement démontré (**Favier, 2003**). En fait, de nombreuses études, tant épidémiologiques que cliniques, indiquent que le stress oxydant est potentiellement impliqué dans le développement de plus d'une centaine de pathologies humaines différentes (**Pincemail et al., 2002**), allant de l'athérosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, cardiovasculaires, neurodégénératives et le diabète (**Tab.05**). Le rôle du stress oxydant a été également évoqué même dans des processus physiologiques tel que le vieillissement (**Sorg, 2004 ; Valko et al., 2007**).

La multiplicité des conséquences médicales de ce stress n'a rien de surprenant car, selon les maladies, celui-ci se localisera à un tissu et à des types cellulaires particuliers, mettra en jeu des espèces radicalaires différentes et sera associé à d'autres facteurs variables et à des anomalies génétiques spécifiques à chaque individu. De plus, La plupart des maladies induites par le stress

oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux avec une diminution de l'efficacité des systèmes de réparations et de dégradations des constituants oxydés (Valko *et al.*, 2007).

Tableau 05 : Les principales maladies liées à la production des radicaux libres (Pincemail *et al.*, 2002).

<i>Pathologie</i>	<i>Référence</i>
Arthrite rhumatoïde	(Ahsan <i>et al.</i> , 2003)
Athérosclérose	(Harrison <i>et al.</i> , 2003)
Cancer	(Hussain <i>et al.</i> , 2003)
Diabète	(Faure and Bonnefont-Rousselot, 2005)
Hypertension	(Touyz, 2004)
Inflammation	(Yoshikawa and Naito, 2000)
Lésions de reperfusion post-ischémique	(Zweier and Talukder, 2006)
Maladies auto-immunes	(Halliwell and Gutteridge, 1999)
Maladies d'Alzheimer, de parkinson	(Sorg, 2004)
Vieillessement	(Ferrari, 2001)

1.7. Mécanisme d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont variables, incluant le captage de l'oxygène, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la complexation d'ions et de métaux de transition. Cet intérêt à plusieurs origines; en tant que constituants alimentaires, ces antioxydants d'origine naturelle semblent contribuer de manière significative à la prévention des maladies telles que le cancer ou encore des maladies cardiovasculaires (Antwerpen, 2006).

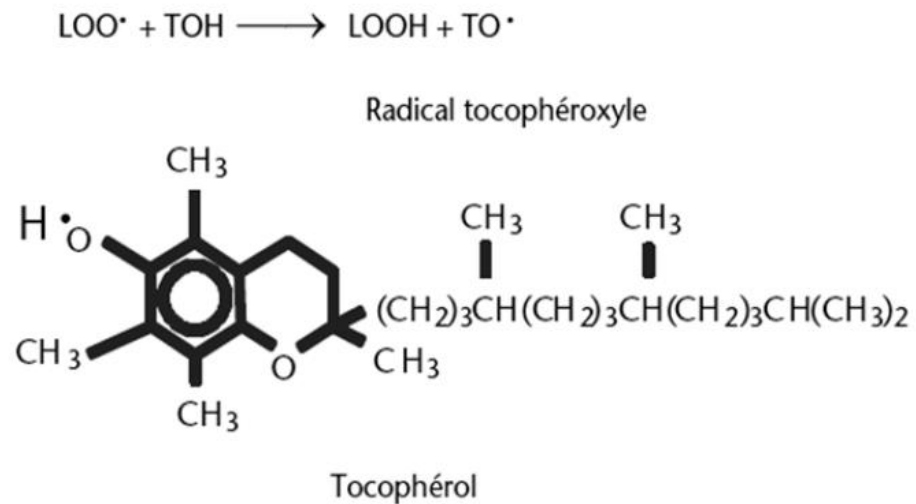


Figure 16 : Mécanisme d'action d'un antioxydant donneur d'hydrogène comme le tocophérol (Cillard et Cillard, 2006).

2. Activité antibactériennes

2.1. Définition des bactéries

Les bactéries désignent des organismes cellulaires simples, dépourvus de chlorophylle, et visibles uniquement au microscope. Elles sont des éléments, qui n'appartiennent ni au règne végétal, ni au règne animal et qui d'habitude trouvées en très grand nombre parce qu'ils peuvent se multiplier rapidement. Ce sont des procaryotes : leur ADN est contenu dans un seul chromosome qui n'est pas contenu dans un noyau. Les trois formes basiques, toutes présentes dans le sol, sont les coques (sphériques ou de forme ovale), les bacilles (en forme de bâtonnet) et les bactéries de forme spiralée. Pour l'essentiel, la bactérie se reproduit par division cellulaire, c'est-à-dire qu'une cellule se sépare en deux et donne deux cellules qui elles-mêmes se diviseront et ainsi de suite. Les bactéries pathogènes spécifiques désignent des germes qui déclenchent une infection caractéristique chez un sujet sain (Jaff et Wayne, 2008).

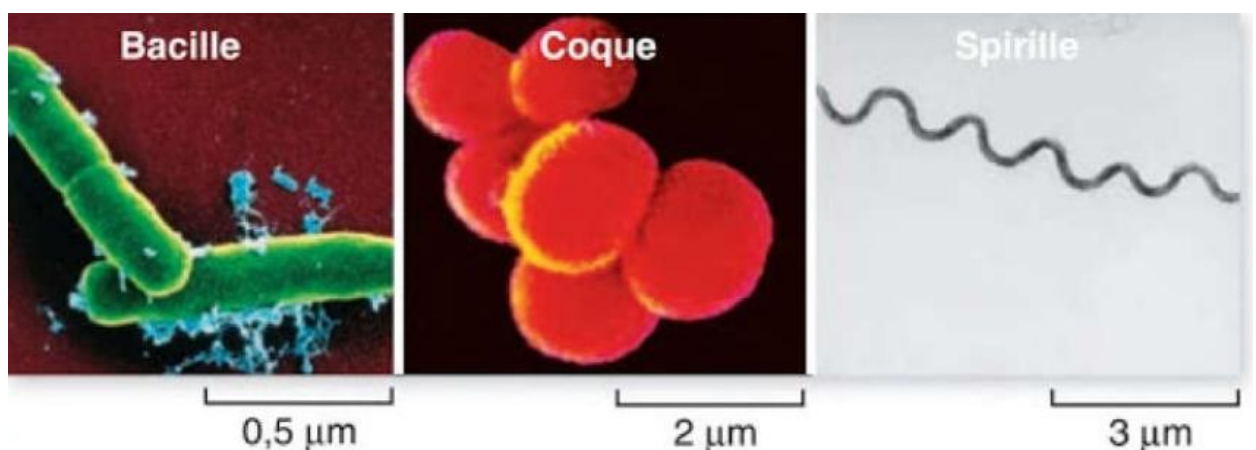


Figure 17: Formes principales de la bactérie (Johnson *et al.*, 2011).

2.2. Souches bactériennes étudiées

2.2.1. Famille des *Enterobacteriaceae*

C'est des hôtes du tube digestif de l'homme et des animaux, mais aussi de nombreuses souches de cette famille ont été isolées de l'environnement aquatique ou terrestre. Les bactéries de cette famille cultivent facilement sur milieux ordinaires et utilisent une très large variété de composés organiques simples comme source d'énergie: sucres, acides aminés, acides organiques. Elles sont anaérobies facultatives, bâtonnets, mobiles par cils péritriches ou immobiles, possédant des fimbriae appelés aussi pili communs, qui leur confèrent des propriétés hémagglutinantes, et dans certains cas, des propriétés d'adhésion aux cellules animales. La présence d'une capsule est parfois observée chez les *Klebsiella*. La plupart des Entérobactéries pathogènes se multiplient à la température optimale de 37°C (**Benzeggouta, 2005**).

2.2.1.1. *Klebsiella pneumoniae*

Les espèces du genre *Klebsiella* sont des bactéries en forme de bâtonnet et font partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. Elles se distinguent par leur immobilité constante, et leur groupement en diplobacilles. Elles sont souvent encapsulées et forment des colonies mucoïdes (**Janda et Abbott, 2006; Abbott, 2007**). Les *Klebsiella* sont ONPG positives et VP positif caractère clé ; car elles font partie du groupe "KESH" = *Klebsiella Enterobacter Serratia Hafnia*. Ces entérobactéries, sont fréquemment responsables d'infections hospitalières.

Ce genre comporte cinq espèces différenciées par des caractères biochimiques, l'espèce type est *Klebsiella pneumoniae* parce qu'elle est la plus fréquemment retrouvée en clinique humaine (**Carbonnelle et Vargues, 1987 ; Brisse et Grimont, 2006**). Cette bactérie possède toutes les caractéristiques des *Enterobacteriaceae*. C'est une bactérie commensale de l'homme et des animaux. Elle est responsable d'infections communautaires (urinaires et respiratoires) et d'infections opportunistes chez les malades hospitalisés (**Avril et al., 2000 ; Iliouer, 2010**).

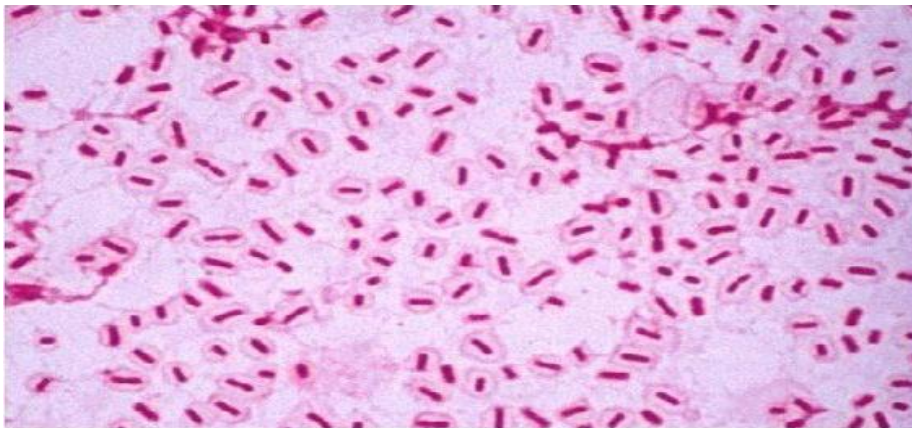


Figure 18 : Aspect microscopique (Coloration de Gram) de *Klebsiella pneumoniae* (**Boughachiche et Sebais, 2016**).

2.2.1.1.1. Classification (George *et al.*, 2004).

- Règne : *Bacteria*
- Embranchement : *Proteobacteria*
- Classe : *Gamma Proteobacteria*
- Ordre : *Enterobactriales*
- Famille : *Enterobacteriaceae*
- Genre : *klebsiella*
- Espèce : *klebsiella pneumoniae*.

Le genre *klebsiella* comporte cinq espèces dont l'espèce type est *K.p.* (**Bergogne-Berézin et Dellamonica, 1995**). L'espèce *K.p.* est subdivisée en trois sous espèce : *K. pneumoniae subsp pneumoniae*, *K. pneumoniae subsp ozaenae* et *K.pneumoniae subp Rhinoscleromatis* (**Avril et al., 2000**).

2.2.1.1.2. Habitat

Les espèces du genre *Klebsiella* sont présentes dans le monde entier, en particulier dans les régions tropicales et subtropicales. Elles sont ubiquistes, c'est-à-dire qu'on les rencontre partout, notamment dans les milieux forestiers, le sol, eaux de surface, eaux usées, effluents industriels (papeteries, minoteries, scieries, usines textiles...), le bois, les végétaux divers, les aliments et les muqueuses des espèces hôtes (**Janda et Abbott, 2006**). *Klebsiella pneumoniae* et *Klebsiella oxytoca* sont répandues dans la nature. On peut les isoler de l'eau, de végétaux, d'aliments divers. Ces deux espèces sont rencontrées dans la flore fécale de 30 à 40 % des animaux sauvages ou domestiques et de l'homme. On peut les rencontrer aussi à l'état commensal sur la peau, les muqueuses et les voies respiratoires supérieures. *Klebsiella ozaenae* et *Klebsiella rhinoscleromatis* ne sont pratiquement isolées que de l'arbre respiratoire de l'homme (**Leon et Michel, 1989**).

Le portage digestif de *Klebsiella* est plus important chez les malades hospitalisés que dans la population normale. Sur les mains du personnel et sur les objets de l'environnement dans les services hospitaliers, la présence de *Klebsiella* est très fréquente (**Fauchere et Avril, 2002**).

2.2.1.1.3. Pouvoir pathogène

Les espèces du genre *Klebsiella* sont d'importants pathogènes communs, à l'origine de pneumonies nosocomiales (7 à 14 % de tous les cas), de septicémies (4 à 15 %), d'infections urinaires (6 à 17 %), d'infections de plaies (2 à 4 %), d'infections survenant dans les unités de soins intensifs (USI) (4 à 17 %) et de septicémies néonatales (3 à 20 %) (**Janda et Abbott, 2006**). Elles peuvent également causer des bactériémies et des infections hépatiques et ont été isolées dans un grand nombre d'infections inhabituelles, notamment des cas (d'endocardite, d'abcès médiastinal

primaire gazeux, de péritonite, de cholécystite aiguë, de myonécrose crépitante, de pyomyosite, de fasciite nécrosante, d'abcès du psoas, d'infection de l'espace faciale au niveau de la tête et du cou, et d'arthrite septique) (Janda et Abbott, 2006). Ce sont également des pathogènes opportunistes importants, en particulier chez les personnes immunodéprimées.

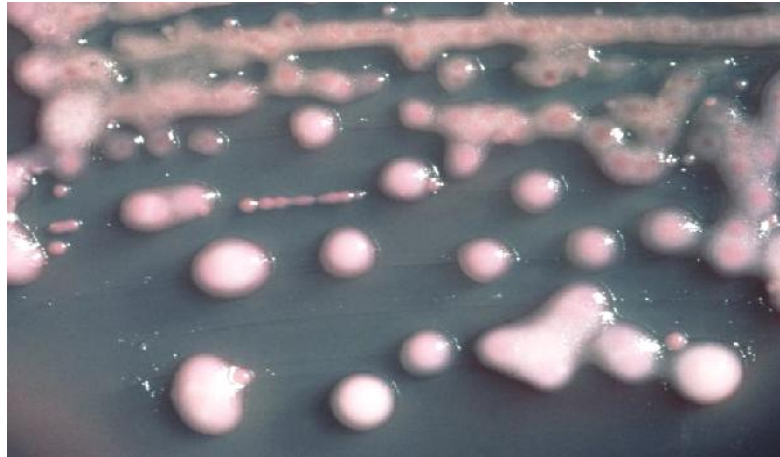


Figure 19 : Aspect macroscopique des colonies de *Klebsiella pneumoniae* sur milieu gélosé (Gueye, 2007).

2.2.2 Famille de *pseudomonadaceae*

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif, non sporulés généralement mobiles grâce à une ou plusieurs flagelles polaires, aérobie à métabolisme strictement respiratoire et chimio-organotrophes (Palleroni, 2008).

2.2.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa est un bacille droit ou incurvé, de taille 0,5 à 1 μm par 1,5 à 4 μm (Fig.20); non sporulés ; Gram négatif ; à flagelles polaires (mobile), ce genre est capable de synthétiser le film bactérien (Assous *et al.*, 1999).

Il croit très facilement sur des milieux ordinaires, car il a très peu d'exigences nutritives. Les colonies de *P. aeruginosa* sont pigmentées en vert du fait de la production de deux pigments bleu hydrosoluble, et la pyoverdine insoluble dans le chloroforme, qui est un sidérophore. Certaines souches peuvent ne produire qu'un seul pigment et moins de 1% des souches ne produisent aucun pigment (Berge *et al.*, 1988).

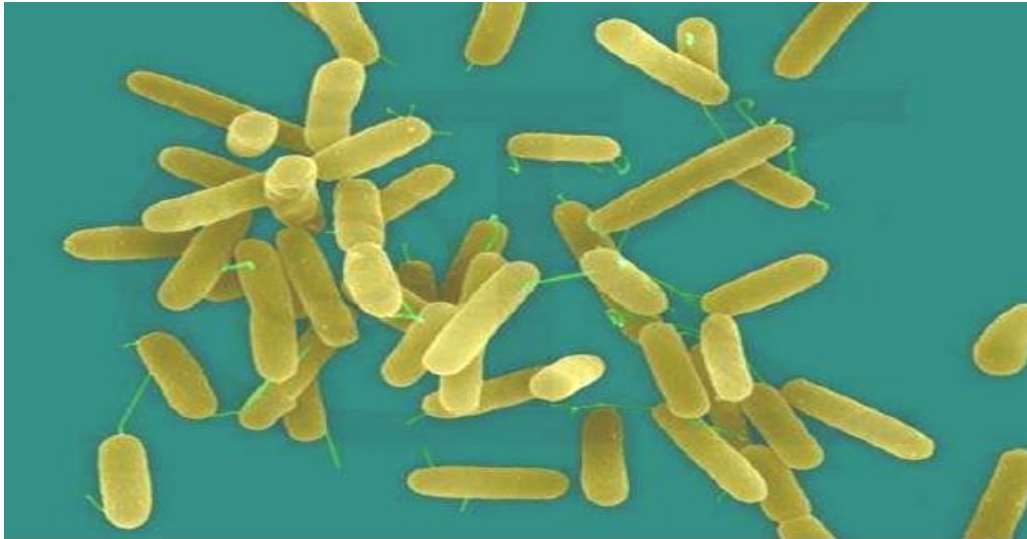


Figure 20: Aspect microscopique de *Pseudomonas aeruginosa* (G x 2400)

(Winson *et al.*, 2016).

2.2.2.1.1. Classification (Jeannot et Guillard, 2014)

- **Règne** : *Bacteria*
- **Embranchement** : *g-Proteobacteria*
- **Classe** : *Gammaproteobacteria*
- **Ordre** : *Pseudomonadales*
- **Famille** : *Pseudomonadaceae*
- **Genre** : *Pseudomonas*
- **Espèce** : *Pseudomonas aeruginosa*

2.2.2.1.2. Habitat

Ces bactéries occupent des niches écologiques variées, mais se retrouvent plus particulièrement dans les milieux humides tels que les eaux douces, les eaux de mer et les eaux thermales. Elles se retrouvent en plus petite quantité dans les eaux riches en matières organiques. Elles sont considérées comme une flore commensale chez l'homme ou l'animal. Certaines jouent un rôle pathogène dont *Pseudomonas syringae* chez les plantes et *Pseudomonas aeruginosa* chez l'homme et l'animal (Medboua, 2011).

2.2.2.1.3. Pouvoir pathogène

Les bactéries n'est pas pathogène pour le sujet normal, mais elle peut provoquer des infections parfois sévères chez les sujets dont les défenses sont amoindries. Elle peut provoquer des infections urinaires, bronchiques (en particulier chez les malades ventilés), oculaires (kératite ou endophtalmie) ostéo-articulaires. Elle peut aussi surinfecter des lésions cutanées (brulures), des plaies traumatiques ou postopératoires, provoquer des otites externes, des septicémies (en particulier chez les neutropéniques), des endocardites (chez les toxicomanes) (Nauciel *et al.*, 2006).

