



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche
scientifique



Université les Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم الكيمياء الحيوية- البيولوجيا الخلوية والجزيئية

Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biochimie Appliquée

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé

**Caractérisation et évaluation des activités biologiques des molécules
et extraits de *Nigella sativa* L.**

Présenté par :

MESBAH Rokia

&

FIALA Samah

Jury :

Présidente : Mme. BOUTAGHANE Naima

MCA- UMC1, Constantine 1

Encadreur : Mme. MOSBAH Asma

MCA- UMC1, Constantine 1

Examinatrice : Mme. TENIOU Soumia

MAA- UMC1, Constantine 1

Année universitaire
2020 – 2021

Remerciements

Nos vifs remerciements vont en premier lieu pour Allah pour nous avoir protégé, guidé et orienté durant toute notre vie et tout au long de notre parcours universitaire, à lui nous croyons et à son destin nous admettons.

*Nous désirons exprimer notre profond remerciement et vive reconnaissance à notre encadreur **Mlle :MOSBAH.Asma** . pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigoureuse scientifique. On vous remercie pour votre disponibilité, vos précieux conseils, la confiance que vous nous avez accordés et le suivi régulier de l'élaboration de ce travail*

Nos remerciements sont également pour les membres de jury :

***Mme.BOUTAGHANE Naima** et **Mme.TENIOU Soumia** de nous avoir fait l'honneur de juger ce travail.*

Nous adressons nos remerciements aux personnes qui nous ont aidés dans la réalisation de ce mémoire et spécialement au personnel du laboratoire de Biochimie, laboratoire D'analyse de qualité ainsi que le laboratoire de Microbiologie du Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine.

Nos sincères remerciements et nos profonde gratitude

*A **Mme:OUFROUKH.A** et **Mr : KASHI.I**, **Mme IKHLEF.A**, **Melle MAGHEZZI.A**, **Mr LACHELAH.H**, **Mme CHOUH.A**, **Melle KHATABI.L**, **Melle MEZIANI.L**, **Mr AHMEDALAOUI.H**, **Mme SELLAMI .F** et **GALI.L***

*A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire,
On tient à vous dire*

Merci...

Rokia & Samah

Dédicace

*A celui qui attend mon retour à chaque coucher de soleil
A celui qui fut le plus brave des hommes, m'ouvrant ses bras dans les sombres
moments et m'aidant à aller de l'avant vers le meilleur, et qui m'a tant soutenu
moralement et matériellement **mon père HOCINE.***

*A celle qui m'a comblée d'affection, d'amour et
de tendresse, et qui a veillé à coté de mon berceau pour consoler mes cris de
douleurs, et qui n'a jamais cessé de le faire, à la pensée de **ma mère BADDIA**
qu'elle restera à jamais gravé dans mon cœur et mon esprit. Paix à son âme.*

*A ma grand-mère, ma tante **KHADRA.M**
A mes très charmantes sœurs **Wahiba, Farah, Djalila**
A mon frère **Hakim** et à toute la famille **MESBAH** grande et petite*

A mes petites nièces

♥♥♥ Loudjeine, Assyl, Lidia ♥♥♥

*A mon oncle **Mahmoud** et sa Femme **Louiza***

*Mon cousin : **Adel***

*A ma chère sœur **Nadjet** qui m'a beaucoup encouragé tout au long de ce travail.
Merci d'avoir montré beaucoup de patience envers moi durant les moments les
plus stressants, merci pour ta fidélité et ta gentillesse.*

*A mon binôme **Sameh** avec laquelle j'ai partagé beaucoup de joies et de difficultés
au cours de notre travail.*

*A tous ceux qui m'estiment et me portent dans leur cœur ,
ghalia , Samira ,Asma, Asma, Amel, Assia, Sarah, Hiba*

A tous mes amies et mes collègues.

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

Dédicace

*A la mémoire de mon père, le grand amour de ma vie, vous avez laissé un grand vide dans ma vie mais rien à faire face à la volonté de Dieu, Dieu vous accueille dans son paradis, vous restez toujours dans mon cœur...**Abi***

*Avec mes vifs remerciements et ma profonde gratitude je vous dédie, chère mère **Oumi** ce modeste travail. Je ne pourrais jamais être à la hauteur de vos sacrifices et patience. Mon amour, ma tendresse et ma reconnaissance sont infinies. Je prie Dieu pour qu'il vous accorde santé et une longue vie.*

*Je le dédie aussi à toi, mon cher mari, **Heidar**. Je ne pourrai jamais te remercier assez pour ton aide, patience et encouragements. Merci infiniment, je t'aime très fort.*

*A mon petit prince, la lumière de ma vie, A toi mon fils **Anouar**, je t'aime très fort.*

*A mes chers grands frères **Lazhar, Samy** ;*

*A ma chère grande sœur **Chihene** ;*

*Mes belles sœurs **Amel et Oumnia** ;*

*A mes nièces **Mayssen, Ryhem, Rymel** ;*

*Mon neveu : **Ayhem** ;*

*Merci pour tout, pour vos encouragements et soutien. **JE VOUS AIME TRES FORT***

*A mon petit frère **Islem**.....merci infiniment pour tout ce que tu as fait pour moi.*

*A mon cher oncle **Mouhamed**, mes remerciements ne pourront jamais égaler votre grand cœur qui m'a apporté du soutien moral où j'avais besoin d'aide, vous étiez pour moi un deuxième père, je vous aime très fort.*

*A toute ma famille et surtout ma cousine **Nabila** : thank you very much for everything.*

A mon beau-père et belle-mère ; je prie Dieu pour qu'il vous accorde santé et une longue vie.

*A mon Binôme et amie **Rokia** pour ton soutien moral ta patience et ta compréhension tout au long de ce travail.*

*A tous mes amis je vous remercie pour votre amitié, votre soutien et encouragements, surtout pour tous les bons moments : **Randa, Selma, Bessma, Monira, Assia, Amel, Asma, Asma, Hadjer, Malika, Selma.***

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

Samah

Résumé

Ce travail de recherche est effectué dans le but de caractériser et évaluer les activités biologiques, antioxydante et antibactérienne, des molécules bioactifs (thymoquinone TQ et thymol TM) et extraits (huile totale HT et extrait méthanolique EM) appartenant à la plante *Nigellasativa* L.

Le rendement d'extraction de HT et EM est de 10.24 g et 14.27 g respectivement. L'analyse fine par HPLC des deux extraits huile totale et extrait méthanolique a permis de dévoiler la teneur en thymoquinone (776.68039 µg/ml et 1191.79277 µg/ml respectivement) et en thymol (51.76347 µg/ml et 25.65079 µg/ml respectivement) ainsi que la teneur en acide dihydrobenzoïque, acide hydrobenzoïque, acide coumarique, acide ferulique, acide hydrocinnamique, acide dihydrocinnamique et acide vanillique.

L'étude de l'activité antioxydante, à travers les six tests réalisés (DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP, phénantroline, et la β-carotène), a montré que le thymol présente la meilleure activité antioxydante suivi de la thymoquinone, l'extrait méthanolique et l'huile totale, alors que le test de blanchissement de β-carotène indique que l'huile totale présente la meilleure activité suivie de la thymoquinone, le thymol et l'extrait méthanolique.

L'évaluation de l'activité antibactérienne a indiqué que la bactérie Gram+ (*B.cereus* ATCC 11778) présente une extrême sensibilité vis-à-vis les deux molécules (thymoquinone et thymol) et les extraits (l'huile total et extrait méthanolique), tandis que la bactérie Gram- (*E.coli* ATCC 25922) présente une résistance vis-à-vis la thymoquinone, l'huile totale, l'extrait méthanolique et une forte sensibilité pour le thymol.

En conclusion, les résultats de ce travail révèlent la richesse des graines de *Nigellasativa* L. en composés bioactifs qui lui confèrent des propriétés thérapeutiques significatives, pouvoir antioxydant et antibactérien, ce qui nous a permis de confirmer les caractéristiques pharmacologiques prometteuses de cette plante.

Mots clés: *Nigellasativa* L., activités antioxydants, activité antibactérienne, thymoquinone, thymol, huile totale, extrait méthanolique, HPLC.

Abstract

This research study was performed in order to evaluate and characterize biological activities, antioxidant and antibacterial, of bioactive molecules (thymoquinone, thymol) and extracts (total oil TH and methanolic extract ME) belonging to *Nigella sativa* L plant.

Extraction yield of HT and EM was of 10.24g and 14.27g respectively. A fine analysis of the total oil and methanolic extract made by HPLC revealed a content of thymoquinone (776.68039 $\mu\text{g} / \text{ml}$ and 1191.79277 $\mu\text{g} / \text{ml}$ respectively) and of thymol (51.76347 $\mu\text{g} / \text{ml}$ and 25.65079 $\mu\text{g} / \text{ml}$ respectively) as well as dihydrobenzoic acid, hydrobenzoic acid, coumaric acid, ferulic acid, hydrocinnamic acid, dihydrocinnamic acid and vanillic acid.

The antioxidant activity study using the six tests (DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP, phenantroline, and β -carotene) revealed that thymol had the best antioxidant activity followed by thymoquinone, methanolic extract and total oil whereas, β -carotene bleaching test indicates that total oil has the best activity followed by thymoquinone, thymol and methanolic extract.

The antibacterial activity assessment demonstrated that Gram + bacteria (*B.cereus* ATCC11778) presented an extreme sensitivity with both molecules (thymoquinone, thymol) and also the extracts (total oil, methanolic extract) while, Gram- bacteria (*E.coli* ATCC 25922) had a resistance to thymoquinone, total oil, methanolic extract and high sensitivity to thymol.

In conclusion, the results of this study revealed the richness of *Nigella sativa* L. seeds with bioactive compounds, which give it significant therapeutic properties, antioxidant and antibacterial capacities, based on these results; we may confirm the promoters pharmacological properties of this plant.

Keywords: *Nigella sativa* L., antioxidant activities, antibacterial activity, thymoquinone, thymol, total oil, methanolic extract, HPLC.

ملخص

يهدف هذا البحث الى توصيف وتقييم الأنشطة البيولوجية، كمضادات الأكسدة و الجراثيم،للجزيئات النشطة بيولوجيًا (ثيموكينونوثيمول) والمستخلصات (الزيت الكلي HTوالمستخلص الميثانولي EM) التي تنتمي إلى نبات *Nigella sativa L.*

قدرت كمية HTوEM المستخلصة ب 10.24 g و 14.27 g على التوالي. أظهر التحليل الدقيق بواسطة HPLC للمستخلصين، الزيت الكلي والمستخلص الميثانولي، محتوى ثيموكينون ب 776.68039 ميكروغرام / مل و 1191.79277 ميكروغرام / ملعلى التوالي والثيمول ب 51.76347 ميكروغرام / مل و 25.65079 ميكروغرام / ملعلى التوالي وكذلك محتوى حمض ثنائي هيدروبنزويك، وحمض الهيدروبنزويك، وحمض الكوماريك، وحمض الفيروليك، وحمض الهيدروسيناميك، وحمض ثنائي هيدروسيناميك وحمض الفانيليك.

أظهرت دراسة نشاط مضادات الأكسدة من خلال ستة اختبارات أجريت (DPPH و ABTS و CUPRAC و FRAP و β -carotene وphénantroline) أن الثيمول أظهر أفضل نشاط مضاد للأكسدة ، يليه الثيموكينون ، المستخلص الميثانولي والزيت الكلي ، بينما أظهر اختبار التبييض بيتا كاروتين أن الزيت الكلي كان له أفضل نشاط يليه الثيموكينونوالتيمول والمستخلص الميثانولي.

أشار تقييم الفعالية المضادة للبكتيريا إلى أن بكتيريا الجرام + (*B. cereus ATCC11778*)تظهر حساسية شديدة تجاه الجزيئين (ثيموكينونوثيمول) والمستخلصات (الزيت الكلي والمستخلص الميثانولي) ، في حين أن جرثومة الجرام- (*E.coli ATCC25922*)مقاومة للثيموكينون والزيت الكلي والمستخلص الميثانولي ويملك حساسية عالية للثيمول.

في الختام، تكشف نتائج هذا العمل عن ثراء بذور *Nigella sativa L.* بالمركبات النشطة بيولوجيًا التي تمنحها خصائص علاجية مهمة ، كمضادات للأكسدة و مضادات للجراثيم ، مما سمح لنا بتأكيد الخصائص الدوائية الواعدة لهذا النبات.

الكلمات المفتاحية: *Nigella sativa L.*، الأنشطة المضادة للأكسدة ، النشاط المضاد للبكتيريا ، الثيموكينون ، الثيمول ، الزيت الكلي ، المستخلص الميثانولي ، HPLC .