2.2.3. Famille des *Staphylococcaceae*

2.2.3.1. *Staphylococcus aureus*

Les *staphylocoques* sont des bactéries sphériques, qui se divisent sur plusieurs plans pour former des amas réguliers ou irréguliers en grappe de raisin, d'où leur nom (en grec *Staphylos*), ils sont immobiles et cultivent sur des milieux contenant 5% de Na Cl et pour certains jusqu'à 10 et même 15%. Ils sont aérobies ou anaérobies facultatifs.

Les staphylocoques sont des germes ubiquistes largement distribués dans l'environnement naturel de l'homme, mais ils le sont plus fréquemment et en plus forte densité sur les surfaces cutano-muqueuses des mammifères.

Il existe une certaine relation entre les espèces de staphylocoques et l'hôte qui les héberge. *S. epidermidis* est l'espèce la plus fréquente et la plus abondante sur les surfaces cutanées de l'homme. *S. aureus* est l'espèce prédominante chez l'homme et autres mammifères, la cavité nasale de l'homme est sa niche préférentielle.

Les staphylocoques ont un pouvoir pathogène opportuniste extrêmement large qui s'exerce avec une grande fréquence en milieu hospitalier. L'espèce *S. aureus*, responsable d'infections pyogènes de la peau et des muqueuses (furoncle, impétigo, staphylococcie maligne de la face, staphylococcies bulleuses, etc.), mais aussi osseuses (ostéomyélite), digestives (entérocrites post-antibiotiques), septicémiques. *S. epidermidis* un agent de plus en plus fréquent d'infections nosocomiales (Sutra *et al.*, 1998).

2.2.3.1.1. Classification (Leclerc *et al.*, 1995)

- Règne : *Bacteria*
- Phylum : *Firmicutes*
- Classe : *Bacilli*
- Ordre : *Bacillales*
- Famille : *Staphylococcaceae*
- Genre : *Staphylococcus*
- Espèce : *Staphylococcus aureus*

2.2.3.1.2. Habitat

Le réservoir naturel des staphylocoques est l'homme et les animaux à sang chaud. Cependant, éliminées dans les milieux extérieurs, ces bactéries très résistantes sont fréquemment retrouvées dans l'environnement (Fiquit, 2009).

2.2.3.1.3. Pouvoir pathogène

Staphylococcus aureus est à l'origine de toxi-infection car c'est une bactérie toxigène, elle produit entre autres des toxines thermorésistantes dans les aliments comme le lait cru de chèvre (Mami , 2013).

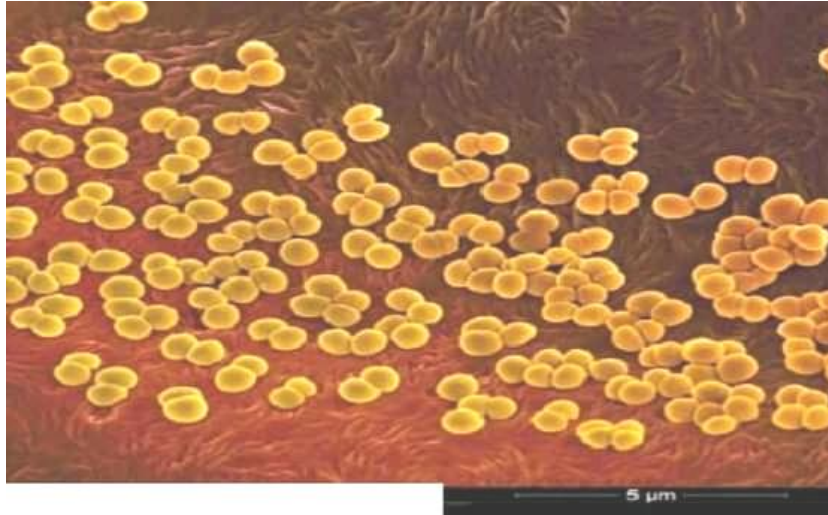


Figure 21 : Aspect microscopique de *Staphylococcus aureus* (Anonyme, 2019).

2.2.4. Familles des *Enterococcaceae*

2.2.4.1. *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis fait partie de la flore intestinale normale de l'homme et des animaux, il a été longtemps reconnu comme agent pathogène important (De Perio *et al.*, 2006).

2.2.4.1.1. Classification

- Règne : *Bacteria*
- Embranchement : *Firmicutes*
- Classe : *Bacilli*
- Ordre : *Lactobacillales*
- Famille : *Enterococcaceae*
- Genre : *Enterococcus*
- Espèce : *Enterococcus faecalis*

2.2.4.1.2. Habitat

Les entérocoques sont des micro-organismes ubiquitaires. Leur réservoir principal est le tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. Relativement résistants, ils peuvent survivre dans le sol, l'eau et les aliments contaminés par les fèces. On peut également les trouver dans l'environnement hospitalier. Chez l'homme, s'ils colonisent essentiellement le tube digestif, on peut également les trouver au niveau du périnée, du vagin, et de l'oropharynx (Pilly, 2012).

2.2.4.1.3. Pouvoir pathogène

E. faecalis est principalement responsable d'infections urinaires le plus souvent secondaires après explorations urologiques, d'endocardites évoluant sur un mode subaiguë, sur valves natives ou sur prothèses, et survenant après explorations digestives ou urologiques, d'infections intra abdominales (biliaires, etc.) de suppurations diverses. Le caractère polymicrobien des surinfections à Entérocoques est fréquent (entérobactéries et anaérobies). Comme tous les *Enterococcus*, cette espèce peut être sélectionnée par certains traitements antibiotiques (céphalosporines de 3^{ème} génération, quinolones). Les infections peuvent avoir un caractère nosocomial (Maryse et Danielle, 2007).

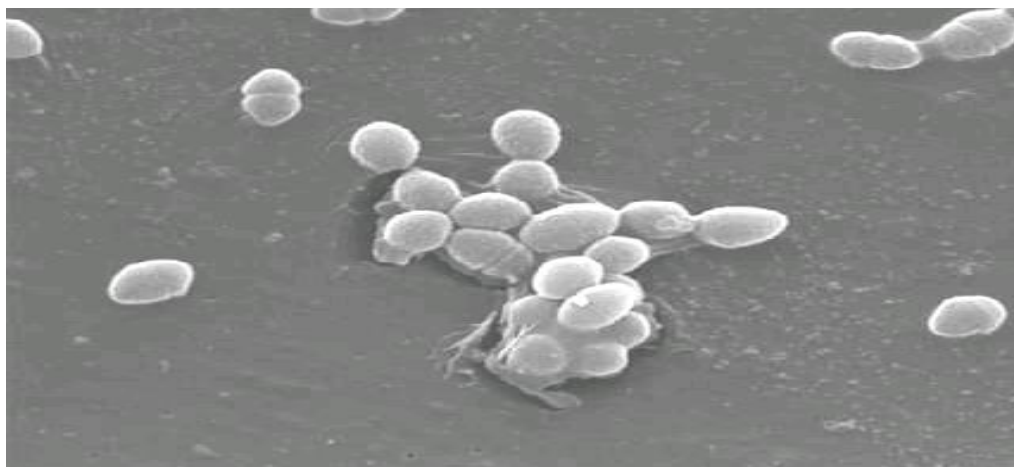


Figure 22 : Aspect microscopique d'*Enterococcus faecalis* en Microscopie Electronique à Balayage (MEB) (Berger, 2010).

2.3. Définition de l'activité antibactérienne

Les différents extraits des graines de *Nigella sativa* (aqueux, de méthanol et de chloroforme) présentent un large spectre d'inhibition vis-à-vis de nombreuses souches bactériennes (Mashhadian et Rakhshandeh, 2005). Différents extraits bruts issus de la graine ont été testés vis-à-vis de germes antibiorésistants (16 Gram négatifs et 6 Gram positifs), les alcaloïdes totaux et le décocté se sont révélés être les extraits les plus actifs, notamment à l'égard des bactéries à gramme positif (Morsi, 2000).

L'activité antibactérienne des huiles volatiles de *N. sativa* a été également démontrée sur 37 souches de *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* et *Shigella boydii* ainsi que 10 souches de *Vibrio cholerae* et *Escherichia coli* (Ferdous *et al.*, 1992). L'huile de la Nigelle possède également un pouvoir inhibiteur supérieur à celui de la gentamicine sur une vingtaine de souches de *Listeria monocytogenes* (Nair *et al.*, 2005).

2.4. Technique d'évaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits est évaluée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé «méthode de l'antibiogramme». Une suspension est inoculée sur une gélose de 4mm d'épaisseur par inondation ou écouvillonnage. Puis des disques de papier buvard ou de comprimés imprégnés de quantités connues d'antibiotiques sont déposés sur la surface de la gélose. Au cours de l'incubation, il ya une compétition entre la croissance bactérienne et la diffusion radiale de l'antibiotique qui crée un gradient de concentrations décroissantes. Après 18 à 24 heures d'incubation à 37°C, la culture délimite des zones stériles circulaires autour des disques, dont la taille est proportionnelle à la sensibilité du germe (Meyer *et al.*, 1999 ; Chevalier *et al.*, 2003).

DEUXIEME PARTIE :
ETUDE
EXPRIMENTALE

1. Objectif

Notre expérimentation a pour but d'étudier l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits aqueux (AQ) et méthanolique (MET) de *Nigella sativa* L.

L'étude phytochimique et l'activité antioxydante ont été réalisées au niveau du Laboratoire de Biochimie N02, quand à l'activité antibactérienne a été effectuée au niveau de Laboratoire de Microbiologie, Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem.

2. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est les graines de *Nigella sativa* L. une plante appartient à la famille des Renonculacées et au genre *Nigella*. Ces graines sont nettoyées pesées puis séchées (**Fig.23**).



Figure 23 : Graines de *Nigella sativa* L.

3. Micro-organisme utilisés dans les antibactériens

L'activité antibactérienne a été évaluée sur quatre (04) souches bactériennes, qui sont indiquées dans le **Tableau 06**. Ces bactéries sont des germes de référence pathogènes.

Tableau 06 : Références des souches bactériennes utilisées.

Bactéries	Souches	Références
Gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923
	<i>Enterococcus faecalis</i>	29212
Gram négatif	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	700603

Ces souches citées proviennent toutes des prélèvements au niveau du Laboratoire de Microbiologie et biologie végétale, Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem.

4. Matériel et produits de laboratoire

- 1) **Verrerie** : Béchers, tubes à essais, pipette pasteur, fioles, erlenmeyers, flacons, entonnoir, verre de montres et cuve.
- 2) **Autres matériel** : Papier filtre stérile, écouvillons, anse à platine, disques en papier stériles (6 mm), bec benzène et plaques de gel de silice.
- 3) **Milieux de culture utilisés** : Gélose Müller Hinton et bouillon nutritif.
- 4) **Appareil utilisés** : Balance, soxhlet, rotavapor, autoclave, étuve, plaque chauffante, bain marie, lyophilisateur, spectrophotomètre et plaque à UV.
- 5) **Solvant utilisés** : Eau distillée, eau physiologique, méthanol et éthanol.
- 6) **Autres réactifs** : Chlorure ferrique (FeCl_3), Acide Chlorhydrique (HCl), morceaux du magnésium (Mg^{2+}), réactif de Stiasny, butanol, acide acétique, quercétine, acide gallique, catéchine, acide sulfurique, diphényl picryl-hydrate (DPPH), Diméthylsulfoxyde (DMSO), folin ciocalteu, acide phosphomolybdique, carbonate de sodium (Na_2CO_3) et Trichlorure d'aluminium (AlCl_3).

5. Préparation des extraits Méthanolique et Aqueux

5.1. Broyage et tamisage

Les graines séchées ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique, puis tamiser pour récupérer la poudre la plus fine (**Fig.24**).

Le matériel végétal a été broyé dans un moulin électrique en une poudre très fine, pour augmenter la surface d'échange entre le solide et le solvant et faciliter l'extraction. Par la suite la poudre a été conservée dans des récipients en verre fermés hermétiquement et stockée à l'abri de la lumière pour utiliser dans notre étude.



Figure 24 : Broyage des graines de *Nigella sativa* (A : graines de *Nigella sativa* , B : poudre des graines).

5.2. Extraction méthanolique

5.2.1. Extraction méthanolique par Soxhlet

1. Placée 40 g de la poudre sèche dans une cartouche en papier filtre épais pour enfin être placée dans le réservoir de l'extraction Soxhlet et récipient contenant 500 ml de méthanol, laisser sous agitation à une température ambiante 150°C.
2. Après plusieurs cycles (6 cycles) successifs d'extraction en continu, le solvant (500ml de méthanol) contenant la matière à extraire retourne dans le ballon par déversements à travers le siphon situé dans le coude latéral.
3. L'extrait récupéré est concentré par évaporation à sec à une température de 40 à 45°C à l'aide d'un Rotavapor.
4. Le résidu récupéré est solubilisé dans la solution de DMSO à raison de 1/10.
5. L'opération est répétée plusieurs fois dans le but d'avoir un volume suffisant pour effectuer les tests *In Vitro* prévus.
6. L'extrait obtenu est conservé à 4°C et à l'obscurité (**Fig.25**).



Figure 25 : Préparation de l'extrait méthanolique par Soxhlet.

(A): Dispositifs d'extraction Soxhlet ; (B): Dispositif d'Évaporateur rotatif.

5.2.1.1. Rendement d'extrait Méthanolique (Harborne, 1998)

Le rendement de l'extrait brut est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait sec obtenue et la masse du matériel végétal traité. Ce rendement est calculé via l'équation suivante :

$$R\% = (Me/Mv) \times 100$$

R %: Rendement en %.

Me: Masse de l'extrait après l'évaporation du solvant.

Mv: Masse de la matière végétale utilisée pour l'extraction.

5.2.2. Extraction méthanolique par macération

Une prise d'essais de 37,5 g de poudre des graines de *Nigella sativa* a été mise à macérer dans 500 ml de méthanol absolu et placés sous agitation pendant 24 h. Après filtration, l'extrait à été évaporé à sec sous pression réduite à 45°C au Rotavapor (**Fig.26**) (**Bougandoura et Bendimerad, 2012**).

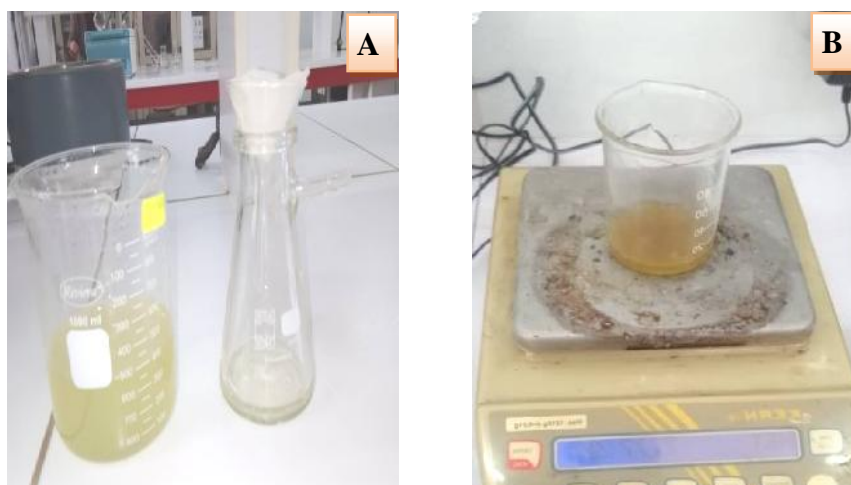


Figure 26 : Préparation de l'extrait méthanolique par macération.

(**A**): Filtration ; (**B**): Extrait méthanolique.

5.3. Extraction aqueuse

Selon la méthode de **Bougandoura et Bendimerad (2012)** modifiée, 50g de la poudre végétale (graines de *Nigella sativa*) a été mise à une extraction par macération avec 500ml d'eau distillée et placés sous agitation pendant 24H à température ambiante (environ 20°C), l'ensemble est filtré sur du papier filtre afin de séparer le marc du filtrat.

L'extrait aqueux a été lyophilisé pour le réduire en poudre (**Fig.27**). La lyophilisation permet par un processus de sublimation d'extraire l'eau d'un produit préalablement congelé. Le procédé a lieu sous vide avec une température du produit inférieure à -10°C (**Delphine, 2008**).



Figure 27 : Préparation de l'extrait aqueux. (A) : Lyophilisateur ; (B) : Résidu sec.

6. Analyse des extraits MET et AQ des graines du *Nigella sativa* L.

6.1. Analyse qualitative des extraits MET et AQ

6.1.1. Test des composés phénoliques

L'extrait brut (0,1 g) a été dissout dans 3 ml d'éthanol. 5 gouttes de FeCl_3 ont été ajoutées (**Fig.28**). Le développement de la coloration verdâtre a indiqué la présence des phénols (**Rosine et Momo, 2009**).



Figure 28 : Test des composés phénoliques.

6.1.2. Caractérisation des Flavonoïdes

A 3ml de l'extrait (2mg/ml), on ajoute 5ml d'HCl (acide chlorhydrique), puis quelques morceaux du magnésium. En présence de flavonoïdes, une couleur orange est apparue (Ciulel, 1982).

6.1.3. Caractérisation des Tanins

L'ajout de trichlorure du fer (FeCl_3) 1%, permet de détecter la présence ou non des tanins. La couleur vire au bleu noir en présence des tanins galliques, et au bleu verdâtre en présence des tanins catéchiques (tanins condensés) (Dohou *et al.*, 2003).

6.1.3.1. Différentiation des tanins

Pour identifier le type des tanins (tanins condensés et tanins hydrolysables), on procède la méthode suivante :

• Précipitation par le réactif de Stiasny

A 15 ml de l'extrait, on ajoute 8ml de réactif de Stiasny (formaldéhyde à 30%; 2 volumes + HCl concentré; 1 volume), on chauffe le mélange au bain-marie à ébullition pendant 30min. On note la présence de précipités, donc la présence des tanins condensés. On filtre, puis au filtrat on ajoute l'acétate de sodium jusqu'à saturation. Ensuite on met quelques gouttes de FeCl_3 à 2% (Fig.29). On obtient une coloration bleu-noire, ce qui signifie la présence des tanins hydrolysables (Mamadou, 2002).



Figure 29 : Test de différenciation des tanins (Tanins condensés et tanins Hydrolysables).

6.1.4. Chromatographie sur couche mince

Pour une caractérisation de l'extrait (MET et AQ) du *Nigella sativa* L., on utilise la chromatographie sur couche mince, cette technique de séparation basée sur l'utilisation d'une phase mobile (solvant) le long d'une phase stationnaire (Gel de silice), dont la séparation dépend des phénomènes d'adsorption et de partage. L'analyse des extraits du *Nigella sativa* L. a été réalisée sur des plaques de gel de silice avec indicateur de fluorescent (20x20cm, 60 F254), selon la méthode de **Diallo et al. (2004)** avec quelques modifications. Chaque extrait est dissous dans son solvant d'origine.

L'analyse de l'extrait polaires MET et AQ est effectuée par un système de séparation BAW (Butanol/Acide acétique/Eau) avec des proportions (60/15/35). 5 µl d'extrait (10mg/ml) et des standards quercétine, acide gallique et vanilline (2mg/ml) sont déposés et la plaque est ensuite introduite dans la chambre de migration préalablement saturée par la vapeur de la phase mobile (**Fig.30**). Après migration, les plaques sont séchées, puis visualisées par les systèmes de révélation :

- Révélation physique sous UV à 254nm ;
- Révélation chimique par une solution de l'acide sulfurique 50ml/eau 50ml.

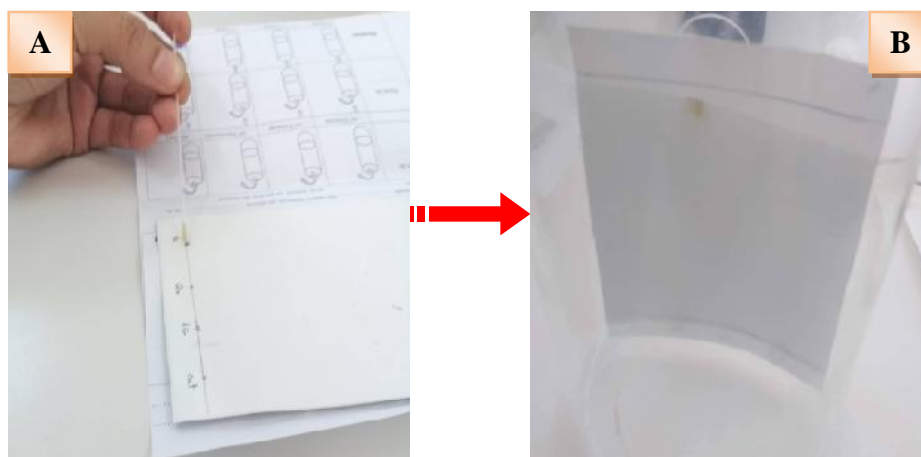


Figure 30 : Chromatographie sur couche mince.

(A): Dépôt des échantillons ; (B): Disposition de chromatographie sur couche mince.

• **Révélation par une solution de DPPH**

Les rapports frontaux (RF) des spots issus de la séparation sont calculés (le rapport frontal est le rapport entre la distance parcourue par la tâche et celle du solvant) (**Fig.31 et 32**).

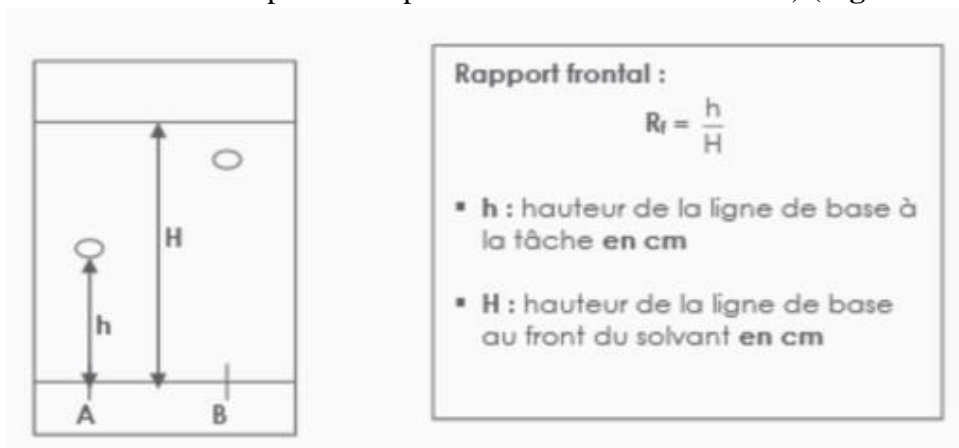


Figure 31 : Méthode de calcul le rapport frontal.

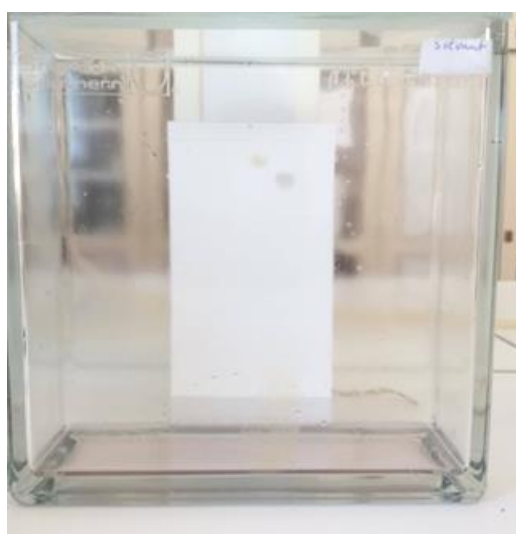


Figure 32 : Révélation par solution de DPPH.

6.2. Analyse quantitative des extraits MET et AQ

6.2.1. Dosages des composés phénoliques

Le dosage des polyphénols totaux dans les extraits des graines est effectué selon la méthode de Folin ciocalteu (**Wong *et al.*, 2006**).

• Principe

Le réactif de Folin Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$), il réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (**Boizot et Charpentier, 2006**). Brièvement, 200 μ l de l'extrait (4mg/ml) est ajouté à 1ml du réactif de Folin Ciocalteu (dilué 10 fois par l'eau distillée). Après 4 min, 800 μ l de Na_2CO_3 (75g/l) sont ajoutés, après agitation, l'ensemble est incubés à l'ombre pendant 2 heures. L'absorbance est lue à 765nm par un spectrophotomètre.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-200 μ g/ml) (**Fig.33**).

Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent d'acide gallique par un milligramme de l'extrait (μ g Eq AG/mg d'extrait).

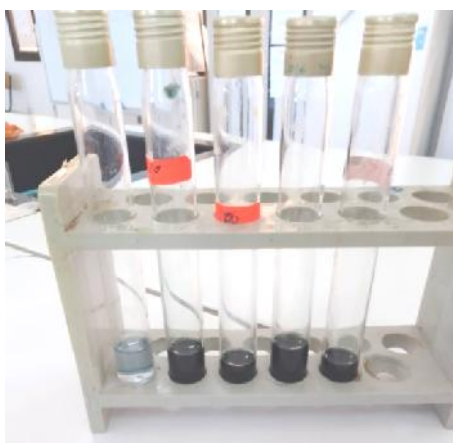


Figure 33 : Différentes concentrations d'acide gallique.

6.2.2. Dosage des Flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les deux extraits (MET et AQ) (Bahorun *et al*, 1996).

• Principe

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium. Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1972). 1ml l'échantillon et du standard (préparé dans le méthanol pour l'extrait MET et dans le l'eau distille pour l'extrait AQ) est ajouté à 1ml de la solution d'AlCl₃ (2% dans le méthanol). Après 10 min, les concentrations des flavonoïdes sont déduites à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0-35 µg/ml) et sont exprimées en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg d'extrait) (Fig.34).

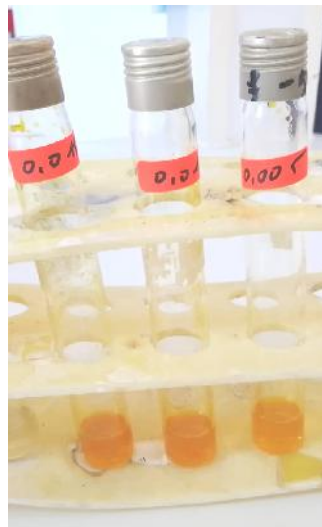


Figure 34 : Différentes concentrations quercétine.

7. Activités biologiques

7.1. Activité antioxydant

7.1.1. Effet Scavenger du radical DPPH

De point de vue méthodologique, le test du radical libre DPPH est recommandé pour des composés contenant SH, NH et OH groupes (Salah *et al.*, 1995). Il s'effectue à température ambiante, ceci permettant d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles. Le test est largement utilisé au niveau de l'évolution des extraits hydrophiles très riches en composés phénoliques (Yi-Zhong *et al.*, 2006 ; Hatzidimitriou *et al.*, 2007).

L'activité antiradicalaire des différents extraits à tester a été déterminée selon la méthode de Sanchez-Moreno (2002) qui utilise le DPPH comme un radical libre relativement stable qui absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 517 nm. La technique consiste à mettre le radical libre DPPH (de couleur violette), en présence de l'antioxydant (extraits polyphénoliques) va être réduit et vire vers le jaune (Fig.35 et 36). Ce changement se traduit par une diminution de l'absorbance. La réaction de DPPH est représentée dans la figure suivante :

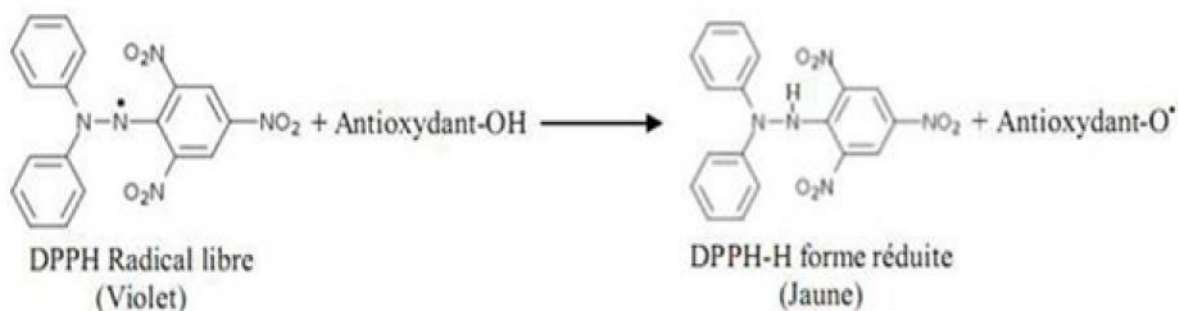


Figure 35 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.

La solution du DPPH est préparée à l'avance par solubilisation de **2,4 mg** de DPPH dans **100ml** de méthanol absolu. 25µl de l'extrait à différentes concentrations sont ajoutés à 975µl de DPPH. Des solutions d'antioxydants de référence (acide ascorbique-BHT) sont également préparées dans les mêmes conditions pour servir de témoin positif. Le témoin négatif est constitué uniquement de DPPH et du méthanol. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min jusqu'à décoloration. Le dosage est réalisé par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 517 nm. Le pourcentage de l'activité antiradicalaire est estimé selon l'équation ci-dessous :

$$\% \text{ l'activité Antiradicalaire} = [(A1-A2)/A1] \times 100$$

A1 : Absorbance du témoin négatif sans extrait ;

A2 : Absorbance en présence de l'extrait.

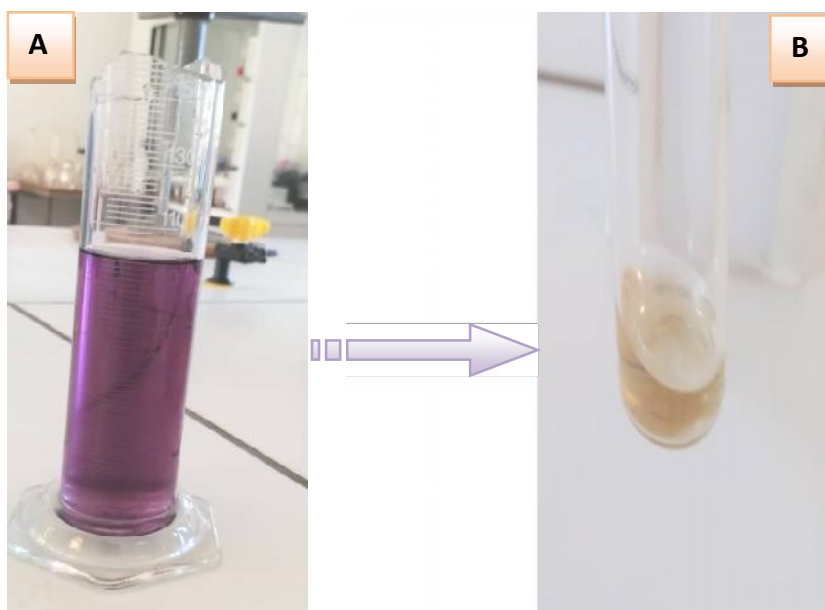


Figure 36 : Test de l'activité antiradicalaire de l'extrait des graines de *Nigella sativa* L.
(A): Solution de DPPH ; (B): Extrait + Solution de DPPH).

• Détermination de la CI₅₀

Les concentrations en extraits, en acide ascorbique et en quercétine, en fonction des pourcentages du DPPH inhibé, ont été tracées à la fin de la réaction afin d'obtenir la concentration inhibitrice médiane (CI₅₀). Ce paramètre est défini comme la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du DPPH initiale de 50 % (Sharififar *et al.*, 2007).

7.2. Activité antimicrobienne

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode de diffusion de disque où les disques sont imbibés de 10µl de chaque extrait (Sokmen *et al.*, 2004).

7.2.1. Préparation et choix de milieux de culture

7.2.1.1. Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture approprié à cette étude est le milieu Muller-Hinton préparé comme suit: Dissoudre 38 g de la gélose Muller-Hinton dans un litre d'eau distillée. Faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète, puis autoclaver pendant 15 minutes à 121°C et finalement couler le milieu dans les boîtes de Pétri.

7.2.1.2. Stérilisation du matériel

L'eau distillée, le milieu de culture, les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes et les disques en papier Wattman (6 mm de diamètre) enrobés dans du papier aluminium ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

7.2.1.3. Préparation des dilutions d'extraits de *Nigella sativa* L.

Les extraits de *Nigella sativa* L. (préparé dans DMSO pour l'extrait MET et l'extrait AQ) Pour préparer les différentes concentrations avec des dilutions successives au demi, sachant que la concentration de la solution mère de chaque extrait est de 10 mg/ml (Tab.07 et Fig.37).

Tableau 07 : Différentes concentrations utilisées pour préparation des dilutions.

Concentrations	Extraits MET et l'extrait AQ (mg /ml de DMSO)
1	100
2	50
3	25
4	12,5
5	6 ,25

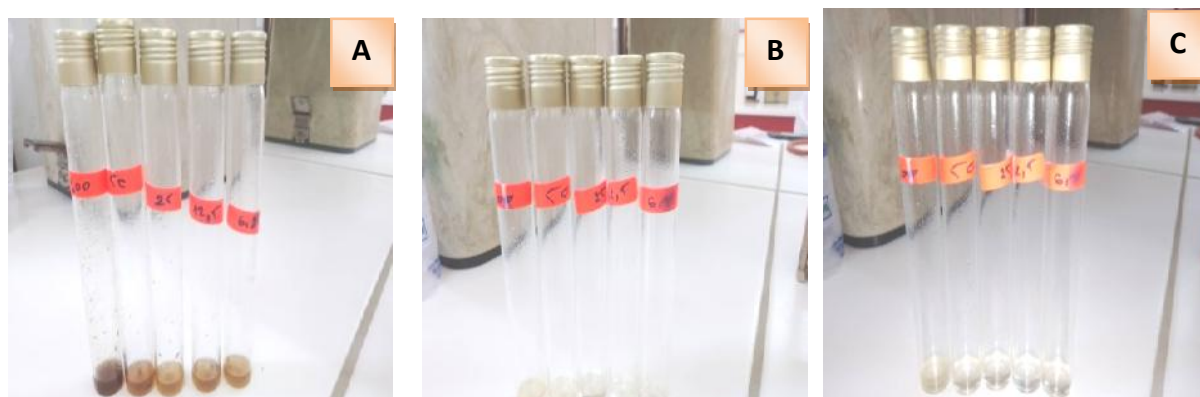
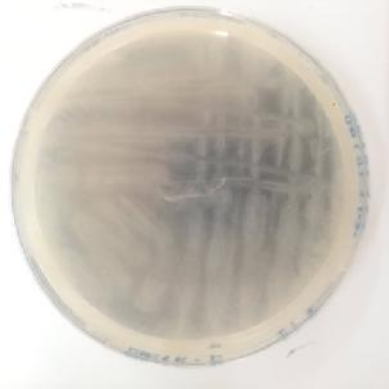
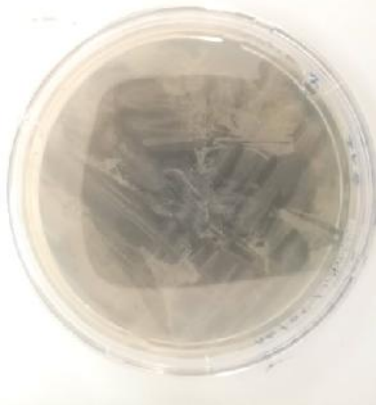
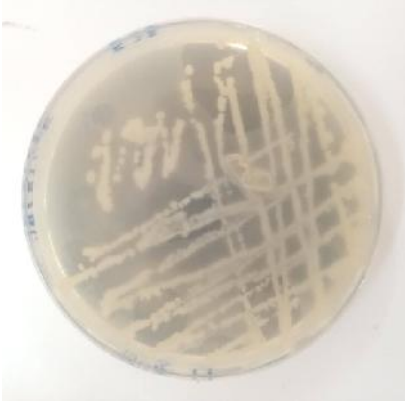
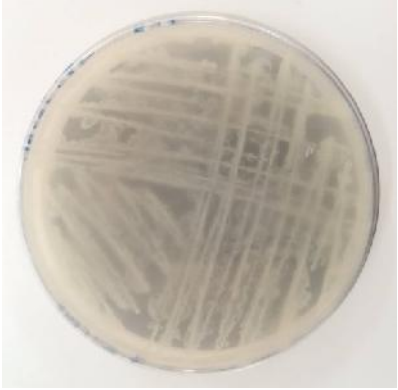


Figure 37 : Différentes dilutions de l'extrait de *Nigella sativa* L.
(A) : Dilutions de l'extrait AQ ; (B): Dilutions de l'extrait METI ;
(C): Dilutions de l'extrait METII.

7.2.1.4. Préparation de l'inoculum

Les souches bactériennes sontensemencées dans la gélose nutritive et incubées à 37°C pendant 24h, pour optimiser leur croissance. On racle à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester. Décharger l'anse dans 10 ml l'eau physiologique stérile, La suspension bactérienne est bien homogénéisée, son opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Farlandou à une DO de 0.8 à 0.1 à 600 nm. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort (Tab.08).

Tableau 08 : Souches bactériennes testées.

	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus,</i>

7.2.3. Etude de l'activité d'un principe actif sur une souche bactérienne

La méthode des disques consiste à poser sur la surface d'un milieu gélosé ensemencé de micro-organismes, des disques de papier filtre desséchés et imprégnés des substances à tester. Les disques sont déposés à égale distance l'un de l'autre. Les substances contenues dans les disques diffusent dans le milieu et peuvent influencer la croissance des micro-organismes. Au bout de 24 heures d'incubation selon **Rotsart et Courtejoie (1984)** ou de 36 heures d'après **Bourret (1978)**, un cercle d'activité (zone d'inhibition) de chaque disque est observé dans le milieu qui entoure ce disque.

Suivant l'efficacité de la substance sur le germe en question, une surface plus ou moins étendue peut être vue, où les colonies microbiennes ont disparu. Il peut être choisi avec quasi-certitude le traitement le plus efficace (**Rotsart et Courtejoie, 1984**).

7.2.3.1. Préparation des disques

Les disques ont été préparés à partir d'un papier Wattman (6mm de diamètre) par l'emporte-pièce. Ces disques ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

7.2.3.2. Ensemencement et dépôt des disques

15 ml de la gélose MH est coulé dans des boîtes de Pétri. Après le refroidissement et solidification du milieu de culture sur la paillasse, on a trempé un écouvillon dans la suspension et on a étalé la surface entière de la gélose Mueller Hinton à trois reprises, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application dont le but d'avoir une distribution égale de l'inoculum, puis on laisse sur la paillasse pendant 30 minutes (**Fig.38**).