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction

I.1	Généralité	3
I.2	Huile de la plante.....	3
I.2.1	Composition de l'huile de la graine de <i>Nigella sativa</i> L.	3
I.2.1.1	Composés lipidiques.....	4
I.2.1.2	Composés phénoliques et quinoniques.....	4
I.2.1.3	Composés vitaminiques.....	4
I.2.1.4	Eléments minéraux	5
I.2.1.5	Huile essentielle (huile volatile).....	6
I.2.2	Toxicité de l'huile.....	6
I.2.3	Effets pharmacologiques	6
I.2.3.1	Effet anti-convulsif.....	6
I.2.3.2	Effet anti-inflammatoire	6
I.2.3.3	Effet antipyrétique et analgésique	7
I.2.3.4	Effet antirhumatismale	7
I.2.3.5	Effet antiallergique	7
I.2.3.6	Effet Antidiabétique	8
I.3	Molécules majeurs de la plante	9
I.4	Thymoquinone et thymol	9
I.4.1	Thymoquinone.....	9
I.4.1.1	Structure et propriétés.....	9
I.4.1.1	Toxicité.....	10
I.4.1.2	Effets pharmacologiques de la thymoquinone.....	10
I.4.2	Thymol	15
I.4.2.1	Structure et propriétés.....	15
I.4.2.2	Toxicité du thymol	15
I.4.2.3	Effets pharmacologiques de thymol	16
II.	Matériel et méthodes	21
II.1	Matériel végétal.....	21
II.1.1	Graine de <i>Nigella sativa</i> L.....	21
II.2	Extraction de l'huile totale de <i>Nigella sativa</i> L.....	21
II.3	Méthode d'analyses phytochimiques	23

II.3.1	Conditions chromatographiques	24
II.3.2	Préparation des échantillons	24
II.3.3	Gradient d'élution.....	24
II.4	Activités biologiques	25
II.4.1	Activité antioxydante.....	25
II.4.1.1	Activité du piégeage de DPPH	25
II.4.1.2	Activité du piégeage de l'ABTS.....	26
II.4.1.3	Test de la capacité antioxydante par réduction de l'ion cuprique (CUPRAC).....	26
II.4.1.4	Test de l'activité du phénanthroline	27
II.4.1.5	Test de la capacité antioxydante par réduction de fer (Pouvoir réducteur)	27
II.4.1.6	Test de blanchiment de β -carotène	27
II.4.2	Activité antibactérienne.....	28
II.4.2.1	Souches bactériennes.....	28
II.4.2.2	Conservation des souches bactériennes.....	28
II.4.2.3	Préparation de l'inoculum	28
III.	Résultats et Discussion.....	31
III.1	Rendement de l'extraction.....	31
III.2	Activités antioxydantes	32
III.2.1	Tests de piégeage des radicaux libres.....	32
III.2.1.1	Radical libre DPPH	32
III.2.1.2	Radical libre ABTS+•.....	33
III.2.2	Activité du pouvoir réducteur.....	34
III.2.2.1	Réduction du complexe cuivre-néocuproïne (CUPRAC).....	34
III.2.2.2	Activité de réduction de Fe^{+3} (FRAP)	35
III.2.3	Activité de réduction par la formation du complexe Fe^{+2} -phénantroline	37
III.2.4	Test de blanchiment de β -carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique.....	38
III.3	Analyse d'HPLC	39
III.3.1	Analyse de l'huile totale.....	40
III.3.2	Analyse de l'extrait méthanolique.....	40
III.4	Activité antibactérienne.....	42
IV.	Références bibliographiques :	50

Annexes

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure chimique de la thymoquinone (Darakhshan et <i>al.</i> , 2015).....	10
Figure 2 : Structure de base du thymol.....	15
Figure 3 : Fleurs (a) et graines (b) de <i>Nigella sativa</i> L. appartiennent au Sahara algérienne.....	21
Figure 4 : Différentes étapes d'extraction de HT.	22
Figure 5 : Schéma d'extraction de HT et de EM à partir des graines de <i>Nigella sativa</i> L.	22
Figure 6 : Chromatographie liquide à gradient ternaire haute performance (HPLC-DAD) Centre de Recherche en Biotechnologie(CRBT).....	23
Figure 7 : Réaction de test DPPH (2.2 Diphenyl 1 picrylhydrazyl).	25
Figure 8 : Réaction de test DPPH (2.2 Diphenyl 1 picrylhydrazyl).	26
Figure 9 : Réaction de CUPRAC (Ozyurek et <i>al.</i> , 2011).	26
Figure 10 : Rendement des extraits de <i>Nigella sativa</i> L.....	31
Figure 11 : Effet piègeur du radical DPPH par les extraits et les molécules de <i>Nigella sativa</i> L.	32
Figure 12 : Effet piègeur du radical ABTS par les extraits et les molécules de <i>Nigella sativa</i> L.	34
Figure 13 : Effet réducteur du CUPRAC par les extraits et les molécules de <i>Nigella sativa</i> L.	35
Figure 14 : Effet du pouvoir réducteur par les extraits et les molécules de <i>Nigella sativa</i> L.....	36
Figure 15 : Effet réducteur de phénantroline par les extraits et les molécules de <i>Nigella sativa</i> L.....	37
Figure 16 : Effet du blanchiment du β -carotène par les extraits et les molécules de <i>Nigella sativa</i> L..	39
Figure 17 : Chromatogramme des standards thymoquinone (a) et thymol (b).....	39
Figure 18 : Chromatogramme de HT (diluée à 1/9) superposé avec les standards.	40
Figure 19 : Chromatogramme de l'extrait méthanolique (dilué à 1/9) superposé avec les standards. ..	40
Figure 20 : Résultat de l'activité antimicrobienne de HT <i>Nigella sativa</i> L. sur les souches à Gram- (<i>E.coli</i>).....	44
Figure 21 : Résultat de l'activité antimicrobienne de HT <i>Nigella sativa</i> L. sur les souches à Gram+ (<i>B.cereus</i>).	44
Figure 22 : Résultat de l'activité antimicrobienne de la TQ sur les souches à Gram - (<i>E.coli</i>).....	44
Figure 23 : Résultat de l'activité antimicrobienne de la TQ sur les souches à Gram + (<i>B.cereus</i>).	44
Figure 24 : Résultat de l'activité antimicrobienne de TM sur les souches à Gram - (<i>E.coli</i>).....	45
Figure 25 : Résultat de l'activité antimicrobienne de TM sur les souches à Gram+ (<i>B.cereus</i>).	45
Figure 26 : Résultat de l'activité antimicrobienne de EM sur les souches à Gram- (<i>E.coli</i>).....	45
Figure 27 : Résultat de l'activité antimicrobienne de EM sur les souches à Gram + (<i>B.cereus</i>).	45
Figure 28 : Souches à Gram + (<i>B.cereus</i>) (a) et Gram- (<i>E.coli</i>) (b).	46
Figure 29 : Témoin négatif avec les souches à Gram + (<i>B.cereus</i>) et Gram- (<i>E.coli</i>).	46

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Composés lipidiques de l'huile de <i>Nigella sativa</i> L.	4
Tableau 2: Composés phénoliques et quinoniques de l'huile de <i>Nigella sativa</i> L.	4
Tableau 3: Vitamines de l'huile de <i>Nigella sativa</i> L.	4
Tableau 4: Composés des éléments minéraux de l'huile de <i>Nigella sativa</i> L.	5
Tableau 5: Conditions de la chromatographie.	24
Tableau 6: Gradient d'élution.	24
Tableau 7: Liste des souches microbiennes testées.	28
Tableau 8: Rendement d'extraction de l'huile de <i>Nigella sativa</i> L. et de sa fraction.	31
Tableau 9: Valeurs des IC ₅₀ des extraits et molécules de <i>Nigella sativa</i> L.	32
Tableau 10: Valeurs des IC ₅₀ des extraits et molécules de <i>Nigella sativa</i> L.	33
Tableau 11: Valeurs des C _{0,50} des extraits et molécules de <i>Nigella sativa</i> L.	36
Tableau 12: Valeurs des C _{0,50} des extraits et molécules de <i>Nigella sativa</i> L.	36
Tableau 13: Valeurs des C _{0,50} des extraits et molécules de <i>Nigella sativa</i> L.	37
Tableau 14: Valeurs des IC ₅₀ des extraits et molécules de <i>Nigella sativa</i> L.	38
Tableau 15: Composants de l'huile totale de <i>Nigella sativa</i> L. par HPLC.	40
Tableau 16: Composants de la phase méthanolique par HPLC.	41
Tableau 17: Diamètres des zones d'inhibition des extraits et des molécules de <i>Nigella sativa</i> L.	42

LISTE DES ABREVIATIONS

C_{0,5} : Concentration indiquant 0,50 d'absorbance.
ABTS : Sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique).
AChE : Acétylcholinestérase
BHA : Butylhydroxyanisole
BHT : Butylhydroxytoluène
CUPRAC : Complexe cuivre- néocuproïne
DPPH : 2,2-diphényl -1-picryl hydrazyl
EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique
FRAP : Pouvoir réducteur
PH: Potentiel hydrogène
Ppm : Partie par million
SD : Standard de déviation
IC₅₀ : Concentration inhibitrice demi-maximale
ATCC : Américain Type of Culture Collection
BN : Bouillon Nutritif
DTQ : Dithymoquinone
HPLC : Chromatographie liquide sous haute pression
THQ : Thymohydroquinone
TM : Thymol
TQ : Thymoquinone
µg : Microgramme
g : Gramme
mg : Milligramme
kg : kilogramme
IFN γ : Interféran gamma
IgG_{1,2} : Immunoglobulines
DL₅₀ : Dose létale 50
GABA :Acide gamma-aminobutyrique
IL-1 :Interleukine 1
TNF: Facteur de nécrose tumorale
CMI: Concentration minimale d'inhibition
HT : Huile totale
EM : Extrait méthanolique
IG_E: Immunoglobuline E
Mm : Millimètre
ml : Millilitre
V/V : Volume / Volume
µL: Microlitre
NM : Nanomètre
DMSO : Diméthylsulfoxyde
E.coli : *Escherichia-coli*
B.cereus: *Bacillus cereus*

INTRODUCTION

Introduction

Nigella sativa L. est l'une des plantes médicinales les plus utilisées à travers le monde. Les extraits des graines de cette plante sont largement utilisés dans la médecine traditionnelle, contre de nombreuses pathologies telles que l'hypertension, le diabète, la fièvre, l'inflammation, les troubles broncho-pulmonaires et gastro-intestinaux...etc. Ainsi la graine de *Nigella sativa* L. est utilisée dans l'alimentation que comme « médicament » (Raza *et al.*, 1999; Toparslan, 2012).

L'absence de traces majeures de toxicité hépatique de l'huile totale de *Nigella sativa* L. et ses deux grandes fractions polaire et neutre font de cette plante l'objet de plusieurs études (Sobhi, 2014).

En raison de leur large domaine d'usage médicinal, les graines de *Nigella sativa* L. ont fait l'objet de plusieurs recherches phytochimiques intensives pour l'identification de ses principes actifs. Ces études ont révélé que les graines de cette plante sont très riches en métabolites secondaires et primaires, dont la teneur varie selon les conditions géographiques et climatiques, ainsi que les méthodes d'études (extraction et détection) (Abidi *et al.*, 2019).

Les propriétés pharmacologiques de cette plante sont attribuées à la présence de l'huile fixe, de l'huile essentielle, ou leurs constituants, la thymoquinone et le thymol. L'huile fixe est principalement composée d'acides gras saturés et insaturés (Amin *et al.*, 2010). Le composé éminent du cumin noir qui lui confère le caractère bioactif est estimé être la thymoquinone, même s'il est riche en de nombreux autres constituants actifs (Amin et Hosseinzadeh, 2016).

L'objectif de cette étude est la caractérisation et l'évaluation des activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits et molécules de *Nigella sativa* L. dans le but de valoriser ces constituants bioactifs et de les orienter vers l'utilisation thérapeutique comme produits antioxydants et antibactériens par excellence.

Ce travail contient une partie bibliographique, qui englobe l'état d'art sur la plante *Nigella sativa* L. et les deux molécules, la thymoquinone et le thymol. Une partie Matériel et méthodes, qui renferme l'extraction de l'huile totale et l'extrait méthanolique, une caractérisation par HPLC suivie d'une étude des activités antioxydante et antibactérienne des extraits et molécules de cette plante. Par la suite, nous avons analysé et discuté les résultats pour arriver à la conclusion finale qui répond à notre objectif.

CHAPITRE I

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1 Généralité

Nigella sativa L. est une plante à fleur annuelle, herbacée appartenant à la famille des Ranunculacées, originaire d'Asie du sud-ouest et cultivée dans des pays comme la région de la Méditerranée orientale, moyen orient, Europe du Sud, la Syrie, la Turquie, l'Arabie saoudite, le Pakistan et l'Inde (D'Antuono et al., 2002 ; Aljabre et al., 2005 ; Abidi et al., 2019).

La nigelle possède trois noms latins *Cuminum nigrum*, *Nigella indica* et *Nigella sativa* L. ce dernier étant le plus employé. Ces noms dérivés du latin "*Niger* " qui signifie noir. Cette plante possède plusieurs appellations à travers le monde, Sinouj, Sanouz, Shunez, Habbah sauda, Habbet el beraka, Kamun aswad en arabe. En Algérie, elle est connue sous le nom vernaculaire de *Sinouj* (Orsi-Ilinares, 2005 ; Ghedira et al., 2010 ; Toparslan, 2012, in Abed 2016).

La nigelle est très peu cultivée en Algérie, elle est limitée à l'échelle traditionnelle dans les régions de : Ouargla, Biskra, Timimoun, Adrar, Médéa et Skikda (Mokkedem, 2004; Benkaci, 2007).

I.2 Huile de la plante

L'huile végétale de *Nigella sativa* L. peut être obtenue par plusieurs méthodes ; pression à froid (extraction mécanique) ou par des techniques de pression à chaud permettant un meilleur rendement (Soxhlet). L'huile peut être aussi extraite chimiquement à l'aide des solvants. Les huiles obtenues à chaud ou au moyen de produits chimiques doivent subir par la suite un raffinage par une série de divers traitements plus ou moins nocifs pour certains composés de l'huile et pouvant ainsi diminuer sa qualité.

La qualité de l'huile dépend de plusieurs facteurs, tout d'abord de la qualité des graines qui dépendent elles-mêmes des conditions de culture (qualité du sol, altitude, climat, technique de culture, parasitisme) et de récolte (maturité des graines, mode de récolte, sélection des graines, conditions de stockage). Les conditions d'extraction, de même que les moyens de conditionnement et de conservation (verre teinté à l'abri de l'air et de la lumière au frais de préférence) sont très importantes (Abdesselam, 2015).

I.2.1 Composition de l'huile de la graine de *Nigella sativa* L.

Les différentes études sur la composition de l'huile de *Nigella sativa* L. ont permis de mettre en avant sa grande richesse et de sa grande variété de composés. En effet, en regroupant les différentes études sur le sujet, on dénombre plus de 200 composés différents.

Quantitativement, la majorité des composés découverts se trouvent en faibles proportions dans l'huile essentielle (Abdesselam, 2015).

I.2.1.1 Composés lipidiques

Le tableau 1 représente les teneurs en lipides, glucides et protéines totaux de l'huile de *Nigella sativa* L.

Tableau 1: Composés lipidiques de l'huile de *Nigella sativa* L.

Composés		Teneur %	Référence
Lipides totaux	Lipides simples	97 %	(Ramadan, 2007 ; Singh et <i>al.</i> ,2014)
	Lipides complexes	3 %	
Glucides		23.5 - 33.2%	(Atta, 2003)
Protéines totaux		20 à 27%	(Atta, 2003)

I.2.1.2 Composés phénoliques et quinoniques

Selon Orsi-Llinares (2005) l'huile de *Nigella sativa* L. est constituée de dérivés phénoliques et de certains composés actifs (tableau2).

Tableau 2: Composés phénoliques et quinoniques de l'huile de *Nigella sativa* L.