Figure 38 : Ensemencement des bactéries.

Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, les disques imprégnés d'extraits des graines de *Nigella sativa* (5 disques/boîte) et les disques témoins (1disques/boîte), sont déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile. Finalement, les boîtes de Pétri sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C (**Fig.39**).

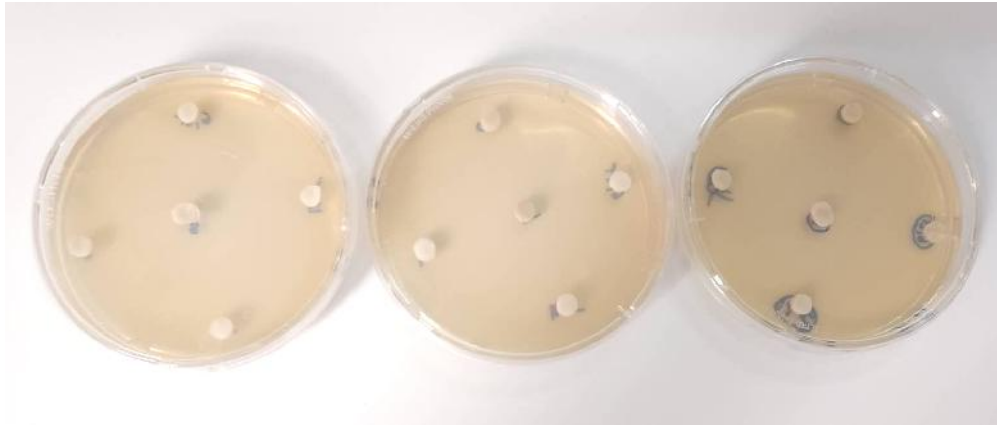


Figure 39 : Dépôt des disques.

7.2.3.3. Expression des résultats

L'activité antibactérienne est appréciée par la mesure à l'aide d'un pied à coulisse des diamètres des zones d'inhibition (mm) formées autour des disques. La sensibilité des bactéries cibles envers les différents composés est classée selon les diamètres des halos d'inhibition. Chaque essai est répété trois fois.

Selon **Konan *et al* (2014)**, les diamètres des zones d'inhibitions de l'activité antibactérienne sont rangés en 4 classes à savoir :

- 1) Non sensible (-) ou résistante : diamètre <8 mm ;
- 2) Sensible (+) : diamètre compris entre 8 à 14 mm ;
- 3) Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 20 mm ;
- 4) Extrêmement sensible (+++) : diamètre >20 mm.

1. Détermination du rendement d'extrait Aqueux et Méthanoliques des graines de *Nigella sativa* L.

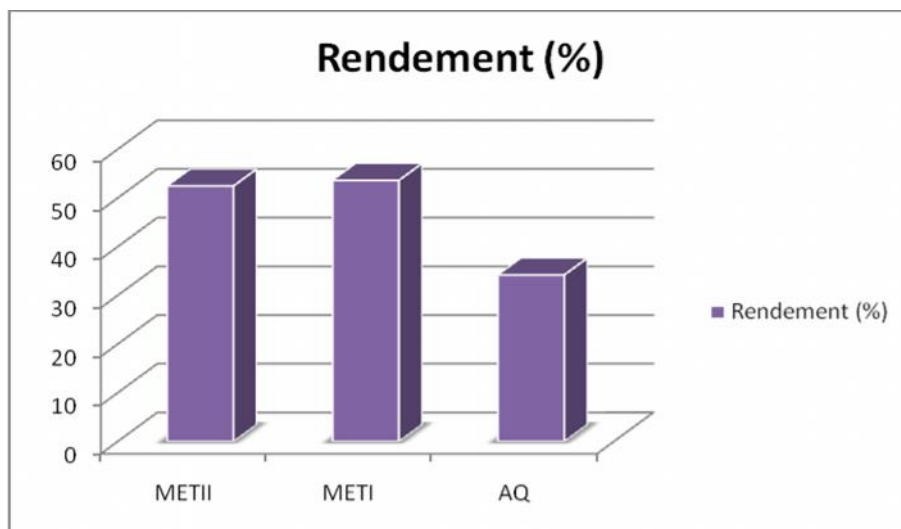


Figure 40 : Rendement des extraits aqueux et méthanoliques des graines de *Nigella sativa* L.

Le rendement d'extraction est exprimé en pourcentage de masse des graines analysées, le rendement le plus élevé a été observé dans l'extrait méthanolique par Soxhlet, par rapport à l'extrait méthanolique par macération et aqueux qui sont moins élevés.

D'après la **Figure 40**, on a enregistré que le rendement de l'extraits méthanolique par macération des graines de *Nigelle* est voisin à 52.45%, ils contiennent des quantités importantes en métabolites secondaires de type phénoliques, **Mahi (2016)** a rapporté des teneurs de 23.25%. Quant à le rendement de l'extrait méthanolique par Soxhlet est égale à 53.6%. Nos résultats se rapprochent avec ceux trouvés par **Aliouat et Boulkelia (2014)** qui ont rapporté des teneurs de 66.76%. Pour le rendement de l'extrait aqueux des graines de *Nigella sativa* on a enregistré un taux de 34.18%. Les mêmes résultats on été rapportés par **Elalaoui (2014)** avec une teneur de 31%.

Il est important de souligner que la méthode utilisée (le choix des solvants), ainsi que les conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée (à chaud ou à froid), affectent tous le contenu total en métabolites secondaires, et par conséquent affecte les activités biologiques médiées par ces métabolites (**Lee et al., 2003**). En plus de ces aspects quantitatives, quelque soit la méthode d'extraction appliquée elle doit tenir compte de la qualité d'extrait, autrement dit de la bio-activité de ces principes actifs. Dans la présente étude, la méthode de macération sous agitation permet d'accélérer le processus d'extraction et de minimiser le temps de contact du solvant avec l'extrait tout en préservant la bio-activité de ses constituants. De même, le déroulement de cette extraction à température ambiante ainsi que l'épuisement du solvant à pression réduite permet d'obtenir le maximum des composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction (**Meziti, 2009**).

2. Analyse des extraits aqueux et méthanoliques des graines de *Nigella sativa* L.

2.1. Analyses qualitatives de l'extrait AQ et MET

2.1.1. Tests préliminaires

Les tests phytochimiques, réalisés sur les différents modes d'extractions, préparés dans différents solvants des trois extraits aqueux et méthanoliques des graines de *Nigella sativa*, ont permis de détecter les différentes familles des métabolites secondaires présents dans l'espèce étudiée. Dans ce travail cinq (05) composés secondaires ont été analysés et qui sont résumés dans les tableaux suivants :

Tableau 09: Résultats des tests préliminaires de quelques métabolites secondaires de l'extrait METII de *Nigella sativa* L.

Métabolite testé	Réactif	Résultat
Composés phénoliques	Ethanol, FeCl ₃	+++
Flavonoïdes	HCl, Mg	+++
Tanins	FeCl ₃	+++
Tanins condensés	Stiasny FeCl ₃	+++ +++
Tanins hydrolysables	Acétate de sodium, FeCl ₃	+++

+++ : Fortement positif ; + : Faiblement positif.

D'après les résultats dans le **tableau 09**, nous avons observé un changement de couleur pour l'extrait méthanolique par macération (METII) des graines de *Nigella sativa*, ce qui indique la présence et la richesse de cet extrait en : polyphénols, flavonoïdes et en tanins condensés et hydrolysables.

Tableau 10: Colorations obtenues par le criblage sur l'extrait METII.






Composé recherché	Couleur	<i>Nigella sativa</i> L
Composés phénoliques	Bleu verdâtre	
Flavonoïdes	Rouge brique	
Tanins	Bleu noire	
Tanins condensés	Précipité noir	
Tanins hydrolysables	Bleu noire	

Tableau 11: Résultats des tests préliminaires de quelques métabolites secondaires de l'extrait METI de *Nigella sativa* L.

Métabolite testé	Réactif	Résultat
Composés phénoliques	Ethanol, FeCl ₃	+++
Flavonoïdes	HCl, Mg	+
Tanins	FeCl ₃	+
Tanins condensés	Stiasny	+
	FeCl ₃	+
Tanins hydrolysables	Acétate de sodium, FeCl ₃	+

+++ : Fortement positif ; + : Faiblement positif.

D'après les résultats dans le **tableau 11**, nous n'avons observé un fort changement de couleur pour les composés phénoliques dans l'extrait méthanolique par Soxhlet (METI) des graines de *Nigella sativa*, et un faible changement de couleur pour les flavonoïdes et les tanins.

Tableau 12: Colorations obtenues par le criblage sur l'extrait METI.


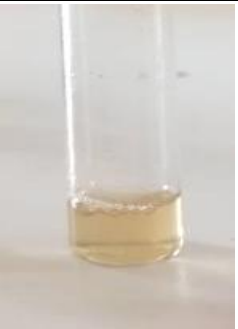

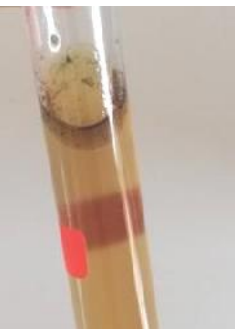

Composé recherche	Couleur	<i>Nigella sativa L.</i>
Composés phénoliques	Verdâtre	
Flavonoïdes	Jaune	
Tanins	Jaune foncé	
Tanins condensés	Précipité noir	
Tanins hydrolysables	Rouge brique	



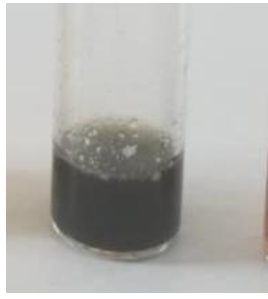
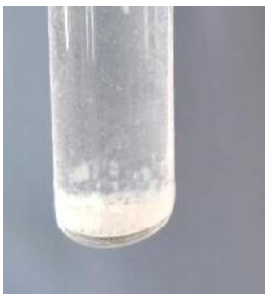

Tableau 13: Résultats des tests préliminaires de quelques métabolites secondaires de l'extrait AQ de *Nigella sativa* L.

Métabolite testé	Réactif	Résultat
Composés phénoliques	Ethanol, FeCl ₃	+++
Flavonoïdes	HCl, Mg	++
Tanins	FeCl ₃	+++
Tanins condensés	Stiasny	++
	FeCl ₃	+++
Tanins hydrolysables	Acétate de sodium, FeCl ₃	++

+++ : Fortement positif ; + : Faiblement positif.

D'après les résultats dans le **tableau 13**, nous avons observé un changement de couleur pour l'extrait aqueux (AQ) des graines de *Nigella sativa*, ce qui indique la présence et la richesse de cet extrait en : polyphénols, flavonoïdes et en tanins condensés et hydrolysables.

Tableau 14: Colorations obtenues par le criblage sur l'extrait AQ.

Composé recherche	Couleur	<i>Nigella sativa L</i>
Composés phénoliques	Verdâtre	
Flavonoïdes	Orange	
Tanins	Bleu noire	
Tanins condensés	Précipité blanc	
Tanins hydrolysables	Marron	

On comparant les résultats des tests phytochimiques effectués sur les trois extraits des graines de *Nigella sativa*, on constate qu'il existe une différence basée sur la présence ou l'absence de la couleur identifiant le composé en question. D'après les résultats de **Randerath (1971)** en remarque que la présence des flavonoïdes est faible par rapport de nos résultat, dans la deuxième étude réalisé par **Rizk (1982)**, on peut découvrir une incohérence dans le résultats des tanins par rapport à nos résultat.

Pour l'extrait méthanolique (METII), le test a révélé une forte réaction vis-à-vis des polyphénols, flavonoïdes et des tanins condensés et hydrolysables par contre l'extrait méthanolique (METI) a réagi moyennement avec les réactifs vis-à-vis ces métabolites sauf pour les composés phénoliques. En ce qui concerne l'extrait aqueux (AQ), les réactions chimiques effectuées avec les réactifs, ont révélé une forte présence des polyphénols et des tanins et une moyenne présence des flavonoïdes, ce qui s'oppose aux résultats de **Kaddouret Benbarek (2018)**, qui ont révélé une faible présence des tanins et des flavonoïdes dans des extraits des graines de *Nigella sativa*.

Le test phytochimique qui a été réalisés sur les trois extraits des graines de l'espèce étudiée, montre qu'elles ne sont pas identiques cependant de point de vue qualitatif, l'extrait aqueux (AQ) et méthanolique (METII) des graines de *Nigella sativa* sont plus riches en métabolites secondaires que l'extrait méthanolique (METI), ce qu'est exprimer par l'intensité de la différence de la coloration (le plus foncé c'est le plus riche), cela est dû aux conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée (à chaud ou à froid), affectent tous le contenu total en métabolites secondaires.

2.1.2. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Par ses faibles contraintes techniques, son emploi simple et son coût modeste, la CCM est un outil de choix pour l'analyse phytochimique de routine d'extraits bruts, de fractions, ainsi que de produits purs isolés.

Pour avoir une empreinte polyphénoliques de nos trois extraits des graines de *Nigella sativa*, une chromatographie analytique sur couche mince a été réalisée en utilisant un système solvant moyennement polaire (BAW) Butanol/Acide acétique/Eau (60/15/35) (v/v/v), sous lumière UV à 366nm, et après une révélation chimique par l'acide sulfurique et le DPPH, les différentes taches de produits qui se présentent sur les chromatogrammes ont été délimitées. Les standards utilisés sont des composés phénoliques : la quercétine, l'acide gallique et la vanilline (**Fig.41**).

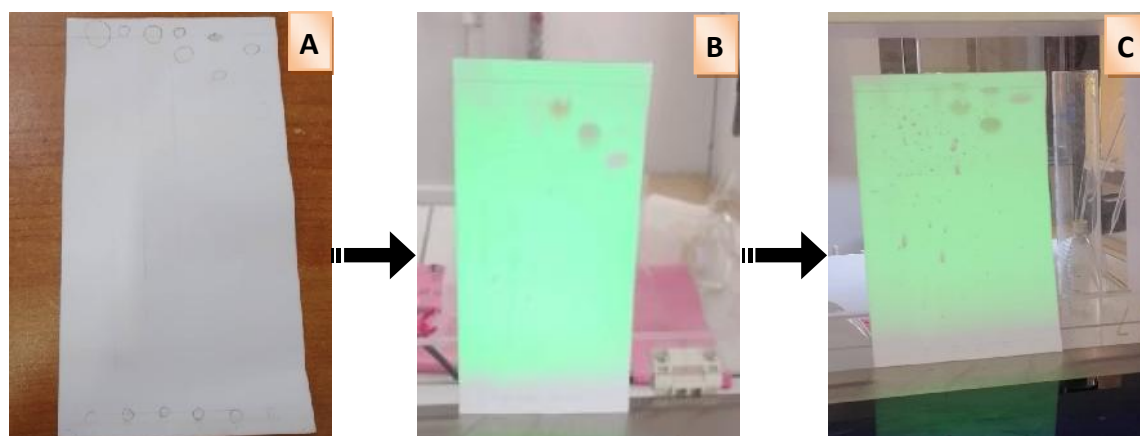


Figure 41 : Chromatographie sur couches minces des extraits de graines des *Nigella sativa* L.
 (A): Révélation par l'acide sulfurique ; (B) : Révélation sous UV à 366nm ;
 (C) : Révélation par DPPH sous UV à 366nm.

Tableau 15 : Rapports frontaux des spots issus de la séparation des deux extraits aqueux (AQ) et méthanolique (METI et METII) des graines de *Nigella sativa* ainsi que ceux des témoins utilisés.

Standard	Révélation par l'acide sulfurique	Révélation sous UV à 366nm.	Révélation par DPPH sous UV à 366
	Rf		
METII	0.918 0.978	0.848	0.36 0.67 0.76
METI	0.994	0.924	/
AQ	0.983	0.945	0.43 0.72 0.82 0.87
Acide gallique	0.98 0.84	0.98 0.84	0.98 0.84
Quercétine	0.97 0.92	0.97 0.92	0.97 0.92
Vanilline	/	0.82	0.918

Suite à l'observation sous la lampe UV (366 nm), la comparaison des Rfs des spots issus de la séparation des extraits avec ceux des témoins utilisés permet d'avoir une idée sur les composés présents dans les graines de *Nigella sativa*. La quercétine et l'acide gallique (Rf : 0.97 et 0.95) sont probablement présents dans l'extraits METI, METII et AQ. (Rf : 0.91) est probablement présent dans METII et AQ. Les couleurs des spots et leurs Rf, nous ont permis de révéler la présence des flavonoïdes de types flavonols (quercétine) et les composés phénoliques ont été identifiés, dont l'acide vanillique et l'acide gallique.

D'après la bibliographie, très peu de travaux se sont intéressés aux composés phénoliques des graines de *Nigella sativa*. **Merfort et al (1997)** ont pu identifier trois flavonoïdes glycosylés dans les graines de la nigelle; quercétine 3-glycosyl (1 2) galactosyl (1 2) glucoside, kœmpférol 3-glycosyl (1 2) galactosyl (1 2) glucoside et quercétine 3- (6-feruloglycosyl) (1 2) galactosyl (1 2) glucoside.

Par ailleurs, l'étude analytique par HPLC menée par **Mariod et al (2009)** sur l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux des graines de *Nigella sativa* a permis d'identifier trois composés polyphénoliques ; l'acide hydroxybenzoïque , l'acide syringique et l'acide p-coumarique. Enfin, **Bourgou et al (2008)** ont analysé la composition phénolique des racines et des tiges de *Nigella sativa* par HPLC, quarante composés phénoliques ont été identifiés, dont les plus abondants sont l'acide vanillique, l'acide gallique, l'acide trans-cinnamique, la catéchine, la quercétine et l'apigénine.

2.2. Analyses quantitatives de l'extrait AQ et MET

2.2.1. Dosage des polyphénols

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau 16** et déterminés à partir des courbes d'étalonnages linéaires de l'acide gallique pour les polyphénols et la catéchine pour les flavonoïdes (**Annexe.03**).

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-200 µg/ml). Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent d'acide gallique par un milligramme de l'extrait (µg Eq AG/mg d'extrait).

La teneur des polyphénols totaux dans les extraits des graines du *Nigella sativa* montre que l'extrait AQ contient une teneur élevée avec 2.35 µg Eq AG/mg d'extrait suivi par l'extrait METI avec 0.82 µg Eq AG/mg d'extrait et enfin une teneur minimale est enregistrée par l'extrait METII avec 0.058 µg Eq AG/mg d'extrait (**Tab.16**).

Tableaux 16 : Teneur en polyphénols totaux dans les extraits des graines de *Nigella sativa* L.

Extrait	Teneur des polyphénols (µg Eq AG/mg d'extrait)
METII	0.058 ± 0.0047
AQ	2.35 ± 0.042
METI	0.82 ± 0.00083

Les valeurs des phénols totaux dans les extraits METI et AQ sont plus faibles que les teneurs trouvées par **Talbi et al. (2014)** ($163.33\mu\text{g}/\text{mg}$) et ($163,32\mu\text{g}/\text{mg}$) dans l'extrait aqueux de la nigelle. De même la valeur du dosage des polyphénols de l'extrait METII est équivalente que celle trouvée par **Djammel et Bouzidi (2017)** ($1.11\mu\text{g}/\text{mg}$).

Si la méthode de Folin-Ciocalteu est simple à mettre en œuvre et très sensible, elle n'est cependant pas spécifique des polyphénols car certains acides aminés tels que la tyrosine et tryptophane des protéines peuvent interférer dans ce dosage. Cependant cette interférence peut être négligée car ces acides aminés aromatiques sont en proportions trop faibles par rapport aux composés phénoliques non protéiques dans les extraits (**Boizot et Charpentier, 2006**).

2.2.2. Dosage des Flavonoïdes

Afin de caractériser les extraits préparés à partir des gaines de *Nigella sativa* L., le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium de **Bahorun et al. (1996)**, en utilisant comme standard l'acide gallique. Les résultats sont représentés dans le **tableau.17** et les gammes d'étalonnages dans l'**Annexe 04**.

Les concentrations des flavonoïdes sont déduites à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine ($0\text{-}35\ \mu\text{g}/\text{ml}$) et sont exprimées en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EQ}/\text{mg}$ d'extrait).

La teneur des flavonoïdes dans les extraits des graines du *Nigella sativa* montre que l'extrait METII contient une teneur élevée avec $1.29\ \mu\text{g EQ}/\text{mg}$ d'extrait suivi par l'extrait METI avec $0.322\ \mu\text{g EQ}/\text{mg}$ d'extrait et enfin une teneur minimale est enregistrée par l'extrait AQ avec $0.211\ \mu\text{g EQ}/\text{mg}$ d'extrait (**Tab.17**).

Tableaux 17 : Teneur en polyphénols totaux dans les extrais des graines de *Nigella sativa* L.

Extrait	Teneur des Flavonoïdes ($\mu\text{g EQ}/\text{mg}$ d'extrait)
METII	1.29 ± 0.0058
AQ	0.211 ± 0.00095
METI	0.322 ± 0.0061

Les valeurs des flavonoïdes totaux dans les extrais de *Nigella sativa* sont plus faibles que les teneurs trouvées par **Talbi et al. (2014)** ($266\pm 43,4\ \mu\text{g}/\text{mg}$) et ($169,26\pm 5,78\ \mu\text{g}/\text{mg}$) et par **Boudief (2016)** ($3.28 \pm 0.16\ \mu\text{g}/\text{mg}$). A partir de ces données, on peut déduire que les flavonoïdes représentent la fraction majoritaire par rapport aux phénols totaux dans les deux extraits méthanolique. La raison principale pour la quelle on a choisi cette classe de polyphénols, réside

dans le fait que les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante, avec plus de 5000 composés déjà décrits (Gomez-Caravaca *et al.*, 2006).

3. Activités biologiques des extraits

3.1. Activités antioxydantes

3.1.1. Effet Scavenger du radical DPPH

L'effet des antioxydants sur ce radical se traduit par leurs capacités à lui donner un radical hydrogène. Cette capacité de réduction est déterminée par la diminution des absorbances à 517nm, qui est induite par l'antioxydant. Ceci est visualisé par le changement de couleur jaune (**Fig.42**).

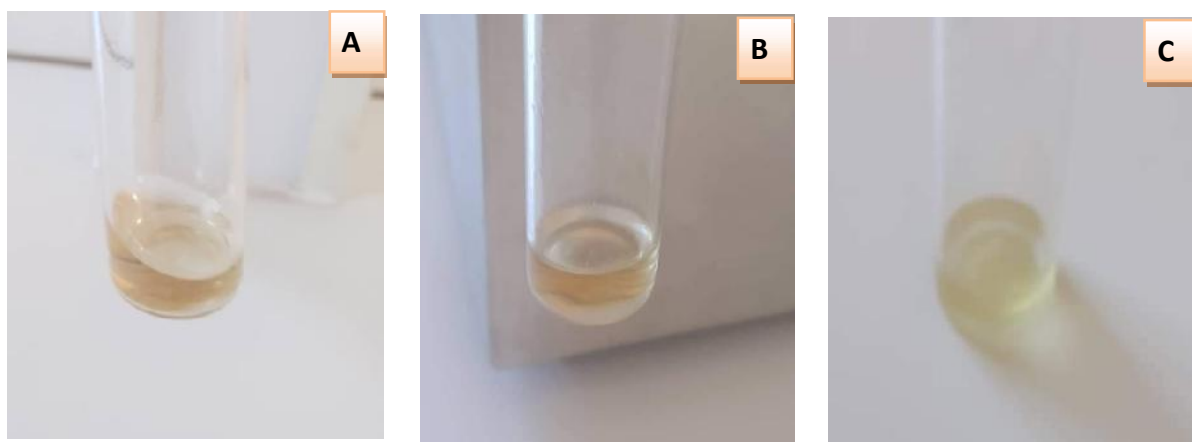


Figure 42 : Activité antiradicalaire des extraits des graines de *Nigella sativa* L.
(A) : Extrait METI ; (B) : Extrait METII ; (C) : Extrait AQ.

Les profils d'activité antiradicalaire obtenus révèlent que les extraits de *Nigella sativa* possèdent une activité antiradicalaire dose dépendante, les IC_{50} de chacun des différents extraits ont été déterminées (**Tab.18**). Pour mieux caractériser le pouvoir antiradicalaire, un autre paramètre est introduit :

- **Calcul de l' EC_{50}** qui prend en considération la concentration de DPPH dans le milieu réactionnel [concentration effective à 50%, $EC_{50} = (IC_{50}/mg \text{ de DPPH/ml})$]

L' IC_{50} est inversement proportionnel à la capacité antioxydante d'un composé. Parce qu'il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration de radical libre de 50%. Plus la valeur d' IC_{50} est petite, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande. Donc notre résultat montre que l'extrait METII a une grande activité antioxydante par rapport à l'extraits METI et AQ.

Tableau 18 : Activité antiradicalaire des extraits des graines de *Nigella sativa* L.

Extrait	IC ₅₀ (mg/ml)	APR
METII	14.71	84.18
METI	80.75	60.98
AQ	33.82	68.98

À des fins comparatives trois extraits (METI, METII et AQ). Ils ont montré une activité antiradicalaire puissante avec des IC₅₀ de l'ordre de 14.71 µg/mg, 80.75 µg/mg et 33.82µg/mg et des APR de l'ordre de 84.18, 60.98 et 68.98 pour le MEII, MEI et AQ, respectivement.

Parmi les trois extraits de *Nigella sativa*, l'extrait METII représente l'extrait le plus actif avec une IC₅₀ de l'ordre 14.71µg/ml et APR de 84.18 suivi par l'extrait AQ ayant une IC₅₀ de l'ordre de 33.82µg/ml et un APR 68.98 et l'extrait METI avec une faible activité antioxydant ayant une IC₅₀ de l'ordre 80.75 µg/ml et APR de 60.98.

D'après **Zaher et al (2008)** ont rapporté que l'extrait aqueux des graines de *Nigella sativa* possède une activité antioxydante très importante avec une CI₅₀ = 3 µg/ml. D'autre part **Meziti (2018)**, l'extrait méthanolique représente l'extrait le plus actif avec une IC₅₀ de l'ordre 237.79 µg/ml et APR de 0.096 suivi par l'extrait aqueux ayant une IC₅₀ de l'ordre de 447.76 µg/ml et un APR 0.051. Donc l'extrait méthanolique a une grande activité antioxydante par rapport à l'extrait aqueux. Se qui s'oppose à nos résultats ou nous avons trouvé que l'extrait METII est plus actif que l'extrait AQ dans nos résultats.

L'activité antiradicalaire d'autres composés de l'huile des graines de la nigelle a été investiguée par **Ramadan et son équipe (2003)**. Cette étude a été menée sur l'huile fixe et ses fractions, en utilisant deux radicaux libres stables; le DPPH et le radical glavinoyl. 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 peroxyde initiale de l'huile brute.

3.2. Activité antibactérienne des extraits Méthanoliques (METI et METII) et Aqueux (AQ)

Nous avons testé l'effet des extraits méthanoliques et aqueux des graines de *Nigella sativa* par la méthode standard de disque. D'une manière générale, ces deux souches microbiennes (*Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*) ont présenté une sensibilité vis-à-vis de trois extraits. En effet, la présence de zones d'inhibitions sont révélées sur les boîtes de pétri contenant des disques imprégnés des trois extraits, alors que les deux souches microbiennes (*Enterococcus faecalis* et *Klebsiella pneumoniae*) ont présenté une résistance vis-à-vis les trois extraits.

Touts les extraits ont réagi positivement au moins sur une des souches microbiennes testées ce qui confirme que la nigelle est douée de propriétés antibactériennes. La souche de *Pseudomonas aeruginosa* se révèle la très sensible pour les trois extraits. Les deux souches microbiennes (*Enterococcus faecalis* et *Klebsiella pneumoniae*) sont très résistantes pour les trois extraits des graines de *Nigella sativa*.

En fonction de l'existence ou non des zones d'inhibitions, deux réponses sont possibles :

- **Souche sensible** : Apparition de la zone d'inhibition ;
- **Souche résistante** : Absence de zone d'inhibition (résultats négatif).

L'activité antimicrobienne effectuée sur les 04 espèces *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* ont mis en valeurs des zones d'inhibition importantes autour des disques imprégnés de principes actifs. Nous avons déterminé un effet antimicrobien de l'extrait METI des graines de *Nigella sativa* sur la souche bactérienne testée (*Pseudomonas aeruginosa*). La sensibilité de cette dernière est estimée par mensuration des diamètres des zones d'inhibition dans les quatre sens perpendiculaires auteur des disques. Les zones d'inhibition, variant entre 12 et 15 mm, indiquent que cette souche est sensible à l'extrait METI de *Nigella sativa* (**Tab.19**).

Tableau 19: Diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne (en mm) obtenus par différentes concentrations dans l'extrait METI.

Concentration (mg/ml)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
100	12mm	/	/	/
50	13mm	/	/	/
25	12mm	/	/	/
12.5	15mm	/	/	/
6.25	13mm	/	/	/

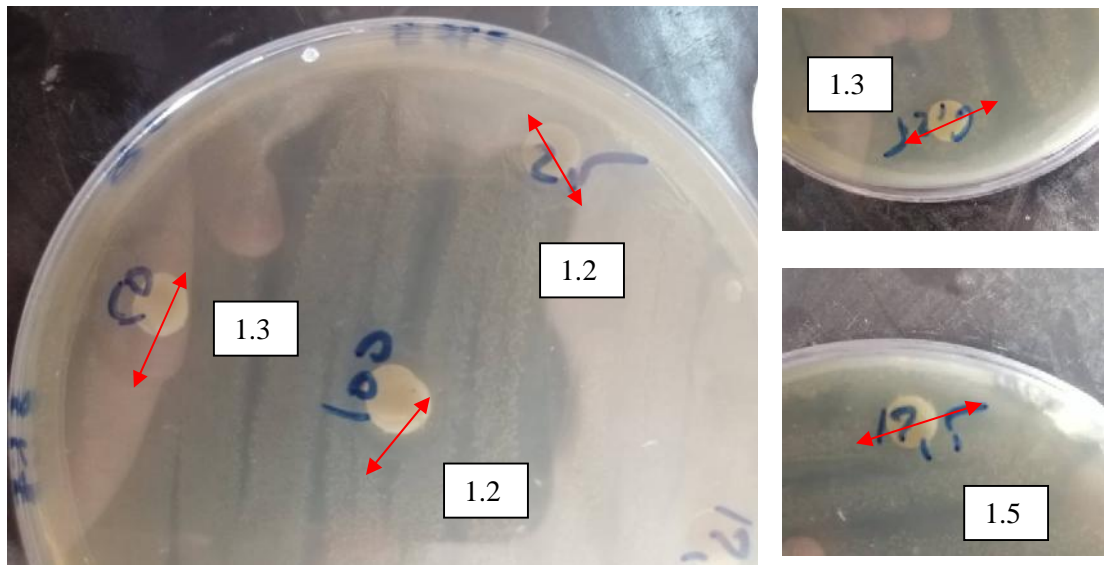


Figure 43 : Observation de zones d'inhibition (en mm) de l'extrait METI sur *Pseudomonas aeruginosa*.

Tableau 20: Diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne (en mm) obtenus par différentes concentrations dans l'extrait METII.

Concentration (mg/ml)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
100	10mm	/	/	/
50	10mm	/	/	/
25	13mm	/	/	/
12.5	17mm	/	/	/
6.25	13mm	/	/	/

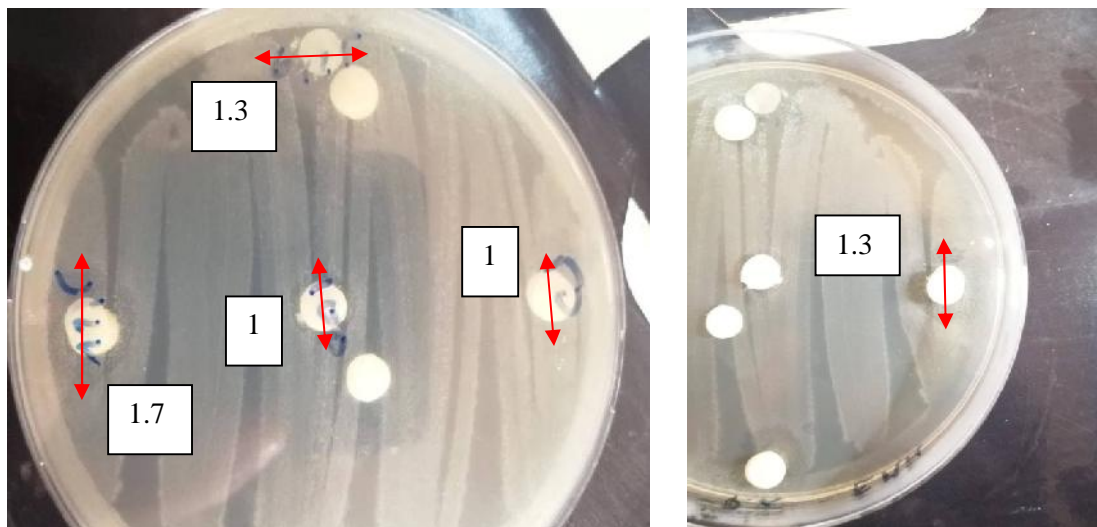


Figure 44 : Observation de zones d'inhibition (en mm) de l'extrait METII sur *Pseudomonas aeruginosa*.

Selon ces résultats, nous constatons que les deux extraits méthanoliques ont un effet inhibiteur efficace contre l'espèce bactérienne *Pseudomonas aeruginosa*, avec des diamètres variables qui varie entre 10 et 17mm enregistré par l'extrait METII, et par contre nous n'avons vu aucune activité antimicrobienne contre les trois autres souches bactériennes (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* et *Klebsiella pneumoniae*) pour les deux extraits méthanoliques. En effet selon (Molinier, 2007), le diamètre critique d'inhibition est compris entre 6 et 18 mm, les bactéries sont dites de sensibilités intermédiaires.

Tableau 21: Diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne (en mm) obtenus par différentes concentrations dans l'extrait aqueux.

Concentration (mg/ml)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
100	13mm	10mm	/	/
50	9mm	9mm	/	/
25	10mm	9mm	/	/
12.5	12mm	9mm	/	/
6.25	12mm	8mm	/	/

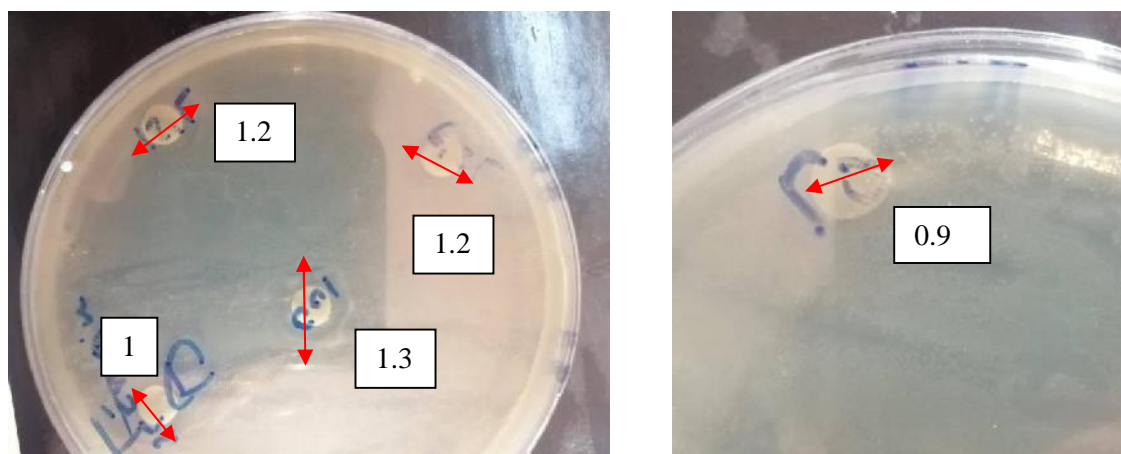


Figure 45 : Observation des zones d'inhibition (en mm) de l'extrait aqueux sur *Pseudomonas aeruginosa*.

Selon les résultats obtenus, nous constatons que l'extrait aqueux a un effet inhibiteur efficace contre deux espèces bactériennes *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, avec des diamètres variables (9-13 mm), et par contre nous n'avons vu aucun effet inhibiteur contre les deux autres souches bactériennes (*Enterococcus faecalis* et *Klebsiella pneumoniae*).

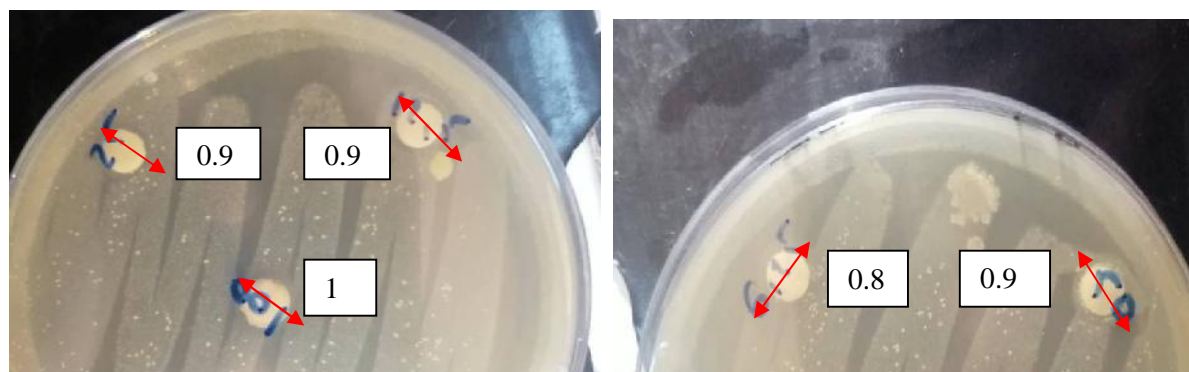


Figure 46 : Observation des zones d'inhibition (en mm) de l'extrait aqueux sur *Staphylococcus aureus*.