Composés	Teneur	Référence
Dérivés phénoliques	1744 ± 10.6 µg/g	(Orsi-Llinares, 2005)
Thymoquinone	$5,26 \times 10^{-2} \pm 2,59 \times 10^{-3} \%$	
Thymohydroquinone	$7,67 \times 10^{-4} \pm 5,49 \times 10^{-5} \%$	
Dithymoquinone	Non quantifiable. En dessous des limites quantifiables : $2,12 \times 10^{-4} \%$ d'huile.	
Thymol	$9,12 \times 10^{-3} \pm 1,38 \times 10^{-3} \%$	

I.2.1.3 Composés vitaminiques

Concernant les différentes vitamines rencontrées dans l'huile de *Nigella sativa* L, nous pouvons citer les teneurs de ces vitamines dans le tableau 3:

Tableau 3: Vitamines de l'huile de *Nigella sativa* L.

Composés	Teneur	Référence
Viamine (B1)	1,500 mg/100g d'huile	(Orsi-Llinares, 2005)
Riboflavine (B2)	0,100 mg/100g d'huile	
Pyridoxine (B6)	0,500 mg/100g d'huile	
Niacine (B3)	5,700 mg/100g d'huile	
Acide folique (B9)	0,061 mg/100gd'huile	
Rétinol (Vitamine A)	/	(Al-Jassir, 1992; Ramadan et Mörsel, 2003; Al-Saleh et El-Doush, 2006; El-Shami et El-Mallah, 2011).
Acide ascorbique (vitamine C)	/	
Dérivés du tocophérol (vitamine E)	597 µg /g d'huile	(Ramadan et Mörsel, 2002)
Vitamine K1	1162 µg /g d'huile	
β-carotène	593 µg /g d'huile	

I.2.1.4 Eléments minéraux

Parmi les éléments minéraux retrouvés dans l'huile de *Nigella sativa* L. nous pouvons citer ceux décrits par l'équipe Cheikh-Rouhou (2006) et Al-Jasass avec son collaborateur Al-Jasser en 2012 (tableau 4).

Tableau 4: Composés des éléments minéraux de l'huile de *Nigella sativa* L.

Eléments minéraux	Teneur	Référence
Potassium	783 et 708 mg/kg	(Cheikh-Rouhou, et al., 2006).
Magnésium	235 et 260 mg/kg	
Phosphate	48,9 et 51,9 mg/kg	
Sodium	20,8 et 18,5 mg/kg	
Fer	8,65 et 9,42 mg/kg	
Zinc	8,04 et 7,03 mg/kg	
Manganèse	4,43 et 3,37 mg/kg	
Cuivre	1,65 et 1,48 mg/kg	
Calcium	160 mg/100g	(Al-Jasass et Al-Jasser, 2012).

I.2.1.5 Huile essentielle (huile volatile)

On évalue entre 0,4 et 2,4 % la proportion d'huile essentielle contenue dans la graine de *Nigella sativa* L. c'est dans celle-ci que l'on trouvera le plus grand nombre de composés (plus de 100 découverts à ce jour) (Toama et al.,1974; Ramadan, 2014).

I.2.2 Toxicité de l'huile

La plupart des études montrent clairement que *Nigella sativa* L. possède un index thérapeutique élevé et une excellente innocuité à des doses inférieures à 4 g/kg/Jour de *Nigella sativa*L. (Meziti, 2009).

Une étude publiée en 2012 a confirmé l'effet toxique de l'huile végétale de *Nigella sativa* L. (Zaghlol et al., 2012). C'est le cas original d'une éruption bulleuse liée au contact avec l'huile de nigelle, avec participation probable d'une réaction systémique liée à son absorption (Nosbaum et al., 2011). Cependant, Gelot et ses équipiers ont constaté que l'huile de *Nigella sativa* L. peut aussi être à l'origine d'une réaction inflammatoire et allergique (Gelot et al., 2012).

Devant la découverte de nombreuses propriétés de l'huile de *Nigelle sativa* L. et la multiplication de ses domaines d'utilisation, notamment la cancérologie, une vigilance particulière devra être instaurée quant à l'apparition de toxidermies sévères (Vigan, 2010 in Gelot et al.,2012).

L'huile totale et ses deux grandes fractions polaire et neutre ont fait l'objet d'une évaluation de leur toxicité *in vivo*. Les résultats indiquent une absence de traces majeures de toxicité hépatique et ce dans les conditions expérimentales appliquées, c'est-à-dire, quantité des extraits administrés et durée du test (Sobhi et al., 2011).

I.2.3 Effets pharmacologiques**I.2.3.1 Effet anticonvulsif**

L'huile de *Nigella sativa* L. possède cet effet anticonvulsif. Ilhan et ses collaborateurs ont montré en 2005, que cette huile a une action neuro-protectrice (Ilhan et al., 2005).

I.2.3.2 Effet anti-inflammatoire

L'effet anti-inflammatoire de *Nigella sativa* L. a fait l'objet de plusieurs études. À titre d'exemple : le traitement avec l'huile augmente de façon significative l'activité phagocytaire, l'indice phagocytaire des macrophages péritonéaux et le nombre des lymphocytes dans le sang périphérique (Fararh et al., 2004).

Dans une autre étude, l'huile de *Nigella sativa* L. nigellone (polythymoquinone) et la TQ ont été étudiées pour évaluer leur effet sur la formation de la 5-lipoxygénase (5-LO) produite par les polynucléaires neutrophiles. Les résultats ont montré que ces substances inhibent significativement la production de cette enzyme, ce qui signifie que l'huile de *Nigella sativa* L. la nigellone et la TQ réduisent les manifestations inflammatoires (El-Dakhakhny et al., 2002).

I.2.3.3 Effet antipyrétique et analgésique

L'extrait aqueux de *Nigella sativa* L. a été étudié pour ses activités anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique dans des modèles animaux. L'extrait exerce une action inhibitrice sur l'œdème induit par carraghénane sur la patte de souris. L'extrait a également produit une augmentation significative du temps de réaction à la plaque chauffante chez la souris, indiquant un effet analgésique (Al-Ghamdi, 2001).

I.2.3.4 Effet antirhumatismale

Une étude chez 40 patientes diagnostiquées montre, qu'après l'utilisation de l'huile végétale de *Nigella sativa* L. durant un mois, le DAS-28 (Disease Activity Score) est significativement diminué. Aussi, leur qualité de vie est améliorée du fait de la diminution des gonflements articulaires et des raideurs matinales (Gheita, 2012).

Malgré le peu d'études sur le sujet, les résultats apportés laissent entendre qu'une utilisation de *Nigella sativa* L. comme adjuvants thérapeutiques pourrait être abordée dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde chez l'homme (Abdesselam, 2015).

I.2.3.5 Effets antiallergiques

I.2.3.5.1 Asthme allergique

Sur un modèle d'asthme allergique de souris, les effets de *Nigella sativa* L. et du dexaméthasone (groupe contrôle) ont été étudiés. La plante utilisée 24 heures après une injection intratrachéale de conalbumine (connue aussi sous le nom d'ovotransferrine, il s'agit d'une glycoprotéine du blanc d'œuf qui est utilisée comme allergène) réduit les taux d'IgG1, d'IgG2, des cytokines et l'inflammation pulmonaire. Ces effets furent équivalents à ceux du dexaméthasone, exception faite pour le taux d'IFN- γ (Abbas et al., 2005).

I.2.3.5.2 Rhinite allergique

La rhinite allergique est la maladie allergique chronique la plus commune, spécialement chez les enfants. Dans une étude, ce sont 66 patients qui furent l'objet d'une évaluation clinique sur les effets de l'huile de *Nigella sativa* L. dans le traitement de la rhinite allergique. Au moyen d'un questionnaire, un observateur a pu renseigner la sévérité des symptômes du jour 0 au jour 30 de l'étude. Les résultats au jour 15 de celle-ci montre que *Nigella sativa* L. réduit la congestion, les démangeaisons et l'écoulement nasal de même que les éternuements, l'hypertrophie des cornets nasaux et la pâleur des muqueuses au cours des deux premières semaines de traitement. Sur seulement 6,1 % de la population étudiée, des PNE ont été retrouvés dans le mucus nasal (Nikakhlagh, 2011).

I.2.3.6 Effet Antidiabétique

Les effets antidiabétiques de *Nigella sativa* L. ont été étudiés ces dernières années et des résultats satisfaisants ont été obtenus (Akash et al., 2011). Dans une étude plus récente, il a été rapporté que l'administration de l'extrait lipidique total de *Nigella sativa* L. réduit le taux du glucose chez les rats rendus diabétiques par la streptozotocine /nicotinamide et suggère que l'effet hypoglycémiant de la fraction lipidique polaire est le résultat de l'inhibition des premières étapes du métabolisme des glucides à cause de leur effet inhibiteur sur l'activité de l'alpha-glucosidase (Sobhi et al., 2011).

Les différentes études convergent que le mécanisme de l'effet hypoglycémiant de *Nigella sativa* L. est multi factorielle incluant ; (i) l'amélioration du statut du stress oxydatif, (ii) l'élévation de l'insuline, (iii) l'atténuation de la résistance à l'insuline et (iv) la néoglucogenèse hépatique (Bamosa, 2015).

I.3 Molécules majeurs de la plante

C'est en 1963 que la thymoquinone, monoterpène oxygéné, a été isolée dans l'huile de *Nigella sativa* L. par El-Dakhakhny, et d'autres études ont mis en évidence les principaux constituants (Canonica, 1963). Burits et Bucar en 2000, ont identifié par GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectroscopy), 32 constituants dont la majorité sont des monoterpènes : p-cymène (38%), thymoquinone (30%), carvacrol (5-11%), α -pinène (5-14%), β -pinène (5%), limonène (4%), longifolène (1,2-8%), 4-terpinéol (1,98-6,59%) et t-anéthol (0,25-4,28%) (Burits, 2000). La présence de thymohydroquinone, de thymol, de produits d'oxydation de la thymoquinone, comme la dithymoquinone sont également signalés.

I.4 Thymoquinone et thymol

I.4.1 Thymoquinone

I.4.1.1 Structure et propriétés

La thymoquinone (TQ) est un monoterpène isolé pour la première fois par chromatographie sur couches minces, à partir des huiles essentielles des graines de *Nigella sativa* L. en 1963 par EL-Dakhakhny.

Des recherches ultérieures ont signalé la présence de la TQ dans d'autres espèces de plantes telles que: *Eupatorium ayapana* (Trang et al., 1993), *Calocedrus decurrens* (Manter et al., 2007), *Origanum syriacum* (Lukas et al., 2009), *Nepeta distans* Raul (Hussain et al., 2010), *Thymus vulgaris*. L (Grosso et al., 2010) et *Satureja spicigera* (Gohari et al., 2012).

La TQ (2-Isopropyl-5-méthylbenzo-1,4-quinone) est une molécule hydrophobe. Elle contient un noyau quinone lié à des chaînes latérales isopropyl et méthyle en position 2 et 5, respectivement (figure 01). Elle se caractérise par la formule moléculaire $C_{10}H_{12}O_2$ et la masse molaire de 164,201 g/mol. La TQ existe en solution sous deux formes tautomériques différentes ; énol et céto. Cette dernière (~90%) est responsable des propriétés pharmacologiques de ce composé (Alkharfy et al., 2011).

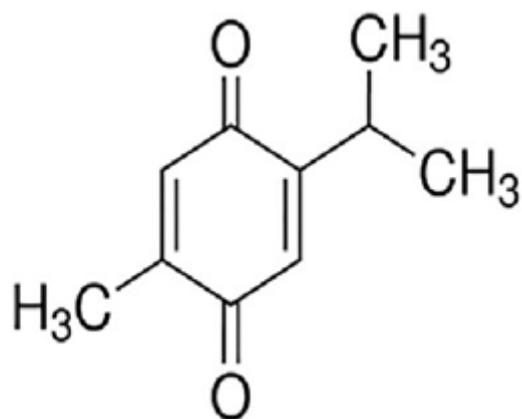


Figure 1 : Structure chimique de la thymoquinone (Darakhshan et *al.*, 2015).

I.4.1.1 Toxicité

La toxicité de la TQ a été l'objet de recherche de plusieurs études, dans différents modèles des animaux. El-Dakhkhany (1965) a rapporté une DL₅₀ de 10 mg/kg suivant une administration intrapéritonéale, chez le rat. Une autre étude a rapporté que chez la souris, la DL₅₀ était de 90.3 mg/kg (Mansour et *al.*, 2001). Par ailleurs, Al-Ali et ses collaborateurs (2008) ont montré que chez le rat, Les DL₅₀ obtenues suivant une administration orale et intrapéritonéale de la TQ étaient de 794.3 mg/kg et 57.5 mg/kg, respectivement.

Cependant, chez la souris, les DL₅₀ obtenues étaient respectivement de 870.9 mg/kg et 104.7 mg/kg. Généralement, La dose maximale tolérée pour l'injection intrapéritonéale est de 22.5 mg /kg chez les rats mâles et de 15 mg/kg chez les femelles. Alors que dans l'étude de Abukhader (2012), la dose maximale tolérée était de 250 mg/kg pour l'administration orale chez les rats mâles et femelles. Une seule étude clinique a été effectuée pour tester l'efficacité anticancéreuse de la TQ. Elle était réalisée chez 21 patients en situation de récurrence ou après échec de thérapies standards et elle a duré 20 semaines (Al-Amri et Bambosa, 2009). Aucune toxicité ni réponse thérapeutique n'ont été rapportées et la TQ a été bien tolérée à des doses de 75-2600 mg/jour (Al-Amri et Bambosa, 2009).

I.4.1.2 Effets pharmacologiques de la thymoquinone

Depuis l'isolement de la TQ en 1963, une grande attention lui a été accordée, plusieurs études ont été réalisées afin de démontrer ses propriétés pharmacologiques (Elbarbry et *al.*, 2012 ; Darakhshan et *al.*, 2015), dont les plus intéressantes sont les suivantes :

I.4.1.2.1 Effet anticonvulsif

Dans une étude menée par Hosseinzadeh et Parvardeh (2004), les résultats ont montré que la TQ possède un effet anticonvulsif. Son effet pourrait être dû à son action sur les récepteurs GABA énergiques.

I.4.1.2.2 Effet anti inflammatoire

L'inflammation est une réponse biologique complexe à des stimuli nocifs principalement médiée par deux enzymes : la cyclooxygénase et la lipoxygénase qui génèrent respectivement des prostaglandines et des leucotriènes (Nagi et Mansour, 2000).

Les effets anti-inflammatoires et immunostimulant de *Nigella sativa* L. et de ses constituants notamment la TQ ont été aussi répertoriés dans une revue réalisée par Salem (2005). Par ailleurs, l'administration de la TQ a réduit significativement les symptômes oculaires dans la conjonctivite allergique en atténuant le recrutement des éosinophiles et en réduisant les taux d'IgE, de l'histamine et des cytokines (Hayat et *al.*, 2011 in khither, 2019).