Les extraits méthanoliques ont exprimé d'une part, une résistance des trois souches bactériennes *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* et *Staphylococcus aureus* et d'autre part, une sensibilité de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. Cependant, l'extrait aqueux présente une résistance des deux bactéries *Klebsiella pneumoniae* et *Enterococcus faecalis* et une sensibilité des deux autres souches *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. D'après le résultat de **Benzine (2014)**, qui montre d'une part, la résistance des souches : *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*, à huile végétale utilisée et d'autre part aucune interaction n'a été détectée sur les souches à des grams positifs.

D'après les résultats des tests antibactériens, on constate l'efficacité des trois extraits des graines de *Nigella sativa* vis-à-vis des deux souches bactériennes (*Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*) qui représentent une certaine sensibilité, il ressort que la variation de l'activité antibactérienne des extraits explique les variations de leurs compositions chimiques. Tous les extraits ont réagi positivement au moins sur une des souches microbiennes testées ce qui confirme que *Nigella sativa* L. est douée de propriétés antibactériennes.

D'après nos résultats, les souches *Enterococcus faecalis* et *klebsiella pneumoniae* sont plus résistantes que les deux autres souches sensibles (*Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*). La résistance de la souche peut être attribuée à la capacité de l'agent antibactérien de diffuser uniformément dans l'agar (Hayouni et al., 2007). Il peut aussi lier à la méthode de diffusion en milieu gélosés (Fazeli et al., 2007).

Ce résultat correspond bien aux travaux d'Ali et Blunden (2002), Une étude par la méthode de diffusion sur disque a mis en évidence la forte activité inhibitrice de l'huile essentielle diluée de *Nigella sativa* contre plusieurs bactéries dont *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Salmonella*.

D'après Khan et al. (2003), Les différents extraits des graines de *Nigella sativa* présentent un large spectre d'inhibition vis-à-vis de nombreuses souches bactériennes à gram positif (*Staphylococcus aureus*) et à gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*).

Les principales composantes de ces extraits végétaux sont le reflet de leur activité antibactérienne. Ainsi, les fonctions synergiques des différentes molécules contenues dans les extraits par rapport à l'action d'un ou deux composants principaux de l'extrait semblent discutables.

Toutefois, il est possible que l'activité des composants majeurs soit modulée par d'autres molécules mineures. En fait, les effets synergiques des divers constituants majeurs et mineurs présents dans les extraits végétaux bruts doivent être pris en considération pour rendre compte de leur activité biologique. Selon des études concernant les mécanismes d'action antimicrobienne de ces molécules, il semblerait que suite à une désintégration de la membrane cellulaire bactérienne provoquée par ces substances, la fuite des métabolites intracellulaires provoque la mort de la cellule (Cristani et al., 2007).

Conclusion

Les graines de *Nigella sativa* L., ou la nigelle cultivée (Sinouj ou Habba sawda) est une plante herbacée, aromatique et médicinale connue pour leurs propriétés biologiques intéressantes, utilisée dans divers domaines en médecine, pharmacie, cosmétologie et en agriculture.

Nigella sativa est l'une des sources de plantes médicinales qui occupent une place particulière dans le monde de la médecine traditionnelle à cause de ses utilisations thérapeutiques très vastes par les populations dans les pays Arabe, plus particulièrement en Algérie, contre de nombreuses pathologies telles que l'hypertension, le diabète, la fièvre, la migraine, l'inflammation, les problèmes gastro-intestinales, etc.

L'étude des activités biologiques *In Vitro* des deux extraits méthanoliques et aqueux des graines de *Nigella sativa*, nous a permis d'extraire des résultats curieux.

L'analyse qualitatif, effectuée par les tests préliminaires, a mis en évidence la présence des composés phénoliques, des flavonoïdes et des tanins dans ces extraits, ou nous avons enregistré une forte présence des tanins dans les deux extraits (méthanolique par macération et aqueux) par rapport à l'extrait méthanolique par Soxhlet.

Grâce à des séparations chromatographiques sur CCM, nous avons pu isoler 03 spots de chez les trois extraits de *Nigella sativa* (AQ, METI et METII) qui ont été identifiés après révélation physique et chimique la présence d'une multitude de variétés de composés phénoliques : l'acide gallique, la quercétine et de vanilline.

Quant à l'analyse quantitative des extraits MET et AQ des graines de *Nigella sativa*, est représentées par l'évaluation du contenu des phénols totaux en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu, révèle que nos trois extraits contiennent principalement des polyphénols à des concentrations dominantes. De même, nous avons dosé les flavonoïdes se qui nous mène à remarquer leur présence dans les trois extraits en proportions différentes, où l'extrait AQ apparait le plus riche en polyphénols avec une teneur de 2.35 µg EAg/mg d'extrait et que l'extrait METI le plus riche en flavonoïdes avec une teneur de 1.29 µg EQ/mg d'extrait.

D'après les résultats, on peut conclure que l'étude phytochimique (qualitative et quantitative) a démontré une richesse des graines de *Nigella sativa* en composés bioactifs que ce soit dans leurs extraits aqueux (AQ) ou même dans les deux extraits méthanoliques (METI et METII), ce qui reste prometteur pour la valorisation de ces graines à large spectre dans le domaine de la phytothérapie.

Concernant l'activité antioxydante des différents extraits des graines de *Nigella sativa*, la technique utilisée est la révélation chimique par le DPPH, qui a démontré que les trois extraits ont une activité antioxydante différentes, sachant que l'extrait méthanolique par macération est le plus actif.

D'une manière générale les trois extraits de la nigelle possèdent des propriétés antioxydantes remarquables. Cette étude confirme scientifiquement l'usage traditionnel des graines de *Nigella sativa* et révèle leur intérêt dans le cadre d'une exploitation industrielle pharmaceutique.

L'évaluation de l'activité antibactérienne des trois extraits a été déterminée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé vis-à-vis quatre souches bactériennes. Les résultats microbiologiques ont montré que l'extrait AQ a une activité sur les deux souches bactériennes (*Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*). Cependant, les deux extraits ont une activité antimicrobienne seulement sur *Pseudomonas aeruginosa*, et qu'il existe une résistance des bactéries : *Klebsiella pneumoniae* et *Enterococcus faecali* pour les trois extraits des graines de *Nigella sativa*.

Bien sur, ces résultats obtenus *In Vitro* ne constituent qu'une première étape de recherche de nouveaux produits antimicrobiens et naturels. Des études complémentaires devant pouvoir confirmer les performances mises en évidence.

Dans notre étude, les extraits des graines de *Nigella sativa* semblent présenter un intérêt réel et potentiel par leurs activités antioxydantes et antibactériennes qui ont été établies *In Vitro*.

Ces résultats restent préliminaires, Il serait intéressant de tester l'activité des fractions chromatographiées et d'isoler les molécules qui sous tendent les diverses activités détectées dans les différents extraits. De plus, des études complémentaires approfondies concernant l'identification des composés phénoliques par des méthodes plus performantes sont nécessaires.

Pour mieux évaluer le pouvoir antioxydant des extraits des graines de *Nigella sativa*, des études similaires *In Vivo* seraient intéressantes et plus prometteuse visant d'autres marqueurs biologiques tels que l'évaluation de la peroxydation lipidique et les enzymes antioxydantes plasmatiques et érythrocytaires. De même, des études approfondies sur la pharmacocinétique et la pharmacodynamique de ces principes actifs seraient utiles pour la détermination des doses préventives et thérapeutiques.

REFERANCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- **Abbott, S.L, (2007).** Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and Other Enterobacteriaceae. In P.R. Murray, E.J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller (Eds.), Manual of Clinical Microbiology (9th ed, pp.698-711). Washington, USA : ASM Press.
- **Abdel-Aal. E. et R. Attia. (1993).** «Characterization of Black cumin (*Nigella sativa*) seeds.» Alexandria Sci Exch J, (14), 497-48
- **Abdesselam Badr-Eddine, (2015).** Approche ethnopharmacologique de *Nigella sativa* : de ses utilisations traditionnelles ancestrales aux études cliniques actuelles de ses principes actifs. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Picardie Jules Verne. P.43
- **Aboul ela, M., EL-shaer, N., & Ghanem, N. (1996).** Antimicrobial evaluation and chromatographic analysis of some essential and fixed oils .die pharmazie ,51(12), pp.993-994
- **Adel Shabana, Ayman El-Menyar, Mohammad Asim, Hiba Al-Azzeh, Hassan Al Thani (2013).** Cardiovascular Toxicology journal, 13, pp 9-21 ;Cardiovascular Benefits of Black Cumin (*Nigella sativa*) against mitochondrial oxidative damage. J. Biol. Chem. 276 :38084-38089.
- **Agel M.B. (1992)** The relaxing effect of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds on vascular smooth muscle. Dirasat- University of Jordan, Series B: Pure and Applied Sciences: 19B 91-100
- **Aggarwal B.B., Kunnumakkara A.B.** Molecular Targets and Therapeutic Uses of Spices, Modern Uses for Ancient Medicine. Singapore: World Scientific Publishing;
- **Agrawal R., Kharya M. D., (2009).** Shrivastava R. Antimicrobial and anthelmintic activities of the essential oil of *Nigella sativa* Linn. *Indian J Exp Biol.* 1979; 17: 1264-5.
- **Ahsan H., Ali A. and Ali R. (2003)** Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clinical and experimental immunology.* 131, 398-404.
- **Akhram Khan M. (1999);** Chemical composition and medicinal properties of *Nigella sativa* L. *Inflammopharmacology* 7(1):15-35.
- **AL-hader A., Aqel M., Hasan Z.** Hypoglycemic effects of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds. *Int J Pharmacog.* (1993); 31: 96-100
- **Al-Hader, A., Aqel, M., Hasan, Z. (1993)** Hypoglycemic effects of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds. *International Journal of Pharmacognosy.* 31: 96-100.
- **Ali B.H. ; Blunden G. (2003)** Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytother.Res.:* 17 299-305

- **Ali, B., & Blunden, G. (2002).** Pharmacological and Toxicological properties of Alimentaire. Ed. Polytechnica, p. 53 -81.
 - **Aliouat A, Boulkelia N, (2014).** Activité antioxydant des extraits des graines de la plante *Nigelle sativa L.* pour l'Obtention du Diplôme de Master. université de Constantine 1.P 08.
 - **Aljabre, S.H.M., Randhawa, M.A., Akhtar, N., Alakloby, O.M., Alqurashi, A.M., Aldossary, A.(2005)** Antidermatophyte activity of ether extract of *Nigella sativa* and its active principle,thymoquinone. *Journal of Ethnopharmacology*, 101: 116-119.
 - **AL-jassir M. (1992);** Chemical composition and microflora of black cumin (*Nigella sativa*) seeds growing in Saudi Arabia. *Food Chemistry*45: 239-242.
- ALLOUAT ASSIA et BOULKELIA NOUSSAIBA,activité antioxydant des extraits
- **Al-Mamun, M., Yamaki, K., Masumizu, T., Nakai, Y., Saito, K., Sano, H. & Tamura, Y. (2007).** Superoxide anion radical scavenging activities of herbs and pastures in northern japan determined using electron spin resonance spectrometry. *Int. J. Biol. Sci.* 3, 349-355.
 - **Al-Saleh I.A., Billedo G., El-Doush I.I. (2006).** Levels of selenium, DL- tocopherol, DL- -tocopherol, all-trans-retinol, thymoquinone and thymol in different brands of *Nigella sativa* seeds. *Journal of Food Composition and Analysis.* 19: 167-175.
 - **Ames, B.N., Cathcart, R., Schwiers, E. et Hochstein, P. (1981).** Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78: 6858-6862.
 - **Amrouche, A., Benmehdi, H., Moussaoui, A., Mebarki, K., Chaoufi, A., Saneba, A., A. Lazouni, H.,Chabane Sari, D. (2011)** Evaluation of antifungal activity of some oils from Algerian medicinal plants against *Aspergillus flavus* strain produced aflatoxins. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1: 48-53.
 - **Ansari, A., S. Osman., & R. Subbaram. (1975).** «Component acids of minor seed oils». *J Oil Technol Assoc India* (7), 26-27.
- antioxydantes de deux extraits de chardon a glu: *Atractylis gummifera*. *Revue Social*
- **Anton, R., Teuscher, E., Lobstein-guth, A., Bauermann, U., Werner, M., Rohrner, C., et al. (2005).** Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Paris: Médicales internationales.
 - **Antwerpen, P.V. (2006).** Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers

agents d'intérêt thérapeutique: Ciblage du système myclopéroxydase / Peroxyole d'hydrogène /Chlorure. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Science Pharmaceutiques Bruxelles.

- **Antwerpen, P.V. (2006).** Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique: Ciblage du système myclopéroxydase / Peroxyole d'hydrogène /Chlorure. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Science Pharmaceutiques Bruxelles. *Arzneimittelforschung* , 50, 832-836.
- **Atta, M., & Imaizumi, K. (1998).** Antioxidant Activity of *Nigella sativa* L. Seeds Extracts. *J Jap Oil Chem Soc* , 47 (5), 475-480
- **Atta-Ur-Rahman., M. Sohail., A. Sultan., I. Chaudhary., Habib-Ur-Rehman.(1985)b** « Nigellimine N-oxyde , a new isoquinoline alkaloid from the seeds of nigella sativa ».
- **Atta-Ur-Rahman., M. Sohail., H. Cun-Heng., J. Clardy. (1985)a.** «Isolation and structure determination of nigellicine, a novel alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*.» *Tetrahedron Lett.*: 26 2759-62.
- **Atta-Ur-Rahman., M. Sohail., Z. Khurshid. (1992).** «Nigellimine : a new isoquinoline alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*». *Journal of Natural Products* : 55 676-8.
- **Atta-Ur-Rahman., M.S. Sohail., H. Sadiq., M.I. Choudary., N. Chao-Zhou N., J. Clardy . 1995.** «Nigellidine – a new indazole alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*». *Tetrahedron Lett*: 36 1993-6.
- **Avril ; J.L, Dabernat, H., Denis, F., and Montiel, H.(2000).** *Bactériologie clinique*, Ellipses , Paris. 2^{ème} édition :171-211.
- **Awad E.M. (2005).** In vitro decrease of the fibrinolytic potential of cultured human fibrosarcoma cell line, HT1080, by *Nigella sativa* oil. *Phytomedicine*. 12: 100-107.
- **Bahorun T., Gressier B., Trotin F., BruneteC., Dine T., Vasseur J., Gazin J.C., Pinkas M., Luycky M., Gazin M, (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*. 46: 1086-1089.
- **Bahorun T., Gressier B., Trotin F., BruneteC., Dine T., Vasseur J., Gazin J.C., Pinkas M., Luycky M., Gazin M, (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*. 46: 1086-1089.

- **Baudin, B., (2006).** Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *MT Cardio.* 2(1):43-52.
- **Bauer, W. J., Badoud, R., Löliger, J. & Etournaud, A. (2010).** Science et technologie des aliments: Principes de chimie des constituants et de technologie des procédés. *Edition PPUR Presses polytechniques*, p 212.
- **Beloued A.** Plantes médicinales d'Algérie (2ème Ed), Office des publications universitaires (Alger) (1998); pp : 144.
- **Benyoussef E. H., Zouagh N., Belabbes R., Bessiere J.M. (2001).** Botanical study of algerian *Nigella* seeds and analysis of their essential oil. *Rivista italiana EPPOS* 31: 15-19.
- **Benzeggouta N, (2005)** Etude de l'Activité Antibactérienne des Huiles Infusées de Quatre Plantes Médicinales Connues Comme Aliments, l'Obtention du Diplôme de Magister en Pharmacochimie, Université Mentouri de Constantine
- **Berche P., Gallard J.L., Simonnet M,(1988),** Les infections nosocomiales d'origine bactérienne et leurs préventions. *In : Les bactéries des infections humaine, Flammarion, Paris, 64,74p.*
- **Berger L (2010).**Le biofilm bactérien en endodontique DOCTEUR, Université HENRY POINCARÉ .France .
- **Bergogne-Berézin E, Dellamonica P. (1995).**Antibiothérapie en pratique clinique .Masson .Paris .p486.
- **Berset C, (2006).** Antioxydants phénoliques-Structures, propriétés, sources végétales. *In «Les polyphénols en agroalimentaire ».* Ed.: Lavoisier, ISBN 2-7430-0805-9, pp : 1-27.
- **Biron, C. (2001).** NK cell functions restrain T cell responses during viral infections. *Eur J Immunol , 31, 3048-3055.*
- **Boizot N., Charpentier J.P, (2006).**Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier .Le Cahier des Techniques de l'Inra. pp: 79-82
- **Bonnier G. ; Douin R.** La grande flore en couleur. tome 3 ; Belin, Paris, (1993).
- **Boskabady, M., Shirmohammadi, B., Jandaghi, P., & Kiani, S. (2004).**Possible mechanism(s) for relaxant effect of aqueous and macerated extracts from *Nigella sativa* on tracheal chains of guinea pigs. *BMC*

- Pharmacology*, 4, 1471-2210.
- **Boudiaf K, (2006)** .Etude des effets anti-xanthine oxydoréductase et anti-radicalaires des extraits des graines de *Nigella sativa*. Thèse de magistère. Université Ferhat abbas. (Sétif) Algérie
 - **Boughachiche R, Sebais S. (2016)**.caractérisation morphologique, biochimique et mutagénèse des *klebsiella pneumoniae* au CHU de Constantine.
 - **Bourgeois, C. (2003)**. Les vitamines dans les industries agroalimentaires. collection. Sciences et techniques agroalimentaires. Paris : Multon J.L. 708 p.
 - **Bourgou S., Ksouri R., Bellila A., Skandrani I., Falleh H., & Marzouk B, (2008)**. Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots anrroots. *C. R. Biologies* (331), 48-55.
 - **Bourret. I., (1979)**, le défi de la médecine par les plantes, *Paris, France-Empire*, pp : 335.
 - **Brisse S, Grimont F ET Grimont P.A.D. (2006)**. The Genus *klebsiella*, procaryotes. Chapitre3.3.8.
 - **Bruneton, J. (1993)**. Composés phénoliques: Shikimate-acétate. In *Pharmacognosie : Phytochimie,Plantes médicinales. Technique et documentation Lavoisier (Paris) ; Partie P: 310-345.*
 - **Burits M., Bucar F. (2000)**. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy research*. 14: 323-328.
 - **Cai H, Harrison DG. (2000)** Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxydant stress.*Circ Res.*; 87(10):840-4
 - **Carbannelle B.,denis F.,Marmonier A., Pinon G et Vargues R.(1987)**. Bactériologie médicale : Techniques usuelles .S.I.M.E.P.S.A. Paris, p121-137 ; 146-155.
 - **Chamseddine A. (2006)**. La curation par la graine noire d'après la sunna prophétique et la médecine antique et moderne (3e éd.). (A. ABOUD, Trad.) Beyrouth: Dar-Al-Kotob Al-Ilmiyah.
 - **Chevalier J.; Choisy C.; Crémieux A.; Darbord J.-C.; Davin-Régli A.; Dubreuil L.; FinanceC.; Linxe C.; Quentin-Noury C.; Quero A.-M. et Reynaud A, (2003)**. Agents antimicrobiens,-antiviraux– Antibiotiques-. In «Microbiologie générale et santé», Ed.:Eska, ISBN: 2-7472-0420-0, pp: 278-321.