I.4.1.2.3 Effet antioxydant

Des études *in vitro* ont été effectuées afin d'évaluer l'effet antioxydant de la TQ. Les résultats obtenus ont démontré que la thymoquinone est un antioxydant phytochimique puissant, cet effet est dû à l'activité de piégeage contre plusieurs espèces réactives de l'oxygène (ERO) incluant l'anion superoxyde, le radical hydroxyle et l'oxygène singulet (Nagi et Mansour, 2000; Mansour et *al.*, 2002).

Le potentiel antioxydant de la TQ peut être lié aux propriétés redox de la structure quinone de la molécule et de la capacité illimitée de franchir les barrières physiologiques et d'accéder facilement aux compartiments subcellulaires, ce qui favorise les effets de piégeage radicalaire (Daba et *al.*, 1998 ; Badary et *al.*, 2003).

La TQ est capable de protéger différents organes contre les lésions oxydatives induites par une variété de substances et médicamenteuses générateurs de radicaux libres (Nagi et Almakki, 2009 ; Ismail et *al.*, 2010 ; Darakhshan et *al.*, 2015 ; Taha et *al.*, 2016., in Khither, 2019).

De plus, l'effet anti inflammatoire de la TQ a été démontré dans le modèle de l'arthrite rhumatoïde, *in vivo* et *in vitro*, Vaillancourt et ses collaborateurs (2011) et Umar et ses collaborateurs (2012 et 2015) ont rapporté que la TQ réduit le taux sérique de l'IL-1 β , de l'IL-6, du TNF- α , de l'IFN- γ et de la prostaglandine E2 (PGE2) et qu'elle diminue également, significativement l'infiltration des polynucléaires neutrophiles dans l'articulation, chez les rats arthritiques.

I.4.1.2.4 Effet anticancéreux

Actuellement, la TQ fait l'objet de recherche de plusieurs études menées sur le potentiel thérapeutique anticancéreux. Plusieurs chercheurs ont démontré que la TQ exerce une activité anticancéreuse considérable et qu'elle inhibe la prolifération et induit l'apoptose des lignées cellulaires humaines des cancers du côlon, du sein, du cerveau, du pancréas, du poumon, du foie, de la prostate, des ovaires et d'autres (Gali et al., 2004a ; Chehl et al., 2009 ; Jafri et al., 2010; Woo et al., 2011 ; Odeh et al., 2012 ; Attoub et al., 2013 ; Taha et al., 2016).

LA TQ est un composé présentant une activité chimio préventive et réduit les effets toxiques des agents antinéoplasiques standards. Elle est également un chimiosensibilisant lorsqu'elle est utilisée en combinaison avec des agents chimiothérapeutiques (Darakhshan et al., 2015).

I.4.1.2.5 Effet antimicrobien

L'effet antibactérien de la TQ a été rapporté contre certaines souches bactériennes, notamment *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Peudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis* (Khan et al., 2003).

La TQ présente une activité bactéricide significative, en particulier *vis-à-vis* des cocci à Gram+ et empêche l'adhérence cellulaire à la surface des glaçons et la formation de biofilm des bactéries pathogènes pour l'homme (Kokoska et al., 2008 ; Chaieb et al., 2011). Elle possède une activité antibactérienne sélective contre les bactéries buccales. Les souches buccales *Streptococcus aureus*, *Streptococcus mutans* et *Streptococcus salivarius* sont sensibles à la TQ avec des CMI allant de 8 à 64 $\mu\text{g/ml}$ (Darakhshan et al., 2015).

Aussi, il a été rapporté que la TQ a des effets synergiques en combinaison avec des agents anti-bactériens. La TQ a réduit d'au moins 4 fois la valeur des CMI de tétracycline. Dans le cas du chlorure de benzalkonium, une diminution de 8 fois des valeurs de CMI a été observée en particulier pour *Streptococcus aureus* et *Vibrioparaheamolyticus* (Kouidhi et al., 2011). La TQ possède une activité antituberculeuse contre des isolats cliniques de *Mycobacterium tuberculosis* (Randhawa, 2011).

Elle présente également une activité antifongique contre *Candida albicans*, *Candida tropicalis* et *Candida krusei* (Piras et al., 2013) et contre les souches pathogènes de dermatophytes, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* et *Microsporum gypseum* (Mahmoudvand et al., 2014 in Khither, 2019).

I.4.1.2.6 Effet antidiabétique

La TQ est un agent antidiabétique, El-Mahmoudy et ses collaborateurs (2005) ont montré que la TQ supprime les réponses hyperglycémiques et hypo-insulinémiques dans un modèle de diabète induit par la streptozotocine, chez le rat. De plus, la TQ atténue la plupart des effets toxiques de la streptozotocine et préserve l'intégrité des cellules bêta en diminuant le stress oxydatif (Abdelmeguid et al., 2010).

La TQ supprime l'hyperglycémie et induit l'hyper-insulinémie par l'inhibition de la gluconéogenèse en inhibant l'activité des enzymes gluconéogéniques: la glucose-6-phosphatase et la fructose 1-6 diphosphatase (Fararh et al., 2005 ; Pari et Sankaranarayanan, 2009). La TQ améliore également les complications associées au diabète (Woo et al., 2011) que ce soit de la neuropathie (Kanter, 2008) ou de la néphropathie (Kanter, 2009 ; Omran, 2014).

I.4.1.2.7 Effet antirhumatismale

Sur des modèles animaux d'arthrites (rats et lapins), la thymoquinone agit sur des voies de signalisation impliquées dans les changements physiopathologiques de l'arthrite rhumatoïde. Elle sous-régule les expressions de MMP-1, MMP-3 et MMP-13 et sur-régule l'expression des inhibiteurs tissulaires des MMP-1. Les MMPs sont des protéases qui modifient la matrice extracellulaire. Dans le cas de l'arthrite, elles dégradent le collagène de type II dans le cartilage, étape clé dans la progression de la maladie. La TQ diminue significativement le clinical arthrosis score et la résorption osseuse. Elle réduit les niveaux des médiateurs du remodelage osseux (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ et PGE2) et du remodelage osseux (PAL : phosphatase alcaline). Elle augmente les niveaux d'IL-10. (Vaillancourt, 2011 ; Umar, 2012). Dans une autre étude, c'est par l'inhibition de l'activation du NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), par l'IL-1 que la TQ agit. (Chen, 2010).

I.4.1.2.8 Effet antiallergique

- **Conjonctivite allergique**

Les effets de la TQ ont été évalués sur des modèles de conjonctivites chez des souris exposées à l'ovalbumine. Chez ces souris exposées, une augmentation des différents marqueurs de l'allergie (IgE, IgE spécifique de l'ovalbumine, recrutement des PNE (polynucléaire neutrophile), taux d'histamine, niveau d'expression d'ARNm et de cytokines) a été mise en évidence par comparaison à celles du groupe témoin. L'administration de TQ réduit les symptômes oculaires, l'infiltration de cellules inflammatoire dans la conjonctive, le sang et le liquide de lavage ophtalmique. De même, le recrutement des éosinophiles, le niveau des IgE, de l'histamine et des cytokines (IL-4, IL-5, IL-13) furent atténués. (Hayat, 2011).

- **Diarrhée allergique**

Dans une étude, des extraits de *Nigella sativa* L. la TQ et des agonistes κ et μ aux récepteurs aux opioïdes ont été testés sur des souris sensibilisées par l'injection intra gastrique d'ovalbumine afin de voir s'ils possédaient un effet soulageant dans ce modèle d'allergie alimentaire.

Il a été montré que *Nigella sativa* L. et la TQ diminuent les symptômes cliniques des diarrhées induites. Cette réduction des symptômes est accompagnée par la diminution de la numération mastocytaire ainsi que du MMCP-1 plasmatique, un marqueur de la dégranulation des mastocytes. Les auteurs émettent l'hypothèse que la TQ pourrait être le composé à l'origine de l'effet bénéfique des extraits de *Nigella sativa* L. dans ce type d'allergie du fait de l'absence de résultat d'un extrait de la plante sans TQ. La voie de signalisation des récepteurs aux opioïdes pourrait être aussi impliquée mais des recherches complémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes sous-jacents. (Duncker, 2012 ; Abdesselam, 2015).

I.4.2 Thymol

I.4.2.1 Structure et propriétés

Le thymol, le 2-isopropyl-5-méthylphénol, est un dérivé phénolique et monoterpénique naturel du cymène, et de l'isomère de carvacrol, (Alagawany et *al.*, 2021), il se caractérise donc par un groupement méthyl et un groupement isopropyl situé en *para* l'un de l'autre. Le groupement isopropyl est en *ortho* de la fonction –OH (David, 2019).

Le TM présent dans certaines plantes médicinales avec un taux de 10 %, et dans les huiles essentielles (HE) avec un taux de 64 %. Ce composant est l'un des constituants majeurs des huiles essentielles de thym (*Thymus vulgaris* L.) et de *Nigella sativa* L. (Sultana, 2016; Salehi et *al.*, 2018). La formule brute de TM est (C₁₀H₁₄O) (Alagawany et *al.*, 2021) (figure 2).

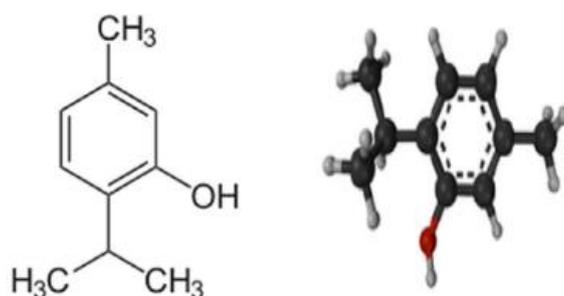


Figure 2 : Structure de base du thymol (Alagawany et *al.*, 2021)

I.4.2.2 Toxicité du thymol

Les effets thérapeutiques du TM semblent intéressants, notamment en ce qui concerne l'effet anti-infectieux, mais il ne faut pas négliger les effets secondaires qu'il peut entraîner.

I.4.2.2.1 Sur les muqueuses et la peau

Localement le TM est très irritant, astringent et caustique. Une dermocausticité a également été observée pour des huiles essentielles contenant des monoterpènes à fonction phénols tel que le TM, le carvacrol ou l'eugénol. Celle-ci peut apparaître dès la première utilisation mais son intensité dépend de la concentration de l'huile essentielle utilisée (Askin et *al.*, 2017). Les dentifrices au TM peuvent entraîner une inflammation des lèvres et de la langue chez les patients sensibles au thymol (Lorenzi, 1995).

I.4.2.2.2 Par voie orale

L'ingestion de 2 grammes du TM provoque déjà un peu de gastralgie avec nausées et à plus haute dose, il entraîne une diarrhée. L'intolérance au TM se manifeste par des bourdonnements d'oreille, de l'hypothermie, des urines noires ou sanguinolentes et albumineuses. Il est environ 10 fois moins toxique que le phénol ordinaire. Chez le rongeur, la toxicité aiguë du TM par voie orale varie de 0,9 g/kg à 1,8 g/kg. Les effets retrouvés sont de types troubles gastro-intestinaux, tremblements, somnolence (François *et al.*, 1996).

I.4.2.2.3 Par voie respiratoire

Un cas d'intoxication a été recensé chez un nourrisson de trois semaines qui a développé une infection bénigne des voies respiratoires supérieures à la suite de l'utilisation de capsules de Karvol® pour inhalation, ce médicament, précédemment commercialisé au Royaume-Uni, était composé de chlorobutanol (0,5 %), lévomenthol (7,9 %), huile essentielle de pin sylvestre (2 %), terpinéol (14,8 %), TM (0,7 %), huile végétale de pin (22,9 %). Il est utilisé pour soulager les symptômes du rhume (rhinite, congestion nasale). Il est recommandé de ne pas l'utiliser chez les enfants de moins de trois mois (Blake, 1993).

I.4.2.3 Effets pharmacologiques de thymol**I.4.2.3.1 Effet anti-infectieux**

En 1910, Martindale publie le classement des huiles essentielles en fonction de leur pouvoir antiseptique, par rapport à la fonction phénol, plaçant en tête l'origan, puis le thym, la cannelle et le romarin. Ce furent ensuite les propriétés bactéricides qui ont été expérimentées. En 1922, Coumont, Rochaix et Morel confirment que les huiles essentielles à TM et à eugénol ont un pouvoir bactéricide supérieur à celui du phénol (Faucon, 2015).

Le caractère majoritairement hydrophobe et légèrement hydrophile du TM lui permet d'interagir efficacement avec les structures hydrophobes microbiennes, et ainsi d'inhiber ou de détruire ces mêmes microbes. La structure du TM lui permet également de pénétrer dans des environnements plus hydrophiles tels que les biofilms bactériens ou fongiques.

La structure moléculaire a une importance dans le rôle anti-infectieux de la molécule: la présence d'oxygène, le caractère lipophile du squelette hydrocarboné et la propriété hydrophile des groupes fonctionnels permettent de classer les familles biochimiques en fonction de leur pouvoir anti-infectieux.

Phénol > Alcool > Aldéhydes > Cétones > Oxydes > Hydrocarbures > Esters.

Les composés avec la plus grande efficacité antibactérienne et le plus large spectre sont les phénols. Ils entraînent notamment des lésions irréversibles sur les membranes et sont utiles dans les infections bactériennes, virales et parasitaires, quelle que soit leur localisation.

I.4.2.3.2 Effet antioxydant

Le stress oxydant provoque de nombreux dégâts dans les tissus, les organes, et peut même altérer l'ADN. Il est impliqué dans de nombreuses maladies comme la cataracte, l'arthrite, les maladies cardio-vasculaires ou les cancers. Au niveau cutané, les radicaux libres sont considérés comme une des causes du vieillissement tissulaire, en particulier en ce qui concerne l'apparition des rides de la peau. Ils sont formés par une exposition aux rayons UV, ou par les bactéries symbiotiques qui vivent naturellement à la surface de l'épiderme. L'introduction d'anti-radicaux libres (ou antioxydants) dans de nombreuses crèmes a pour objectif de combattre les effets délétères des radicaux libres.

L'organisme peut lutter contre les radicaux libres grâce à des systèmes de défense, constitués par des antioxydants issus de l'alimentation (caroténoïdes, vitamines C et E) ou grâce à des enzymes capables de les neutraliser (la glutathione peroxydase). Certaines huiles essentielles sont également d'excellents antioxydants. Elles agissent à deux niveaux :

- **Effet antioxydant directe**

Cette action se manifeste par une neutralisation directe des radicaux libres déjà formés (eugénol, menthol, carvacrol, TM, 1,8 cinéole, salicylate de méthyle, γ -terpinène).

- **Effet antioxydant indirecte**

Cette action nécessite l'activation des mécanismes cellulaires de neutralisation des radicaux libres (cinnamaldéhyde, citral, safranal). Deux études rapportent les propriétés antioxydantes du TM. Le TM et le carvacrol ont diminué la peroxydation des liposomes phospholipidiques en présence de fer et d'ascorbate. Un test à l'oxydation a montré qu'ils n'ont pas accéléré les dommages de l'ADN. Cela suggère que le TM et le carvacrol possèdent des propriétés antioxydantes utiles et pourraient devenir importants dans la recherche de substituts (naturel) aux additifs alimentaires « synthétiques » antioxydants (Aeschbach et *al.*, 1994).

Une autre étude menée sur l'auto-oxydation de triacylglycérols purifiés de lard (TGL) et d'huile de tournesol (TGSO) contenant 0,02, 0,05, 0,10 et 0,20 % de TM et de carvacrol à température ambiante. Les résultats obtenus ont montré que le TM présentait l'efficacité et l'activité antioxydantes la plus élevée au cours de l'oxydation du TGSO (Yanishlieva, 1999).

En général, le TM est un antioxydant plus efficace et plus actif que le carvacrol. Les deux antioxydants diffèrent par leur mécanisme d'action qui dépend du caractère du milieu lipidique. Le TM est un meilleur antioxydant dans le TGSO que dans le TGL, alors que l'activité du carvacrol dans les deux systèmes lipidiques ne diminue pas significativement. Cependant, on ne peut pas réduire l'action antioxydante d'une huile essentielle à l'un de ses composés, même s'il est majoritaire. Il existe là encore, une activité synergique des différents composés contenus dans une HE (Amorati et al., 2013).

Tomaino et son équipe, dans leur étude de 2005 ont comparé le potentiel antioxydant de plusieurs huiles essentielles en étudiant leur capacité à protéger l' α -tocophérol contenu dans l'huile d'olive vierge contre la dégradation par oxydation thermique. Ils ont établi le classement suivant : clou de girofle > thym à thymol > cannelle > basilic > origan compact > noix de muscade (Tomaino et al., 2005). L'utilisation des huiles essentielles à phénol et donc du TM est ainsi particulièrement indiquée lorsque l'on cherche à neutraliser un excès de radicaux libres, et à limiter leurs effets délétères.

I.4.2.3.3 Effet antispasmodique

Les effets du TM sur l'activité contractile spontanée ont été mis en évidence lors d'expériences *in vitro* avec les muscles lisses de l'estomac et de la veine des cobayes (Beer et al., 2007). Le thymol s'est avéré avoir un effet agoniste sur les récepteurs α_1 , α_2 et β -adrénergique. Ils ont enregistré un effet spasmodique à des doses supérieures à 10^{-6} M.

Le TM à une dose de 10^{-4} M inhibe à 100 % l'activité contractile des muscles lisses. On suppose que le TM exerce un effet analgésique par son action sur les récepteurs adrénergiques α_2 des cellules nerveuses.

L'activité spasmodique du thym est le plus souvent attribuée au TM et au carvacrol de l'huile essentielle (Bruneton, 2016). En fait, les phénols s'opposent aux contractions provoquées sur l'iléon et la trachée du Cobaye par l'histamine, l'acétylcholine ou autres. Cependant des préparations pratiquement dépourvues de thymol conservent une grande partie de l'activité antispasmodique *in vitro*.

I.4.2.3.4 Effet anti-inflammatoire

Une action anti-inflammatoire due au TM a aussi été retrouvée. L'huile essentielle de *Lippia gracilis* a une activité antimicrobienne et est utilisée en externe pour traiter les maladies cutanées, les brûlures, les plaies et les ulcères. Il a été démontré que l'huile essentielle de feuilles de *Lippia gracilis* possède des actions antinociceptives et anti-inflammatoires et que son composant majeur identifié était le TM.

Une étude a menée pour évaluer les activités anti-inflammatoires et cicatrisantes du TM chez les rongeurs (Riella et *al.*, 2012). Elle a révélé que le TM améliorait considérablement les réponses inflammatoires et possédait un potentiel de cicatrisation des plaies chez plusieurs modèles de rongeurs. Le traitement des rats au TM a entraîné une réduction significative de l'œdème des pattes. Ces données suggèrent que le TM peut inhiber l'augmentation de la perméabilité microvasculaire (œdème) et l'afflux de leucocytes.

Afin d'évaluer le potentiel de cicatrisation des plaies, le TM (10 %) a été introduit dans des films de pansement à base de collagène et un test de cicatrisation biologique des plaies a été réalisé.

I.4.2.3.5 Effet anti-cholinestérase

Les effets inhibiteurs du TM et du carvacrol ont été étudiés sur l'enzyme acétylcholinestérase (AChE) de *Drosophila melanogaster* (Askin et *al.*, 2017).

Les valeurs mesurées de CI50 du thymol et du carvacrol sont respectivement de 25 mM et 0,175 mM. En utilisant les graphiques de Lineweaver-Burk, il est constaté que les deux composés présentent un type d'inhibition non compétitif. Selon les résultats, on peut conclure que le carvacrol est un inhibiteur plus efficace que TM. Ces résultats contribueront sûrement à la mise au point d'inhibiteurs plus puissants, spécifiques et efficaces de l'enzyme AChE, à la conception de nouveaux médicaments pour traiter la maladie d'Alzheimer et à des études sur des applications pharmacologiques.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

II. Matériel et méthodes

Le présent travail de recherche a été effectué au sein du laboratoire Analyse des aliments, laboratoire de Biochimie et le laboratoire de Microbiologie du Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBT)- Constantine.

II.1 Matériel végétal

II.1.1 Graines et molécules de *Nigella sativa*L.

Les graines de *Nigella sativa* L. utilisées dans les différentes parties de cette étude sont issues du même lot de graines cultivé dans la station des bio-ressources El outaya CRSTRA (Ain naga Biskra en 2019).

Les molécules thymoquinone et tymol utilisées dans le présent travail appartiennent à la marque Sigma Aldrich

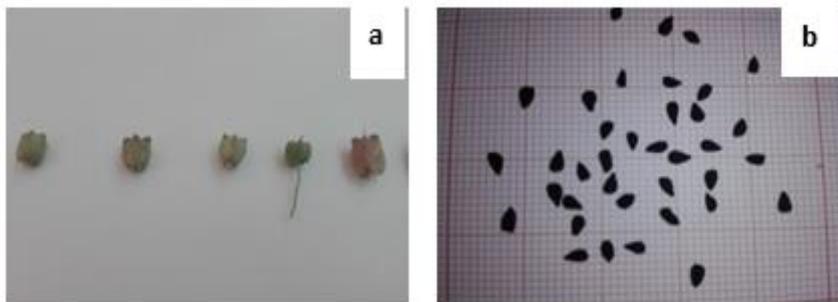


Figure 3: Fleurs (a) et graines (b) de *Nigella sativa* L. appartiennent au Sahara algérienne.

II.2 Extraction de l'huile totale de *Nigella sativa*L.

L'extraction de l'huile totale (HT) des graines de *Nigella sativa* L. est réalisée par soxhlet selon le protocole de Ramadan et Mörsel (2002a) avec quelques modifications. La première étape d'extraction est effectuée par le méthanol durant 4 heures, suivie par une évaporation du solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif jusqu'à élimination totale du méthanol.

L'extrait méthanolique (EM) ainsi obtenu, est soumis à une extraction liquide-liquide, à une température ambiante, par le n-hexane (200 ml) en utilisant une ampoule à décanter. Après évaporation totale du solvant par évaporateur rotatif, l'extrait est séché puis le flacon est fermé hermétiquement et conservé au frais.

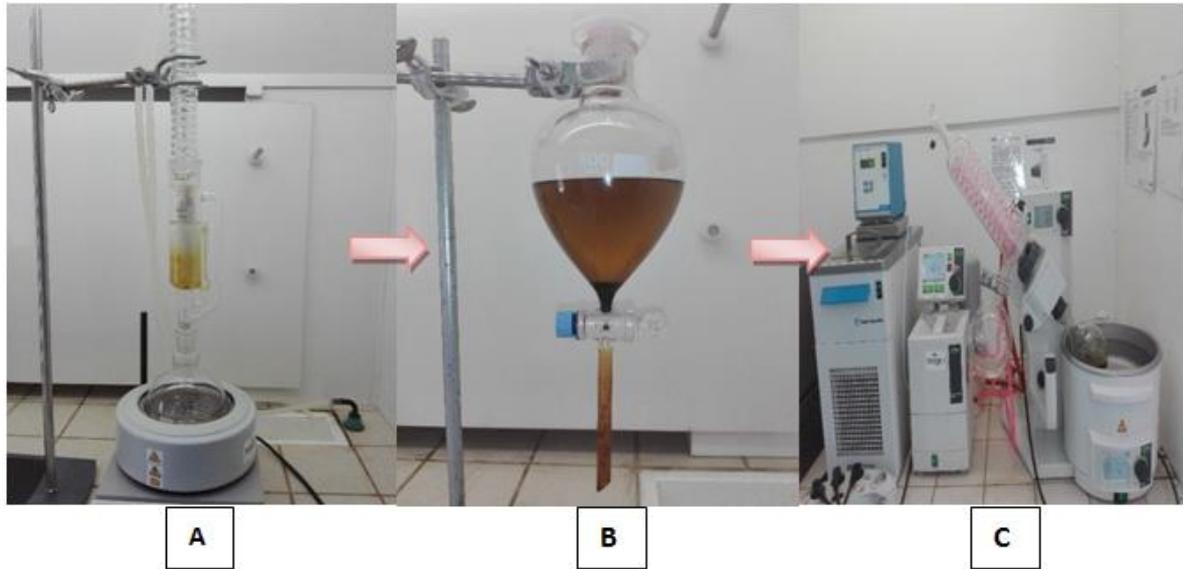


Figure 4: Différentes étapes d'extraction de HT. A : extraction de l'extrait méthanolique avec soxhlet. B: extraction liquide -liquide (extraction méthanolique - hexane pour récupérer la fraction hexanique). C: évaporation de l'hexane pour récupérer l'huile totale

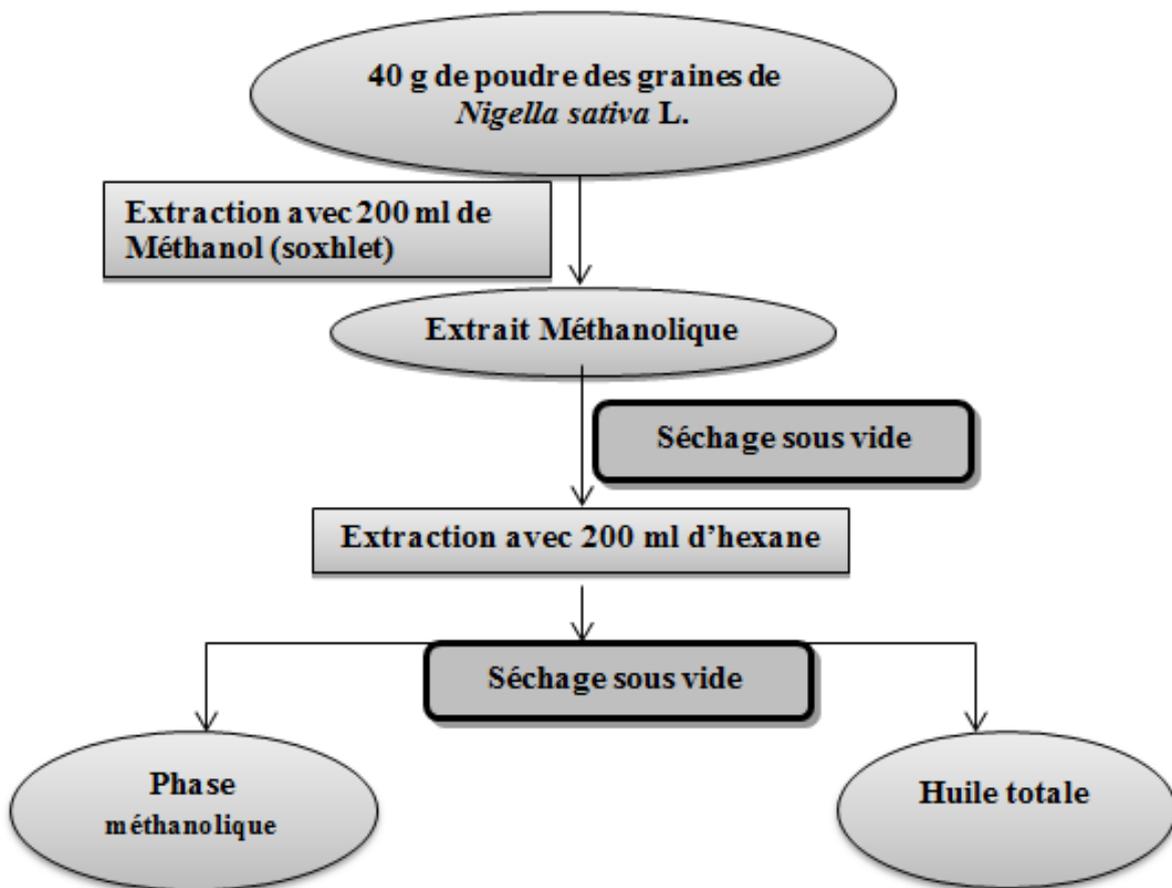


Figure 5: Schéma d'extraction de HT et de EM à partir des graines de *Nigella sativa L.*

Le rendement d'extraction correspond au pourcentage des principes actifs dissouts dans un solvant organique et/ou aqueux utilisé pour l'extraction. Il est déterminé à partir du poids de l'extrait sec par rapport au poids de la matière végétale sèche réduit en poudre. Le rendement est exprimé en pourcentage massique par rapport à la quantité de matière sèche selon la formule :

$$R (\%) = (M_1 / M_0) \times 100 R \%$$

Rendement en extraits exprimée en g /100g de matière sèche.

M_1 : quantité de l'extrait récupérée exprimée en g.

M_0 : quantité de la poudre végétale utilisée pour l'extraction exprimée en g.

II.3 Méthode d'analyses phytochimiques

Cette analyse d'HPLC a été effectuée pour obtenir des informations sur la composition en quinones de l'huile de graines de *Nigella sativa*L. Il s'agit de déterminer qualitativement et quantitativement les deux constituants majoritaires de l'huile de nigelle à savoir : la thymoquinone (TQ), et le thymol (TM). L'appareil Chromatographie liquide à gradient ternaire haute performance (HPLC-DAD) Agilent technologie (1200 séries), est équipé de la colonne C18 en phase inverse (4,6 mm x 250 mm, 5 μ m particle size) Thermo Scientifique, type Sphérisorb ODS 5 μ m, avec détecteur (UV-Visible Diode array) (Council, 2009) (Figure 07).