- **Cheyrier, V. (2005).** Polyphenols in foods are more complex than often thought. *American Journal of Chemistry Nutrition.*, 81: 223-229.
- **Cihan T, (2012).** À propos de *Nigella sativa* L. Thèse de Doctorat. Université de lorraine. P.14
- **Cihan T, (2012).** À propos de *Nigella sativa* L. Thèse de Doctorat. Université de lorraine. P.69
- **Cillard J.et Cillard P. (2006).**Mécanismes de la peroxydation lipidique et des antioxydations.Oilseeds and fats, Crops and Lipids, 13: 24-29.
- **Ciulel I. (1982).** Methodology for analysis of vegetable drugs. *Ed I.P.A.C.Romania.*67p.
- **Clardy . (1995).** «Nigellidine – a new indazole alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*».Tetrahedron Lett: 36 1993-6.
- **Coste L'abbé H. (1985)** Flore descriptive et illustrée de la France, de la Corse et des contrées limitrophes. Tome 1, Librairies Scientifiques et Techniques Albert Blanchard, Paris,
- **Dacosta Y (2003).** Les phytonutriments bioactifs. Ed Yves Dacosta. *Paris.*
damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean.
De Magistère. Université Abou Bakr Belkaïd, Tlemcen.
- **De Perio, M.A., Yarnold, P.R., Warren, J., (2006).**Risk factors and outcomes associated with *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* enterococcal bacteremia. *Infect. Control Hosp .epidemiol.*J.27 :28-33.
- **Delattre J., Therond P. & Bonnefont-Rousselot D, (2005).** Espèces réactives l'oxygène, antioxydants et vieillissement. In : Radicaux libres et stress oxydants.Aspects biologiques et pathologiques.chap, 10: 281-309.
des graines de la plante nigelle sativa L,(2013,2014) Master ,université de constantine1.
- **Diallo D ., Sango R ., Yasambou H ., Traoré A ., Coulibaly K ., Ma ga A, (2004).** Etude des constituants des feuilles de *Zizyphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali ,*Comptes rendus .Chimie.*
- **Dioscorides, P. (2002).** De materia medica. (M. AUFMESSER, Trad.) Hildesheim: Olms-Weidmann.
- **Djammel R et Bouzidi D, (2018).** Contribution à l'étude de l'effet

- hémostatique des graines de Nigelle Sative *L.* pour l'obtention du diplôme de Master. Université Larbi Ben M'hidi, Oum El-Bouaghi. PP 61-62. 64 65
- **Dodet B . , (1991)**. La chasse aux radicaux libres oxygénés biofutur ,mai 23-34
 - **Duong, H.A, Nagaraj, R., Wang, C.W., Ratnaparkhi, G., Sun, Y.H., Courey, A.J.**
 - **E PILLY. (2012)**. Maladies infectieuses et tropicales,2 volume de CMIT-Editeur Alinéa .
 - **Echevin R. (1964)**. Angiospermes tome I : Apétales et dialypétales – Doin,
 - **Edeas, M. (2005)**. Les secrets de santé du thé : c'est naturel, c'est ma santé. *Alpen Editions s.a.m.*, p 18.
 - **Edeas, M. (2005)**. Les secrets de santé du thé : c'est naturel, c'est ma santé. *Alpen Editions s.a.m.*, p 18.
 - **Edeas, M. (2007)**. Les polyphénols et les polyphénols de thé. *Phytothérapie*, 5 :246-270.
 - **Elalaoui M,(2014)**. Contribution à l'étude phytochimique et l'évaluation de l'effet hémolytique d'extrait brut hydroalcoolique des graines de *Nigella sativa L.* pour l'obtention du diplôme Master. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen. P 32
 - **EL-dakhakhny, M. (1965)**. Studies on the Egyptian *Nigella sativa L.* Some pharmacologie properties of the seeds active principale in comparaison to its dihydro compound and its polymer .*azneimittelforshung*,15,1227-1229.
 - **EL-dakhakhny, M., Mady, N., & Halim, M. (2000)**. *Nigella sativa L.* oil protects against induced hepatotoxicity and improves serum lipid profile in rats. *Azneimittelforshung*,50,832-836.
 - **El-dakhakhny, M., Mady, N.I., Lembert, N. (2002)** The hypoglycemic effect of *Nigella sativa* oil is mediated by extrapancreatic actions. *Planta medica*. 65: 465-466 *Elem Res* , 96, 263-270.
 - **El-Tahir K.E.H., A.Y. Al-Tahir., A.M. Ageel. (1999)**. «Pharmacological studies on sesame and *Nigella sativa* fixed oil : effects on the sensitivities of the adrenoreceptors, baroreceptors, platelets and the uterus of rat.» *Saudi Pharm.J.* : 7 205-215
 - **Emaoui afaf,(2011)**. Activités antioxydante et anticoagulante des huiles essentielles des graines de *Nigella sativa.L* Algérienne. Mémoire de faine d'étude en biochimie. UNIVERSITE FERHAT ABBAS -SETIF. P. 32
 - **Ennadir J., Hassikou R., Bouazza F., Arahou M., Al Askari G. et Khedid K.**

- (2014). Evaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne des extraits aqueux et organiques des graines de *Nigella sativa* L. et de *Foeniculum vulgare* Mill.
- **Fauchere J.L. et Avril J.L., (2002).** Bactériologie générale et médicale P : 368.
 - **Faure P. and Bonnefont-Rousselot D. (2005)** Stress oxydant, diabète sucré et produits de glycation avancée. In "Delattre J, Beaudoux J.L., Bonnefont-Rousselot, D. (Eds.), Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques". Editions médicales internationales. *Lavoisier édition, TEC & DOC*, Paris. pp: 354-376.
 - **Favier A, (2003).** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*, 108-115.
 - **Favier A, (2006).** Stress oxydant et pathologies humaines *Annales pharmaceutiques nutrition de patient septique .Réanimation*, 11 :411-20.
 - **Favier A. (2003);** Le stress oxydant. *L'actualité chimique*. 08: 115.
 - **Ferdous, A.J., (1992).** *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*, 6(2): p. 137-140.
 - **Ferrari C.K.B. (2001)** Oxidative stress pathophysiology: searching for an effective antioxidant protection. *International Medical Journal*. 8, 175-184.
 - **Fiquet.A., (2009).** Le staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus*) un état des lieux. Mémoire CIFV. Université Victor Segalen Bordeaux 2-école du Val-de-Grace.
 - **George M Garrity., Julia A Bell et Timothy G Lilburn.(2004).** Taxonomie Outline of the prokaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition. DOI :10.1007 /bergeysoutline200405.
 - **Ghedira, K. (2006)** La nigelle cultivée : *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae). *Phytothérapie*, 4: 1-7.
 - **Ghedira, K. and R.L. (2010).** Jeune, Huile de nigelle cultivée, *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae). *Phytothérapie*, 8: p. 124-128
 - **Ghedira. K.** La Nigelle cultivée : *Nigella sativa*. (Ranunculacée). *Phytothérapie*. (2010).
 - **Greenish. H. (1880).** Contribution to the Chemistry of *Nigella sativa* (Vol. 10).

Pharmacol J Trans.

- **Grusse J. L. (2003).** Structure chimique et propriétés physicochimiques-vitamine C-. In « *Les vitamines dans les industries agroalimentaires* », Ed. : TEC & Doc, ISBN: 2-7430-0524- 6, pp: 22-23.
- **Gueye O, (2007).**Utilisation des méthodes biométrique dans l'identification de quelques bacilles à Gram négatif .p22 ,24-28.
- **Guichardant, M., Bacot, S., Moliere, P. and Lagarde, M. (2006)** Hydroxy-Alkenalsfrom the Peroxidation of n-3 and n-6 FattyAcids and UrinaryMetabolites. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential FattyAcids, 75, 179-182.
- **Guignard. J L. (2001).** In Botanique systématique moléculaire.12ème Edition Masson (Paris). pp : 304.
- **Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C et Chapelle J.P. (2007).**Lestress oxydant. *Rev Med Liege.* 62 , p 628-638.
- **Halliwell B et Whiteman M. (2004).** "Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture :how should you do it and what do the results mean.*Brazillian journal of pharmacology.*2 :231-255.
- **Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. (1999)** Free Radicals in Biology and Medicine. In "Free radicals in biology and medicine". 3rd Ed. *Oxford. University Press.* pp: 1-543.
- **Halliwell B. et Gutteridge J.M.C. (2007).** Free Radicals in Biology and Medicine.Fifth edition. Oxford: Oxford university Press. 707 p.
- **Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1990).** "The antioxidants of human extracellular fluids." *Arch Biochem Biophys* 280: 1-8.
- **Halliwell, B. et Gutteridge, J.M. (1999).** Free Radicals in Biology and Medicine.Oxford: ClarendonPress. 488 p.
- **Hannebelle, T.; Sahpaz, S. et Bailleul, F. (2004).** Polyphénols végétaux, sources, utilisation et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie.* 1: 3-6.
- **Harborne J.B, (1998).**Photochemicalsmethods. A guide to modern techniques ofplantsanalysis.Third Edition. ISBN: 0-412-57260-5 (HB) and 0-412-57270-2 (PB). 203-214.
- **Harrison D., Griendling K.K., Landmesser U., Hornig B. and Drexler H. (2003)** Role of oxidative stress in atherosclerosis. *The American Journal of*

- Cardiology*. 91, 7-11.
- **Haton C., (2005).** Effets des rayonnements ionisants sur la structure de la fonction de la cellule épithéliale intestinale. Thèse de doctorat de l'université de Paris VI, France, pp : 43.
 - **Hawsawi, Z.A., Ali, B.A., Bamosa, A.O. (2001)** Effect of *Nigella sativa* (Black seed) and thymoquinone on blood glucose in albino rats. *Annals of Saudi medicine. Med.* 21: 242-244.
 - **Heller, W. and Forkmann, G. (1993).** The Flavonoids, Advances in research. P: 499-535.
 - **Houcher, Z., Boudiaf, K., benboubetra, M., Houcher, B. (2007)** Effects of methanolic extract and commercial oil of *Nigella sativa* L. on blood glucose and antioxidant capacity in alloxan-induced diabetic rats. *Pteridines*. 18: 8-18.
 - **Houée-Levin C.; Sicard-Roselli C. et Bergès J, (2005).** Introduction à la biochimie radicalaire. In « *Chimie et biochimie radicalaires* », Ed.: Échelles, ISBN 2-7011-3717- 9, pp: 86-102
 - **Hu Y., Block G., Norkus E. P., Morrow J. D., Dietrich M., Hudes M. (2006)** Relations of glycemic index and glycemic load with plasma oxidative stress markers. *Am J Clin Nutr.*; 84: 70-76., quiz 266-267.
 - **Ichai, C., Quintard, H. et Orban, J.-C. (2011).** Désordres métaboliques et réanimation : de la physiopathologie au traitement, *Edition Springer*, p 427.
 - **Iliquer M. (2010).** Epidémiologie et caractérisation moléculaire de souches cliniques de *klebsiella pneumoniae* résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération hors BLSE, isolées entre 2007 et 2009, au C.H.U de Nantes. Université de Nantes. 123p.
 - **Jaff L, Wayne L. (2008)** Collaboré avec les bactéries et autre micro-organisme ; ouvrage réalisé par le studio graphique des éditions du rouergue. Achévé d'imprimer en mars sur les presses de Tipostampa. AS 5778, chapitre 3, p 44.
 - **Janda, J.M.A.S.L.A.(2006).** The family *Enterobacteriaceae* : taxonomie considerations. In J.M and S.L. Abbott (ed). *The Enterobacteria*, p7-13.
 - **Johnson, Raven, Losos, Bouharmont, & Singer., (2011).** Biologie. (Livre) *Journal of Gastroenterology* 2008; 14(3):105-106
 - **Ghedira. K.(2010)** La Nigelle cultivée : *Nigella sativa*. (Renonculacée). Phytothérapie. pp : 4, 1-7.

- **Kaddour et Benbarek, (2018).** Etude *in vitro* de l'activité antiarthritique des extraits des graines de *Nigella sativa* L.pour l'obtention d'un diplôme de Master. Université Djilali Bounaâma de Khemis Miliana (Algérie). PP:< 30 37 -38
- **Kanter, M., et al. (2006).**, Neuroprotective effects of *Nigella sativa* on experimental spinal cord injury in rats. *Hum Exp Toxicol*, 25(3): p. 127-33.
- **Karrandou,A, (2016).** La Nigelle, une panacée peu connue en Occident. Thèse du doctorat en pharmacie Université de Bourgogne UFR des Sciences. P.14
- **Karrandou,A, (2016).** La Nigelle, une panacée peu connue en Occident. Thèse du doctorat en pharmacie Université de Bourgogne UFR des Sciences. P.19
- **Khadhri A., El mokni R Smiti S. (2013).** composés phénoliques et activités antioxydantes de deux extraits de chardon à glu: *Atractylis gummifera*. *Revue SocialScience National*, 39 : 44-52.
- **Khan M.A.U., Ashfaq M.K., Zuberi H.S., Mahmood M.S., Gilani A.H. (2003).** The *in vivo* Antifungal Activity of the Aqueous Extract from *Nigella sativa* Seeds. *Phyther. Res.* 17: 183–186.
- **Khan. M, Ashfaq. M, Zuberi. H., Mahmood. M, et Gilani. A, (2003).** The *in vivo* antifungal activity of the aqueous extract from *Nigella sativa* seeds. *Phyther Res*, pp : 17, 183-186.
- **Kirschvink, N., Moffarts, B., Lekeux, P., (2008).** The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *Journal of Veterinary* 177, 178–191.
- **Koehlin-Ramonatxo, C. (2006).** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme* 20, 165–177.
- **Konan. K., Natalie. K., Guesend. K. R., Ousson., Calixte Bahi., Coulibay. A., Djaman. A,J et Dossa. M.(2014).** Effet antibactérien de l'extrait aqueux de l'écorce de *Terminalia glaucescens* Planch ex Benth (Combretaceae) sur la croissance *in vitro* des entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (EBLSE). Université Félix Houphouët Boigny, Côte d'Ivoire. ISSN 1997-342X (Online), ISSN 1991-8631 (Print). *Sci.* 8(3): 1192-1201.
- **Kokdil, G.,** Morphology and stem anatomy of some species of genus *Nigella* L. in Turkey. *J Faculty of Pharmacy of Ankara*, (2006). 35(1): p. 19-41.
- **Kooti W., Hasanzadeh-Noohi Z., Sharafi-Ahvazi N., Asadi-Samani M., Ashtary-Larky D. (2016),** Phytochemistry, pharmacology, and therapeutic uses of black seed

- (*Nigella sativa*). Chinese Journal of Natural Medicines. Vol. 14, 10, 732-745
- **Kreshri G., M.M. Singh., V. Lakshmi., V.P. Kamboj. 1995.** «Post-coital contraceptive efficacy of the seeds of *Nigella sativa* in rats.» Indian J.Physiol.Pharmacol. : 39 59-62
 - **Ktty Jeannot, Thomas Guillard. (2014).**Bactérie *Pseudomonas aeruginosa*.
 - **Kumara, S.S., Huat, B.T. (2001)** Extraction, isolation and characterization of antitumor principle, alphahederin, from the seeds of *Nigella sativa*. *Planta medica. L. seed. Int Immunopharm (5)*, 1749-1770.
 - **Lall, S. (1995).** Macro and trace elements in fish and shellfish. In :Ruiter, A. Fish and Fishery Products. Oxon (UK): CAB International. P. 187-213.
 - **Leclerc H, Gaillard J-L, Simonet M (1995)** Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien.Doin Editeurs,paris.
 - **Lee B.-C.; Lee S. Y.; Lee H. J.; Sim G.-S.; Kim J.-H.; Kim J.-H.; Cho Y.-H.; Lee D.- H.; Pyo H.-B.; Choe T.-B.; Moon D. C.; Yun Y. P. et Hong J. T.(2007).** Anti-oxidative and Photo-protective Effects of Coumarins Isolated from *Fraxinus chinensis*. *Arch PharmRes*, 30, PP 1293-1301.
 - **Lee, C. Y., Sharma, A., Cheong, J. E. & Nelson, J. L. (2009).** Synthesis and antioxidant properties of dendritic polyphenols. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19, 6326-6330.
 - **LegenreNigella.(2005);** Available from: http://www.plantesbotanique.org/genre_Nigella.
 - **Leon Le Minor, Michel Veron,** Bactériologie Médicale 2^{ème} Edition Paris, (1989),396-795p.
 - **Lien Ai Pham-Huy , Hua He , Chuong Pham-Huy. (2008).** Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health.*Biomedical science.2*, p 89-96.
 - **Lotito, S. B and Frei, B. (2006):** Dietary Flavonoids Attenuate Tumor Necrosis Factor-induced Adhesion Molecule Expression in Human Aortic Endothelial Cells. Structure-function relationships and activity after first pass metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 281 (48): 37102-37110.
 - **Lugasi , A .; Hovari, J .; Sagi, K. V. and Biro, L. (2003).** The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis.*47 (1-4), 119-125.
 - **Mahi EL-A, (2016).** L'effet de deux plantes médicinales (*Nigella sativa* L. et *Salvia Officinale* L) sur les bactéries responsables des infections urinaires. Mémoire de fin d'études. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem p.43

- **Mahi EL-A ,(2016).** L'effet de deux plantes médicinales (*Nigella sativa L.* et *Salvia Officinale L*) sur les bactéries responsables des infections urinaires. pour l'obtention du diplôme Master. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem. P 47 -48
- **Mahmoud M. R., El-Abhar H. S., Saleh S.** The effects of *Nigella sativa* oil against the liver damage induced by *Schistosoma mansonii* mice. *J Ethnopharmacol.* 2002; 79: 1-11
- **Mamadou B, (2002).** Actions pharmacologiques des tanins. Thèse de doctorat. Université Cheikh Anta Diop de Dakar. p 53.
- **Mami .A., (2013).**Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocines à large spectre d'action vis-à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires en Algérie. Thèse de Doctorant. Université d'Oran.
- **Mandelker, L. (2008).** Introduction to oxidative and mitochondrial dysfunction. *Vet Clin : Small Anim Practice.* f. r. Oxidative stress: the role of mitochondria, and antioxidants, Elsevier Inc. 38: 1-30.
- **Mariod A.A., Mohamad-Ibrahim R., Ismail M. et Ismail N, (2009).** Antioxidant activity and phenolic content of phenolic rich fractions obtained from black cumin (*Nigella sativa*) seedcake. *Food Chemistry.* 116: 306-312.
- **Maryse,,A, Danielle,,C,** Laboratoire de Bactériologie Hygiène.CHU Toulouse Rangueil Fiche technique _ Bactériologie 053 / 073EN.FTBAC. 27-08-11.01 Emis le 5 juin (2007).
- **Médele, F., Leblanc, J.C. et Gros, P. (2008).** Le poisson : quels enjeux pour sa Medicinal Plants against Protein Degradation, Lipid Peroxidation and Deformability
- **Meral, I., et Kanter, M. (2003).** Effects of *Nigella sativa* L. and *Urtica dioica* L.on selected mineral status and hematological values in CCl4-treated rats. *Biol Trace*
- **Meral, I., Yener, Z., Kahraman, T., et Mert, N. (2001).** Effect of *Nigella sativa* on glucose concentration, lipid peroxidation, anti-oxidant defence system and liver damage in experimentally induced diabetic rabbits. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med ,* 48, 593-599.
- **Merfort I., Wray V., Barakat H., Hussein S. A. M., Nawwar M. A. M., Willuhn G.** Flavonol triglycosides from seeds of *Nigella sativa*. *Phytochemistry.* (1997); 46: 359-363.
- **Merfort I., Wray V., Barakat H., Hussein S., Nawwar M., Willuhn G, (1997)** Flavonoid triglycerides from seeds of *Nigella sativa*. *Phytochemistry.*; 46 PP

.359-363

- **Meyer A.; Deiana J. et Leelere H, (1999).**Agents chimiothérapeutiques .In «Cours de microbiologie générale», Ed.: Doin Paris, ISBN2-70-40-0745-4,PP 220-236.
- **Meziti A, (2009).**Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* L. Etude in vitro in vivo. Thèse de magistère. Département des sciences biologique. Universities de El-Haj lekhder (Batna) Algérie .
- **Mills, G.C. (1957).** Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *The Journal of Biological Chemistry*,229: 189-197.
- **Mohammedi Z. (2006).** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles Essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse De Magistère. Université Abou Bakr Belkaïd, Tlemcen
- **Moller P., Wallin H., Knudsen L. E.** Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chem BiolInteraet.* (1996); 102: 17-36. monde bactérien. Doin Editeurs, Paris] .
- **Morikawa. T., X. Fengming., N. Kiyofumi., M. Hisashi., M. Yoshikawa. (2004) a** «Nigellamines A3, A4, A5 and C, new dolabellane-type diterpene alkaloids with lipid metabolism promoting activities from the egyptian medicinal food black cumin.» *Chem.Pharm.Bull.:* 52 494-7
- **Morikawa.T., X. Fengming., K. Yousuke. , M. Hisashi., N. Kiyofumi., M. Yoshikawa. (2004) b.** «Novel dolabellane-type diterpene alkaloids with lipid metabolism promoting activities from the seeds of *Nigella sativa*». *Org.Lett:* 6, 869-872.
- **Morsi Nm.,(2000).** . Antimicrobial effect of crude extracts of *Nigella sativa* on multiple antibiotics-resistant bacteria. *Acta Microbiol Pol;* 49(1):63-74.
- **Mr BENZINE Ouahid ,(2014).** Caractérisation par HPLC de quelques composés chimique de l'huile de nigelle (*Nigella Sativa*), et recherche d'une activité antimicrobienne. Mémoire fian d'étude, université Aboubekr Belkaid-telemcen p.19
- **Mukhallad. A., A. Mohamad., & D. Hatham.(2009).** «Effects of Black Seeds (*Nigella saitva*) on Spermatogenesis ans fertility of Male Albino Rats.» *Res J Med Med Sci ,* 4 (2), 386-390
- **Naczk, M.; and Shahidi, F. (2004).** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A.* 1054: 95-111.

- **Nagi, M., Alam, K., Badary, O., AL-SHABANAH, O., AL-sawaf, H., et Albekairi, A. (1999).** Thymoquinone protects against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice via an antioxidant mechanism. *Int J Biochem Mol Biol*, 47,153-159.
- **Nair MK, Vasudevan P, Venkitanarayanan K,(2005).** Antibacterial effect of black seedoil on *Listeria monocytogenes*. *Food Control* .16: 395–398
- **Nair, M.K., Vasudevan, P., Venkitanarayanan. K. (2005)** Antibacterial effect of black seed oil on *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 16: 395-398.
- **Nauciel C., Vilde JL, (2006),** Bactériologie médicale. *Elsevier Masson Ed., Paris*, 257 p.
- **Nergiz. C. et S. Otles. (1993).** Chemical composition of *Nigella sativa* L. seeds. *Food Chemistry* : 48 259-61.
- **Orientica, (2010)Guérir par la graine noire.,** Paris: Orientica. 64
- **Orsi – llinares, (2005).** La nigelle, une épice d’interet medicinal. Thèse du doctorat en pharmacie. Université joseph fourier. Faculte de pharmacie p.15
- **Orsi –Llinares.F. (2005).** La nigelle, une épice d’interet medicinal. Thèse de doctorat en pharmacie. Université Joseph Fourier. Faculte de Pharmacie.
- **Orsi-Llinares, (2005).** La nigelle, une épice d’intérêt médicinal. Thèse du doctorat en pharmacie. Université Joseph Fourier. P 01.
- **Orsi-Llinares, (2005).** La nigelle, une épice d’intérêt médicinal. Thèse du doctorat en pharmacie. Université Joseph Fourier. P 82.
- **Palleroni N.J, (2008).** The road to the taxonomy of *Pseudomonas*. In: *Cornelis, Pseudomonas Genomics and Molecular biology*. Caister Academic press, Belgium.p1-18.
- **Peyramaure Sandra L, (2008).** Troubles urinaires et prostatiques. *Actualités pharmaceutiques*, N°480.
- **Pincemail J.; Bonjean K.; Cayeux K. et Defraigne J.-O, (2002).** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition et stress oxydant. Nutrition clinique et métabolisme*, 16, PP 233-239
- **Pincemail, J. ; Bonjean, K. ; Cayeux, K. and Defraigne, J.O. (2002).** Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 16: 233-239.
- **Powers, S. et M. Jackson (2008),** "Exercise-induced oxidative stress: cellularmechanisms and impact on muscle force production." *Physiol Rev*

88: 1243-1276.

- **Powers, S. and M. Jackson (2008).** "Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production." *Physiol Rev* 88: 1243-1276.
- **Powers, S. K., D. Criswell, et al. (1994).** "Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **266**: 375-380.
- **Pryor W. A, (1986).** Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions, *Annual review of physiology* 48, 657-667.
- **Ragheb, A, Attiat, A, Eldin, W, Elbarbry, F. S, et Shoker, A (2009).** The protective effect of thymoquinone, an anti-oxydant and anti-inflammatory agent, against renal injury : A review. *Saudi J Kidney Dis Transpl* , 20, 742-752.
- **Raza, A., Asif, R., Yasin, G. (1999)** Use of *Nigella sativa* (Ranunculaceae): a traditional medicine. *International Journal of Agriculture and Biologie*, 3: 184-187.
- **Ribereau-Gayon P,(1972).**Propriétés chimiques des phénols. In "lecomposés phénoliques des végétaux". Edition Dunod Paris, P 29-57
- **Richter, G. (1993).** Les composés phénoliques métabolisme des végétaux, (physiologie et biochimie), *Edition Dunod*, 331-339.
- **Rosine C.,Momo D. (2009).**Evaluation de l'activité antidermatophytique des extraits au méthanol et fractions d'*acalyphamma hirtum* (melastomatacees). Université de Dschang– Master en biochimie clinique et pharmacologie.
- **Rotsart. H, et coll, (1984).** Notions de pharmacologie pour les régions tropicales, *Kangu/mayumbe (Zaire)*. BERPS. pp : 277.
- **Saidi B(2012).** La graine de Nigelle : remède sacré ou sacré remède? Paris: Les Quatres Sources.
- **Salem E.M., Yar T., Bamosa A.O., AL-Quorain A., Yasawy M.I., ALSulaiman R.M., Randhawa M.A,(2010).** Comparative study of *Nigella Sativa* and triple therapy in eradication of *Helicobacter Pylori* in patients with non-ulcer dyspepsia. *Saudi J. Gastroenterol.* 16: 207-214.
- **Salem, M. (2005).** Immunomodulatory and therapeutic properties of *Nigella sativa*.
- **Salemal, M., et Hossain, M. (2000).** Protective effect of black seed oil from *Nigella sativa* against murine cytomegalovirus infection. *int j immunopharmacol* ,22(9),p.729-740.

- **Salomi, MJ. Nair, SC. and Panikkar, KR² (1991).** Inhibitory effects of *Nigella sativa* and saffron (*Crocus sativus*) on chemical carcinogenesis in mice. *Nutr Cancer*, 16, pp. 67-72.
- **Sanchez-Moreno, C, (2002)** Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *International Journal of Food Science and Technology*. 8: 121-137.
- **Semmar . R ; Narimane, Bensikhelifa. N. (2017).** Études phytochimiques et biologiques comparatives chez l'espèce *Nigella arvensis* (Habba sawda) et *Nigella sativa* (Sinoudj) , Université des Frères Mentouri Constantine 1 , p.1
- **SEMMAR Rania Narimane, BENSIKHELIFA Narimane (2017).** Études phytochimiques et biologiques comparatives chez l'espèce *Nigella arvensis* (Habba sawda) et *Nigella sativa* (Sinoudj) , Université des Frères Mentouri Constantine 1 , p.6
- **Sokmen A., Gulluce M., Askin Akpulat H., Daferera D., Tepe B., Polissiou M., Sokmen M. and Sahin F,(2004).** The *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control*.15: 627-634.
- **Sokmen, A., Jones, B.M., Erturk, M. (1999)** The *in vitro* antibacterial activity of Turkish medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 67: 79-86.
- **Sorg O. (2004)** Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies*. 327, 649-662.
- **Sorg, O, (2004).** Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies*. 327: 649-662
- **Sturtz, L.A., Diekert, K., Jensen, L.T., Lill R., et Culotta V.C.(2001).** A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J. Biol. Chem.* 276 :38084-38089.
- **Su, H., Nguyen, K., Salazar-Mather, T., Ruzek, M., Dalod, M., et Biron, C. (2001).** NK cell functions restrain T cell responses during viral infections. *Eur J Immunol* , 31, 3048-3055.
- **Suboh, S., Bילו, Y., et Aburjai, T. (2004).** Protective Effects of Selected Medicinal Plants against Protein Degradation, Lipid Peroxidation and Deformability Loss of Oxidatively Stressed Human Erythrocytes. *Phytother Res* , 18, 280-284

- **Sutra, L., Federighi, M and Jouve, J. L. (1998).** Manuel de Bactériologie Alimentaire. Ed. Polytechnica, p. 53 -81.
- **Swamy, SM. and Tan, BK. (2000).** Cytotoxic and immunopotentiating effects of ethanolic extract of *Nigella sativa* L. seeds. *J Ethnopharmacol*, 70, pp. 1-7.
- **Tariq M.(2008)***Nigella Sativa* seeds: Folklore treatment in modern day medicine. *The Saudi Journal of Gastroenterology*; 14(3):105-106
- **Telaidji, A. N.,(2018).** Caractérisation chimique et activités biologiques (*in vitro* et *in vivo*) de l'extrait méthanolique de *Juniperus phoenicea l.* Mémoire. Biochimie/Nutrition moléculaire et santé. Université des frères Mentouri Constantine, Algérie.
- **Tessier, F. et Marconnet, P. (1995).** Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice.*Science and Sports*, 10: 1-13.
- **Thabrew M.I., Mitry R.R., Morsy M.A., Hughes R.D. (2005).** Cytotoxic effects of a decoction of *Nigella sativa*, *Hemidesmus indicus* and *Smilax glabra* on human hepatoma HepG2 cells. *Life Sciences*. 77: 1319-1330.
- **Tison E., Millaire A., Degrote P.,Ducloux G., (1989),** Les radicaux libres en pathologie cardiovasculaire. *Lille médical*, 7 :295-307
- **Toparslan, C., (2012),** À propos de *Nigella sativa* L., Lorraine: Nancy. p. 136.
- **Touyz R. M. (2004)** Reactive Oxygen Species, Vascular Oxidative Stress, and Redox Signaling in Hypertension What Is the Clinical Significance?. *Hypertension*. 44, 248-252.
- **Turkdogan, M., Agaoglu, Z., Yener, Z., Sekeroglu, R., Akkan, H., et Avci, M. (2001).** The role of antioxidant vitamins (C and E), selenium and *Nigella sativa* in the prevention of liver fibrosis and cirrhosis in rabbits: new hopes. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 108, 71-73.
- **Valentine,S.A.,Chen,G.,Shandla,T.,Fernandez,J.,Mische,S.,Saint,R.,Courey,A.J. (1998).**Dorsal-mediated repression requites the formation of a multiprotein repression complex at the ventral silencer.*Mol.Cell.Biol.*18(11) :6584-6594.
- **Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T. D.; Mazur, M. and Telser, J. (2007).** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Biology celularl*. 39:44-84.
- **Vermerris W., Nicholson R. (2006)** Phenolic compound biochemistry. *Springer*. PP: 69-149

- **Vivas de Gaulejac.(2001).**identification of procyanidine.
- **Von Sonntag C. (2008).**The energetics of rearrangement and water elimination reactions in the radiolysis of the DNA bases in aqueous solution. DAFT calculations .Radait Res 169 :355-363.
- **WICHTL M. (2003); ANTON R.** Plantes thérapeutiques. 2 -ème édition, Tec & Doc, Tournai (Belgique),
- **Wink, D. A., Nims, R. W., Saavedra, J. E., Utermahlen, W. E., JR. et Ford, P. C. (1994).** The Fenton oxidation mechanism: reactivities of biologically relevant substrates with two oxidizing intermediates differ from those predicted for the hydroxyl radical, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 6604-6608.
- **Winson, G.L.(2016).** Bactérie *Pseudomonas aeruginos*. (www.pseudomonas.com).
- **Wong, S.P., Leong, L.P., William Koh, J.H, (2006).**Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry*. 99: 775-783.
- **Yoshikawa T. and Naito Y. (2000)** The role of neutrophils and inflammation in gastric mucosal injury. *Free Radical Researc*. 33, 785-794.
- **Zahoor A., Ghafoor A., Aslam M.** Nigella sativa: A potential commodity in crop diversification traditionally used in healthcare. In introduction of medicinal herbs and spices as crops. Ministry of Food, Agricultur and Livestock, Pakistan. 2004; 5-31.
- **Zelko, I. N.; Marian, T. J. and Folz, R. J. (2002).** Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free radical biology & medicine*. 33: 337-349
- **Zhao H., Fan W., Dong J., Lu, J., Chen J., Shan L., Lin Y., Kong W, (2008).** Evaluation of antioxidant activities and total phenolic contents of typical malting barley varieties. *Food Chemistry*. 107: 296-304.
- **Zweier J.L. and Hassan Talukder M.A. (2006)** The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovas. Res*. 70(2), 181-190.

ANNEXES

Annexe 01 : Composition de Milieux de culture ‘Gélose Nutritive’.

- ✓ Peptone..... 10g ;
- ✓ Extrait de viande5g ;
- ✓ Chlorure de sodium..... 5g ;
- ✓ Gélose...15g ;
- ✓ PH=7,2 ;
- ✓ Autoclavage 20 minutes à 120°C.

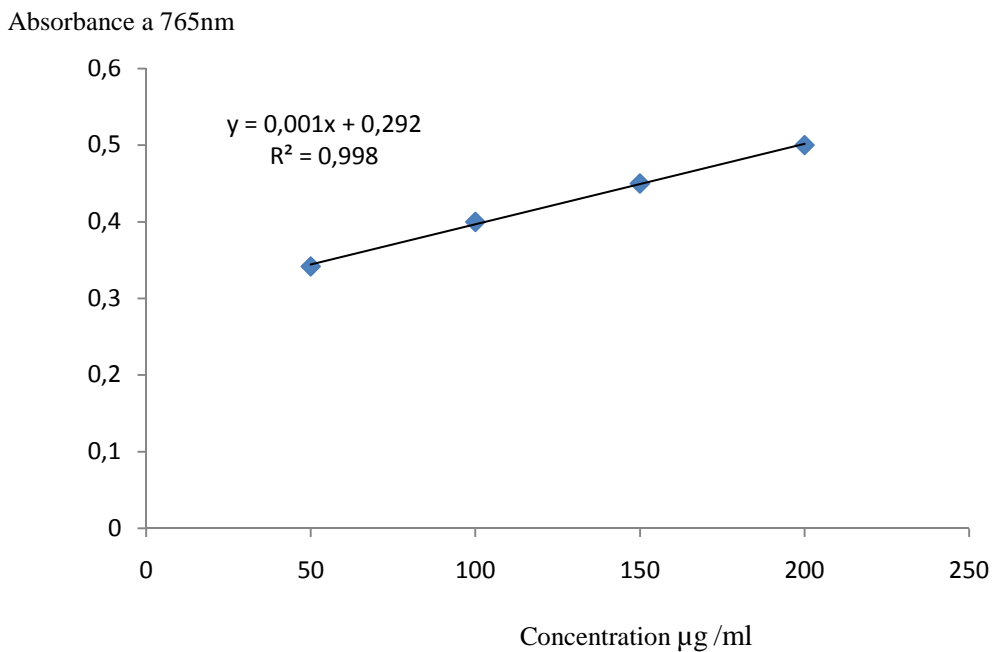
Annexe 02: Composition de Milieux de culture ‘Muller Hinton (MH)’.

- ✓ Peptone de caséine... 17,5g
- ✓ Amidon1,5g
- ✓ Extrait de viande2g

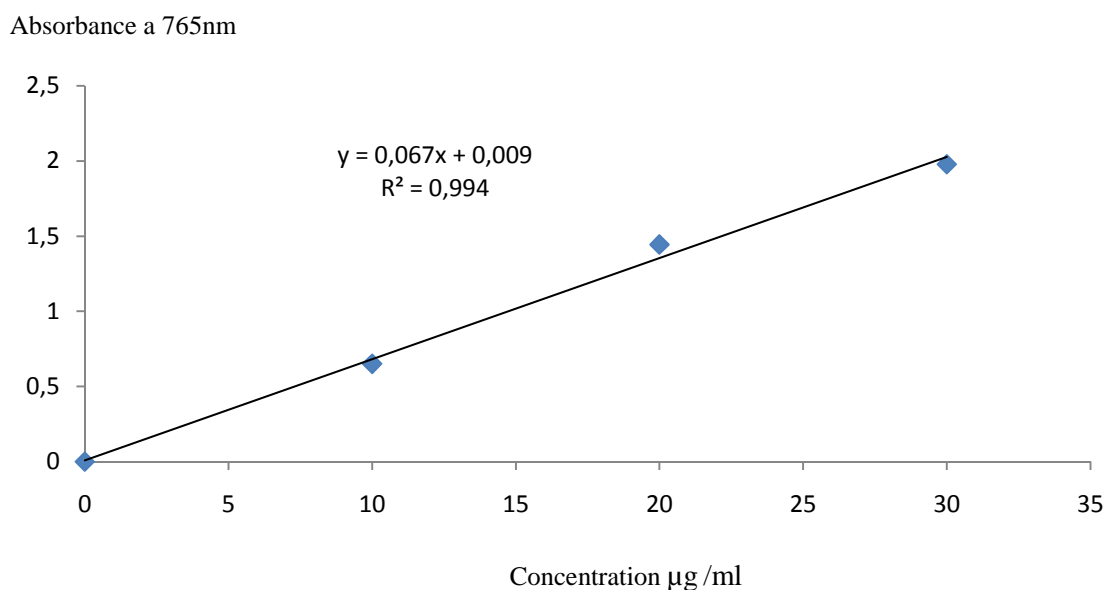
Annexe 03: Composition de l’eau physiologie.

- ✓ Chlorure de sodium..... 17g ;
- ✓ Eau distillée..... 1000ml.

Annexe 04 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne ± SD de trois essais)



Annexe 05 : Droite d'étalonnage de la quercétine (moyenne \pm SD de trois essais).



Annexe 06 : Activité antiradicalaire des extraits des graines de *Nigella sativa*, de l'extraits méthanolique (MET et MET) et l'extrait aqueux AQ (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD)