Figure 6: Chromatographie liquide à gradient ternaire haute performance (HPLC-DAD) Centre de Recherche en Biotechnologie(CRBT)

II.3.1 Conditions chromatographiques

Les différentes conditions chromatographiques utilisées dans notre analyse d'HPLC d'huile de nigelle, sont mentionnées dans le tableau 5.

Tableau 5: Conditions de la chromatographie.

Phase stationnaire	Colonne d'HPLC ODS phase inverse C18 (Thermo Scientifique) apolaire (4,6 x 250 mm, dimension particulaire 5 µm).
Phase mobile	Eau pure, méthanol, acétonitrile (V/V)
Débit de phase mobile	1 ml /min
Volume d'injecté	20 µl
Longueur d'onde UV	280 nm
Température d'injecteur	Injection automatique thermostaté (4C°)
Filtre seringue	0,22µm

II.3.2 Préparation des échantillons

La pesée de 2,0 g d'huile totale de *Nigella sativa* L. a été réalisée dans un tube à essai avec bouchon à vis de 10 ml, puis une agitation pendant 30 secondes. 5ml de la solution d'extraction méthanol / eau 80/20 (v/v) a été ajoutée à l'échantillon puis une agitation pendant 1 min, le mélange est centrifugé à 5000 tr/min pendant 25min après une extraction au bain à ultrasons pendant 15 min à température ambiante. Enfin le surnageant est prélevé et filtrer sur une seringue de 5ml avec un filtre de 0,22µm. Par la suite, la phase méthanolique est préparée avec les mêmes étapes.

II.3.3 Gradient d'élution

L'élution par gradient a été effectuée comme suit :

Tableau 6: Gradient d'élution.

Temps (min)	Débit (ml/min)	A%	B%	C %
0	1.00	96	2	2
40	1.00	50	25	25
45	1.00	40	30	30
60	1.00	0	50	50
70	1.00	0	50	50
72	1.00	96	2	2
82	1.00	96	2	2

A : l'eau pure.

B : méthanol.

C : acétonitrile.

II.4 Activités biologiques

II.4.1 Activité antioxydante

Dans la présente étude nous avons procédé à tester l'activité antioxydante de nos extraits et molécules de *Nigella sativa L.*: HT, EM, TM et TQ *in vitro* en utilisant six méthodes:

- ✓ Activité antiradicalaire pour le radical DPPH•,
- ✓ Activité antiradicalaire pour le radical-cation ABTS+•,
- ✓ Pouvoir réducteur de cuivre CUPRAC,
- ✓ Pouvoir réducteur de fer,
- ✓ Activité de phénanthroline,
- ✓ Activité β-caroteine.

II.4.1.1 Activité du piégeage de DPPH

L'effet scavenger du radical DPPH a été mesuré selon le protocole décrit par Blois (1958), le principe de cette méthode est la réduction du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette en 2,2 diphényl-1-picrylhydrazine de couleur jaune. Le DPPH absorbe à 517 nm, mais lors de la réduction par un antioxydant, son absorption diminue. Brièvement, une solution de 0,4 mM de DPPH préparée dans le méthanol et 160 µl de cette solution ont été ajoutés à 40 µl d'échantillon dilué dans le DMSO à des concentrations différentes. Trente minutes plus tard, l'absorbance a été mesurée à 517 nm. Le BHT a été utilisé comme norme anti-oxydante. L'expression des résultats est effectuée avec la concentration de l'extrait qui inhibe 50% des radicaux libre dans le milieu réactionnel (IC₅₀).

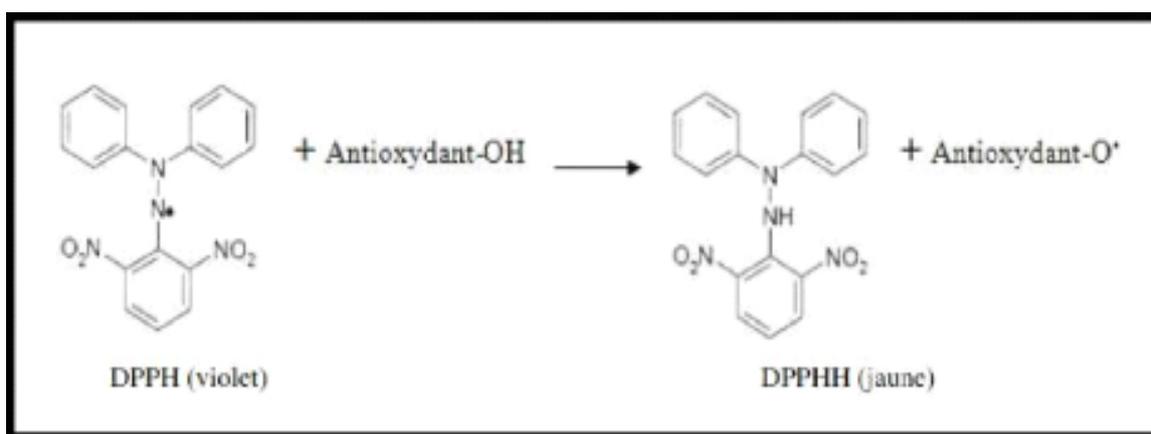


Figure 7: Réaction de test DPPH (2.2 Diphényl 1 picrylhydrazyl).

II.4.1.2 Activité du piégeage de l'ABTS

Ce test est déterminé selon la méthode de (Re et al., 1999). A partir de l'ABTS et du persulfate de potassium $K_2S_2O_8$: les deux produits en solution aqueuse sont mélangés et mis à l'abri de la lumière pendant 12- 16h, l'absorbance de la solution ainsi obtenue est ajustée par (Ethanol ou H_2O) à 0.700 ± 0.020 à 734 nm avant l'usage. 160 μ L de la solution d'ABTS a été ajoutée à 40 μ L de différentes concentrations de l'extrait étudié, ainsi que les standards BHA et BHT. Le blanc est préparé en parallèle suivant le même protocole en remplaçant l'extrait par le DMSO. Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance est mesurée à 734 nm en utilisant le lecteur de microplaque à 96 puits. L'expression des résultats est effectuée avec la concentration de l'extrait qui inhibe 50% des radicaux libre dans le milieu réactionnel (IC_{50}).

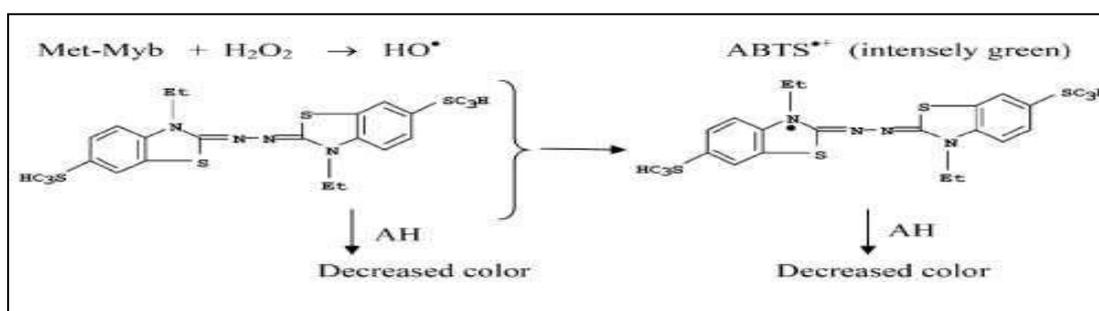


Figure 8: Réaction de test DPPH (2,2 Diphenyl 1 picrylhydrazyl).

II.4.1.3 Test de la capacité antioxydante par réduction de l'ion cuprique (CUPRAC)

Le pouvoir réducteur de Cuprique est déterminé par la méthode CUPRAC (Apak et al., 2004). Pour effectuer cette activité 40 μ l d'échantillon avec différentes concentrations sont ajoutées aux puits de la microplaque, par la suite trois autres solutions ont été ajoutées par ordre; 60 μ l solution d'acétate d'ammonium, 50 μ l de néocuproïne et 50 μ l de la solution $CuCl_2$ (chlorure de cuivre). L'absorbance est mesurée à 450 nm après incubation une heure du temps. Les résultats ont été calculés à titre de $C_{0,5}$ (μ g/ml) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

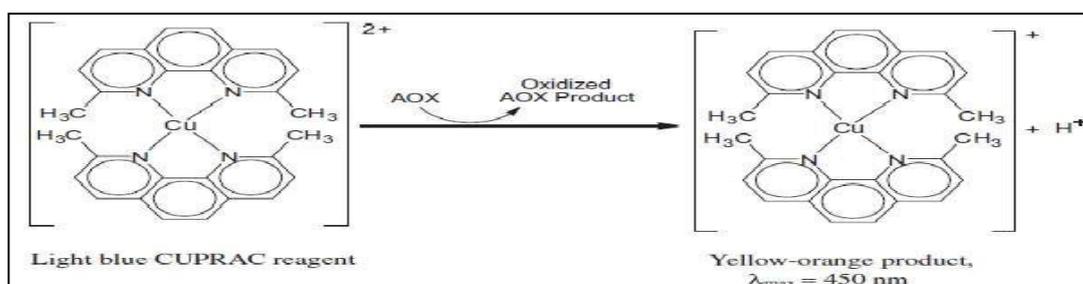


Figure 9: Réaction de CUPRAC (Ozyurek et al., 2011).

II.4.1.4 Test de l'activité du phénanthroline

L'activité de phénanthroline est déterminée par la méthode de Szydlowska-Czerniaka (2008). Brièvement, 10 µl de chaque échantillon à différentes concentrations est mélangé avec 50 µl de FeCl₃ (0.2%) puis 30 µl de phénanthroline (0.5%) et 110 µl de MeOH (méthanol) ont été ajoutés dans chacun des puits de la microplaque. L'absorbance est mesurée à 510 nm après avoir soumis les mélanges à une incubation à l'obscurité pendant 20 min. Les résultats ont été calculés à titre de C_{0.5} (µg/ml) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

II.4.1.5 Test de la capacité antioxydante par réduction de fer (Pouvoir réducteur)

Le pouvoir réducteur est déterminé par la méthode d'Oyaizu (1986) avec une légère modification. Brièvement 10 µl d'échantillon a été ajouté à 40 µl du tampon phosphate (pH 6.6) et à 50 µl de potassium ferricyanide (K₃Fe(CN)₆) (1%), après incubation à 50°C pendant 20 min, 50 µl de l'acide trichloroacétique (TCA) à (10%) ont été ajoutés avec 40 µl H₂O et 10 µl de chlorure de fer (FeCl₃) (0.1 %). Un blanc est préparé dans les mêmes conditions sans extrait. L'enregistrement des absorbances est effectué à une longueur d'onde de 700 nm. Les résultats ont été calculés à titre de C_{0.5} (µg/ml) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

II.4.1.6 Test de blanchiment de β-carotène

Le β-carotène est physiologiquement un composé important reconnu par sa forte activité biologique. Cependant, dans le test du blanchiment du β-carotène, la présence des 11 paires de doubles liaisons rend le β-carotène extrêmement sensible aux radicaux libres dérivés d'hydroperoxydes qui sont formés à partir de l'oxydation d'acide linoléique dans un système émulsion aqueuse en résultant le blanchiment du β-carotène (Marco 1968).

Dans ce test 0,5 mg β-carotène est ajouté dans 1 ml de chloroforme, par la suite 25 µl de l'acide linoléique et 200 mg de Tween 40 ont été ajoutés. Après évaporation du chloroforme sous vide, 100 ml d'eau distillée saturée avec de l'oxygène est ajoutée (H₂O₂). La solution générée doit avoir une absorbance qui varie entre 0,5 et 0,6. Dans le cas contraire l'absorbance est ajustée en ajoutant de l'H₂O₂.

Dans chaque puits de la plaque, 40 µl de chaque concentration des extraits et du standard ont été ajoutés à 160 µl de la solution du bêta-carotène, la plaque est incubée par la suite à 45°C pendant 2 heures et l'absorbance est enregistrée à 470 nm. Le BHT, le BHA et l'alpha tocophérol ont été utilisés comme standards. L'expression des résultats est effectuée avec la concentration de l'extrait qui inhibe 50% des radicaux libres dans le milieu réactionnel (IC₅₀).

II.4.2 Activité antibactérienne

II.4.2.1 Souches bactériennes

L'activité antibactérienne des extraits (TQ, TM, HT et EM) ont été évalués sur deux souches bactériennes. Ce sont des souches de références proviennent de l'American Type Culture Collection ATCC (Tableau 7), toutes fournies par le laboratoire de microbiologie du Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine.

Tableau 7: Liste des souches microbiennes testées.

Souches utilisées			Références
Bactéries	Bactéries Gram-	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
	Bactéries Gram+	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778

II.4.2.2 Conservation des souches bactériennes

Les souches bactériennes sont entretenues par repiquage sur gélose Mueller-Hinton favorable à leur croissance pendant 24 h à l'obscurité à 37 °C (Moroh et *al.*,2008).

II.4.2.3 Préparation de l'inoculum

L'activité antibactérienne doit être réalisée sur des souches bactériennes jeunes en phase de croissance exponentielle. La réactivation des cultures est effectuée par repiquage à la surface de la gélose MH pré coulée dans les boîtes de Pétri, ensuite incubée à 37C° pendant 18 à 24h. Quant à la préparation de la suspension bactérienne, 3 à 5 colonies similaires bien isolées sont déchargées dans de l'eau physiologique stérile, après homogénéisation de la suspension bactérienne à l'aide d'un vortex, la standardisation à 10⁶;UFC/ml a été réalisée par spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 620 nm. La *Do* obtenu doit être comprise entre 0,08 et 0,1 ce qui correspond à une concentration de 10⁷à 10⁸ ; UFC/ml selon Mc Ferland.

Dans des boîtes de Pétri, le milieu de culture gélosé MH en surfusion a été coulé aseptiquement à raison de 15ml par boîte. Après la solidification, un écouvillon stérile a été imbibé dans la suspension bactérienne et étalé à la surface de la gélose à trois reprises, en tournant la boîte à environ 60°C après chaque application dans le but d'avoir une distribution égale de l'inoculum.

- **Méthode des puits creusés pour les bactéries**

La méthode consiste à ensemencer l'inoculum en surface du milieu de culture gélosé préalablement coulé dans des boîtes de Pétri. Après solidification du milieu, des puits (05 à 06 puits par boîte) sont découpés à l'aide de pipette Pasteur (diamètre de 5 mm). Ces puits sont remplis en milieu par l'extrait végétal, en utilisant 80 µg de chaque échantillon, puis les cultures sont incubées à 37°C pendant 24 h, les zones d'inhibitions sont mesurées ensuite en mm. Le diamètre du puits (5 mm) est inclus dans la lecture (Benzohra et *al.*, 2019).

CHAPITRE III

RÉSULTATS ET DISCUSSION

III. Résultats et Discussion

Les essais réalisés, afin de contribuer à la caractérisation et l'évaluation des activités biologiques des molécules et extraits des graines de la *Nigella sativa* L., nous ont permis d'obtenir les résultats suivants.

III.1 Rendement de l'extraction

Dans la littérature, les graines de *Nigella sativa* L. renferment des taux élevés en huile totale, compris entre 39.7 et 52 % (Ashraf et al., 2006; Ramadan et Mörsel, 2002a,b). La variation dans la teneur en huile des graines est due aux plusieurs facteurs :

la méthode d'extraction (Atta, 2003; Ramadan et Mörsel, 2002b) et l'espèce utilisée (Kökdil et Hilmaz, 2005). Dans cette étude, le rendement d'extraction de l'huile totale et de l'extrait méthanolique est décrit dans le tableau ci-dessous (Tableau 8, figure 11).

Le rendement est déterminé par rapport à 160 g de matériel végétal, il est exprimé en pourcentage.

Tableau 8: Rendement d'extraction de l'huile totale et l'extrait méthanolique de *Nigella sativa* L.

Fractions	Rendement d'extraction %	Rendement (g)
Huile totale	6,4% des graines	10,24g
Phase méthanolique	8,92% des graines	14,27g

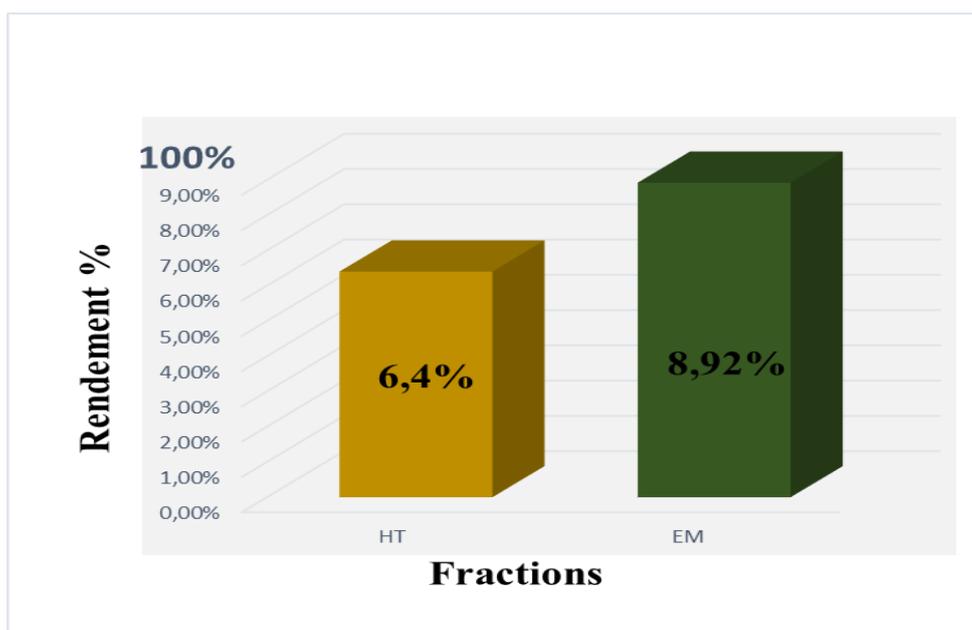


Figure 10: Rendement des extraits de *Nigella sativa* L.

III.2 Activités antioxydantes

Dans la présente étude, nous avons réalisé les activités antioxydantes suivantes:

piégeage du radical libre (DPPH), piégeage du cation radical $ABTS^{•+}$, pouvoir réducteur (FRAP) la réduction de l'ion cuprique (CUPRAC), réduction par la formation du complexe Fe^{+2} - phénantroline, blanchiment de β - carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique.

III.2.1 Tests de piégeage des radicaux libres

III.2.1.1 Radical libre DPPH

L'activité antiradicalaire des extraits *vis-à-vis* le radical DPPH a été évaluée par spectrophotométrie à 517 nm, en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH \bullet) à la couleur jaune (DPPH-H). Dans ce test les résultats ont été comparés aux standard BHA (Tableau 9, figure12).

Tableau 9: Valeurs des IC_{50} des extraits et molécules de *Nigella sativa* L.

Extraits et molécules	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
TM	>200
TQ	80,44 \pm 3,67
HT	373,26 \pm 3,74
EM	251,58 \pm 10,93
BHA	6,14 \pm 0,41

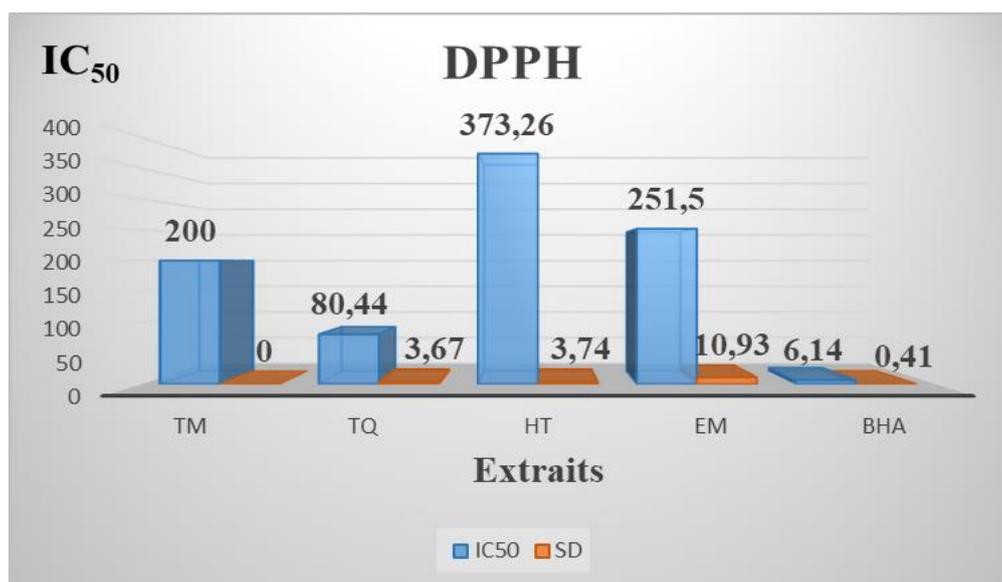


Figure 11: Effet piègeur du radical DPPH par les extraits et les molécules de *Nigella sativa* L.

D'après les résultats obtenus, on constate que la TQ a piégé le radical DPPH avec une $IC_{50} = 80.44 \pm 3.67 \mu\text{g/ml}$, inférieur à celle de TM avec une $IC_{50} > 200 \mu\text{g/ml}$ et cette activité reste faible par rapport à celle du standard BHA ($IC_{50} = 6,14 \pm 0,41 \mu\text{g/ml}$).

Pour les extraits de la plante, HT et EM, l'activité antioxydante a montré des IC_{50} de $251.58 \pm 10.93 \mu\text{g/ml}$ et $373.26 \pm 3.74 \mu\text{g/ml}$ respectivement et ces valeurs restent inférieures à celle de BHA (Tableau 9, figure 11).

En 2012, Öztürk a montré que IC_{50} de la TM est $306 \pm 2.64 \mu\text{g/ml}$, ces résultats sont presque similaires à celui que nous avons trouvé ($IC_{50} > 200 \mu\text{g/ml}$).

En comparant les résultats obtenus des molécules avec les extraits, on peut dire que les deux molécules ont manifesté la meilleure activité antiradicalaire par rapport à celle de HT et EM. Selon la littérature, cette activité pourrait être liée à la structure chimique des molécules qui présente des groupements pouvant piéger ce radical (Sánchez-Vioque *et al.*, 2013). De plus, la TQ est caractérisée par la présence d'un noyau quinone qui lui confère des propriétés redox. Ceci favorise ses effets de piégeage radicalaire (Daba *et al.*, 1998; Badary *et al.*, 2003). En revanche, le mélange de composants majeurs et d'autres composés de la même plante peut exercer un effet antagoniste (Ceylan *et al.*, 2016) avec l'ordre de puissance suivant $TQ > TM > HT$.

III.2.1.2 Radical libre ABTS+•

Cette activité est basée sur la capacité d'une substance à piéger le radical ABTS+• par rapport aux antioxydants standards (BHT, BHT) (Tableau 10, Figure 12).

Tableau 10: Valeurs des IC_{50} des extraits et molécules de *Nigelle sativa* L.

Extraits et molécules	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
TM	$1,84 \pm 0,10$
TQ	$734,40 \pm 6,72$
HT	$260,89 \pm 1,55$
EM	$147,67 \pm 2,07$
BHT	$1,29 \pm 0,30$
BHA	$1,81 \pm 0,10$

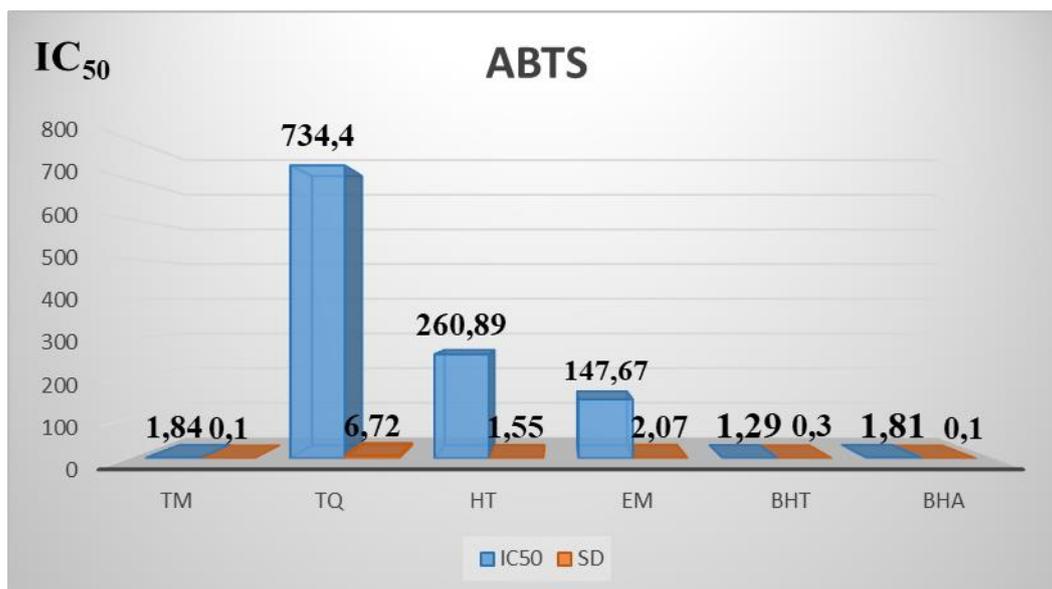


Figure 12: Effet piègeur du radical ABTS par les extraits et les molécules de *Nigella sativa* L.

Les résultats ont montré que la TM présente la meilleure activité antiradicalaire avec une IC₅₀ de 1,84±0,10 µg/ml suivi de EM, HT et TQ (147,67±2,07 µg/ml, 260,89±1,55 µg/ml et 734,40±6,72 µg/ml) respectivement. La comparaison est effectuée par rapport aux standards BHT, BHA (1,29±0,30µg/m, 1,81±0,10µg/ml). Les résultats de TM sont en accord avec celui de Öztürk et ses collaborateurs (2012) qui a montré que IC₅₀ de TM est de 1,73 ± 0,03µg/ml. Les résultats de cette activité ne concordent pas avec ceux de piégeage du radical DPPH, on peut expliquer cette divergence entre les deux activités par la différence de polarité entre la TQ et le TM ainsi qu'entre EM et HT.

Les activités antioxydantes du TM sont principalement dues à leurs redox propriétés, qui peuvent jouer un rôle important dans la neutralisation des radicaux libres. Aussi, il y a une corrélation linéaire significative entre la teneur totale en phénol et la capacité antioxydante (Katalinik et al., 2006 ; Huang et al., 2011). Cette activité pourrait être aussi attribuer à la différence de position du cycle aromatique substituants, ce qui affecte la stabilité du phénoxy radical résultant lors de la réaction avec ABTS•+ (Kfoury et al., 2016).

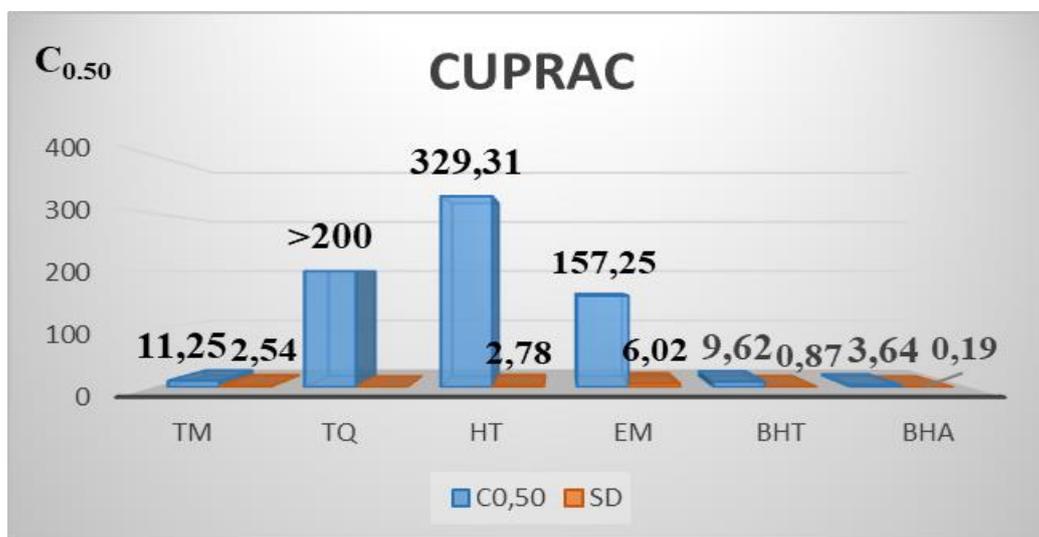
III.2.2 Activité du pouvoir réducteur

III.2.2.1 Réduction du complexe cuivre-néocuproïne (CUPRAC)

Cette activité consiste à la réduction du complexe cuivre-néocuproïne [Nc₂-Cu²⁺], le dosage est mesuré à titre de valeurs C_{0,50} des extraits, des molécules et standards BHA et BHT (Tableau 11, Figure13).

Tableau 11: Valeurs des $C_{0,50}$ des extraits et molécules de *Nigella sativa L.*

Extraits et molécules	$C_{0,50}$ ($\mu\text{g/ml}$)
TM	11,25 \pm 2,54
TQ	>200
HT	329,31 \pm 2,78
EM	157,25 \pm 6,02
BHT	9,62 \pm 0,87
BHA	3,64 \pm 0,19

**Figure 13:** Effet réducteur du CUPRAC par les extraits et les molécules de *Nigella sativa L.*

Les résultats de ce test ont montré que TM possède la meilleure activité ($C_{0,50}=11,25\pm 2,54\mu\text{g/ml}$) suivie de EM, TQ et finalement le HT ($C_{0,50}>200\mu\text{g/ml}$, $C_{0,50}=157,25\pm 6,02\mu\text{g/ml}$, $C_{0,50}=329,31\pm 2,78\mu\text{g/ml}$) respectivement.

Selon les résultats, le TM a un puissant pouvoir de réduire le cuivre en comparaison avec BHT et BHA ($C_{0,50}=9,62\pm 0,87\mu\text{g/ml}$, $C_{0,50}=3,64\pm 0,19\mu\text{g/ml}$) successivement. Selon une étude sur le TM, l'absorbance est $3,03 \pm 0,01$ (Öztürk, 2012). Une autre étude a montré que l'absorbance de TM est de $0,95\pm 0,02$ (Deng, 2016).

III.2.2.2 Activité de réduction de Fe^{+3} (FRAP)

Cette activité est basée sur l'aptitude des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{+3}) de couleur jaune en fer ferreux (Fe^{+2}) de couleur bleu verte en mesurant les valeurs de $A_{0,50}$ par rapport aux standards acide ascorbique et α -tocophérol, ce test nous a permis d'obtenir les résultats suivants (Tableau :12, Figure : 14).

Les résultats obtenus montrent que la TM ($83,03 \pm 6,42 \mu\text{g/ml}$) possède la meilleure capacité de réduire le fer, suivie de EM ($>400 \mu\text{g/ml}$) puis le TQ et HT avec des $C_{0,50} > 800 \mu\text{g/ml}$. Cette activité est plus en moins faible par rapport aux standards (acide ascorbique $C_{0,50} = 6,77 \pm 1,15 \mu\text{g/ml}$ et α -tocophérol $C_{0,50} = 34,93 \pm 2,38 \mu\text{g/ml}$).

Tableau 12: Valeurs des $C_{0,50}$ des extraits et molécules de *Nigella sativa* L.

Extraits et molécules	$C_{0,50}$ ($\mu\text{g/ml}$)
TM	$83,03 \pm 6,42$
TQ	>800
HT	>800
EM	>400
a. ascorbique	$6,77 \pm 1,15$
α -tocophérol	$34,93 \pm 2,38$

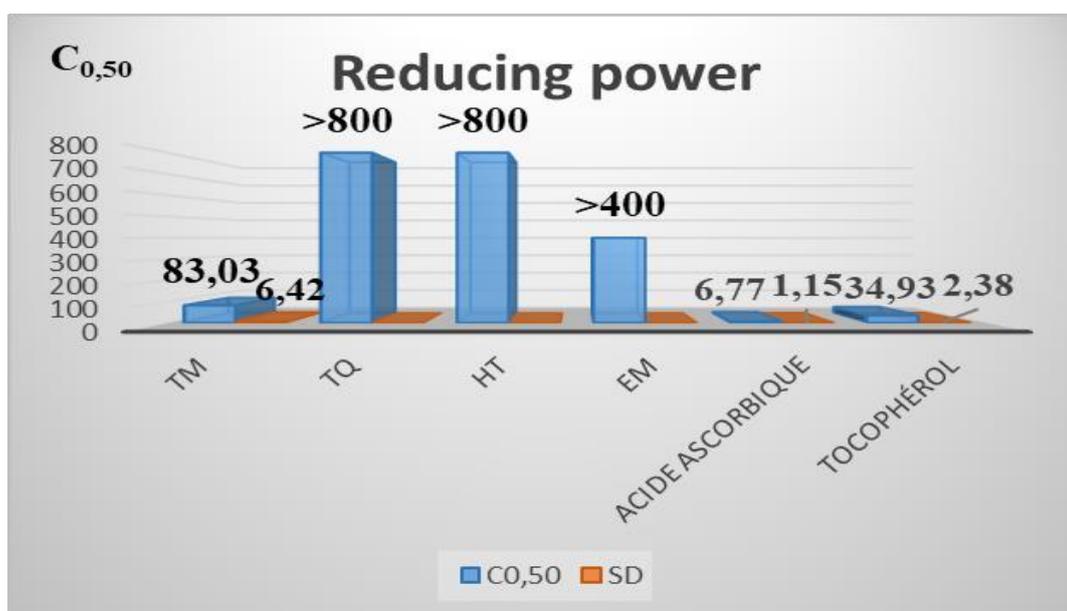


Figure 14: Effet du pouvoir réducteur par les extraits et les molécules de *Nigella sativa* L.

La méthode du pouvoir antioxydant réducteur ferrique est appropriée pour mesurer la capacité antioxydante totale et l'état des herbes médicinales avant l'utilisation en phytothérapie (Szollosi et Varga, 2002). Il y a une relation positive rapportée entre le total phénolique et l'activité antioxydante de nombreuses espèces végétales (Tubessa, 2011).

Deng en (2016) a trouvé que le thymol était capable de fournir suffisamment de Fe(II) par réduction de Fe (III) pour se lier au TPTZ (Le complexe de tripyridyltriazine ferreux) avec un résultat d'absorbance égale à $0,74 \pm 0,05$.

D'autre part, les résultats de l'évaluation du pouvoir réducteur de la TQ révèlent qu'elle a une faible activité en tant qu'agent réducteur des ions Fe^{+3} en Fe^{+2} presque similaire à celle qu'a trouvé Khiter (2019). Ainsi, les extraits de *Nigella Sativa* L. pourraient agir comme des donneurs d'électrons et peuvent réagir avec les radicaux libres et les convertir en produits stables, mettant ainsi fin à la réaction de la chaîne radicalaire (Oktay *et al.*, 2003).

Globalement, Le pouvoir réducteur des extraits et molécules mesuré par CUPRAC est plus élevé par rapport à celui du FRAP, et cela pourrait être attribué à l'environnement de leurs réaction (conditions de pH). Le FRAP doit être effectué à pH acide (3,6) alors qu'un pH=7 neutre doit être fourni pour effectuer CUPRAC. Le thymol en tant que composé phénolique ne pourrait pas être capable de dissocier complètement ses protons à conditions acides et serait donc moins exposé aux réactifs composés (Berker *et al.*, 2010).

III.2.3 Activité de réduction par la formation du complexe Fe^{+2} -phénantroline

Suite à une réaction d'oxydoréduction, un complexe Fe^{+2} -phénantroline de couleur rouge-orangé est formé. Cette réduction est déterminée par la mesure de valeurs de $C_{0,50}$ des extraits et des molécules de la plante et celles des standards BHA et BHT ce qui a permis d'obtenir les résultats suivants : (Tableau 13, Figure 15).

Tableau 13: Valeurs des $C_{0,50}$ des extraits et molécules de *Nigella sativa* L.

Extraits et molécules	$C_{0,50}$ ($\mu\text{g/ml}$)
TM	41,84 \pm 2,33
TQ	>200
HT	>400
EM	>400
BHA	0,93 \pm 0,07
BHT	2,24 \pm 0,17

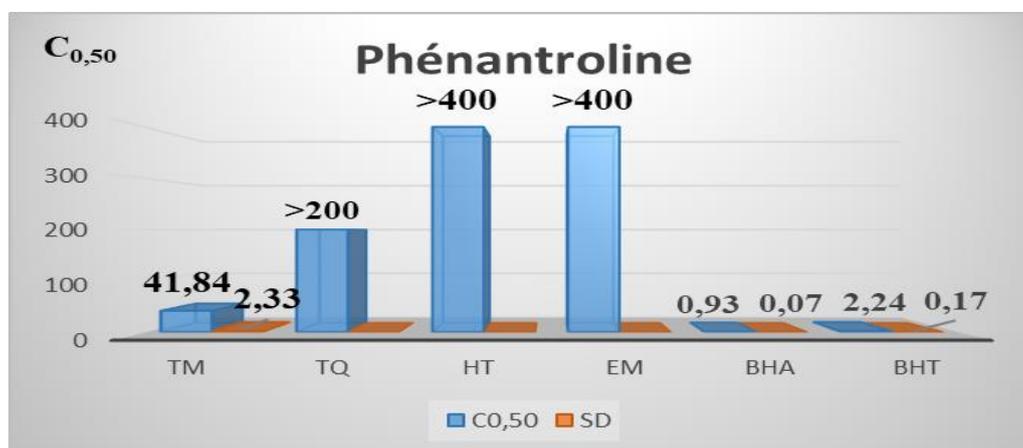


Figure 15: Effet réducteur de phénantroline par les extraits et les molécules de *Nigella sativa* L.

Les résultats montrent que le TM avec une $C_{0,50}=41,84\mu\text{g/ml}$ présente une activité de réduction par la formation du complexe Fe^{+2} -phénantroline plus significative que celle de TQ $C_{0,50}>200(\mu\text{g/ml})$ alors que $C_{0,50}$ des deux extraits est supérieur à $400(\mu\text{g/ml})$. La comparaison de ces résultats avec ceux des standards BHA ($C_{0,50}=0,93\pm 0,07\mu\text{g/ml}$) et BHT ($C_{0,50}=2,24\pm 0,17\mu\text{g/ml}$) indique que l'activité des extraits et des molécules de *Nigella sativa* L. reste plus faible par rapport aux standards.

III.2.4 Test de blanchiment de β -carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique

La β -carotène est physiologiquement un composé important reconnu par sa forte activité biologique. Cependant, dans le test du blanchiment du β -carotène, la présence des 11 paires de doubles liaisons rend la β -carotène extrêmement sensible aux radicaux libres dérivés d'hydroperoxydes qui sont formés à partir de l'oxydation d'acide linoléique dans un système émulsion aqueuse en résultant le blanchiment du β -carotène.

Les résultats ont montré que HT a présenté la meilleure activité ($\text{IC}_{50}=11,46\pm 0,25 \mu\text{g/ml}$) dix fois plus faible que les standards BHT avec une $\text{IC}_{50}=0,91\pm 0,01 \mu\text{g/ml}$ et BHA avec une $\text{IC}_{50}=1,05\pm 0,03 \mu\text{g/ml}$, suivi de TQ ($\text{IC}_{50}=21,70\pm 0,73 \mu\text{g/ml}$) et le TM ($\text{IC}_{50}=25,23\pm 0,66 \mu\text{g/ml}$), tandis que EM a montré une faible activité ($\text{IC}_{50}>400 \mu\text{g/ml}$) respectivement (Tableau 14, Figure 16).

Tableau 14: Valeurs des IC_{50} des extraits et molécules de *Nigella sativa* L.

Extraits et molécules	$\text{IC}_{50}(\mu\text{g/ml})$
TM	$25,23\pm 0,66$
TQ	$21,70\pm 0,73$
HT	$11,46\pm 0,25$
EM	>400
BHT	$0,91\pm 0,01$
BHA	$1,05\pm 0,03$

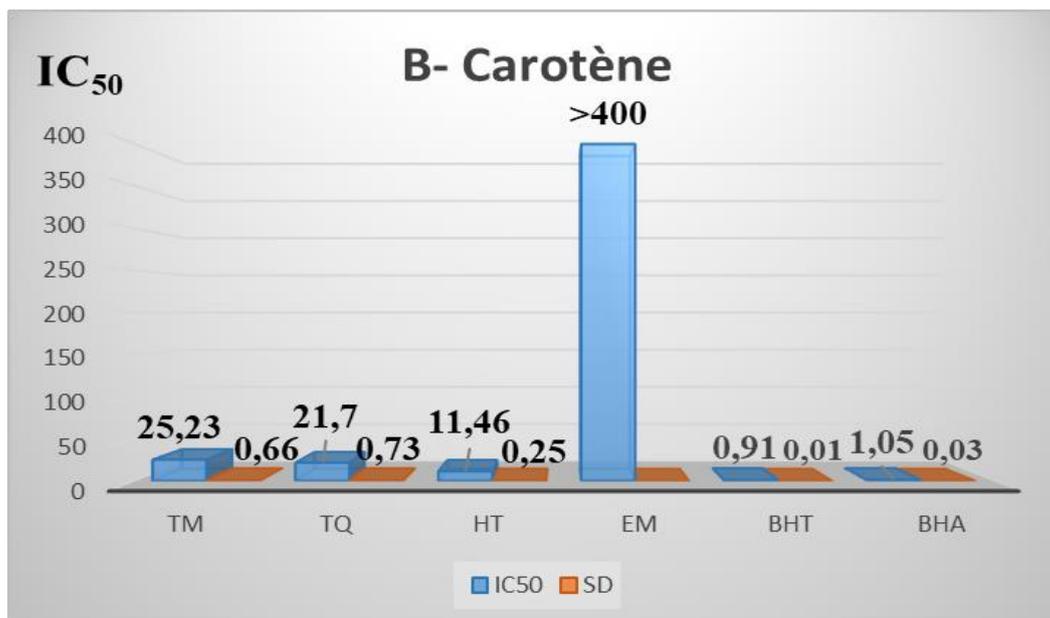


Figure 16: Effet du blanchiment du β -carotène par les extraits et les molécules de *Nigella sativa* L.

Les résultats indiquent que l'effet de l'huile totale contre la peroxydation lipidique *in vitro* a été évalué à travers deux tests ; blanchissement de β -carotène et peroxydation de l'acide linoléique. Ainsi, l'acide linoléique pourrait servir du modèle d'acides gras membranaires. Durant la peroxydation lipidique, les antioxydants agissent sur la décomposition des peroxydes (Sandhar et al., 2011). Nous rappelons que HT constituée de 96% des lipides neutres dont les vitamines liposolubles notamment α -tocophérol (Ramadan et Morcel, 2002 ; Atta, 2003 ; Chikh-Rouhou et al., 2008 ; Mosbah, 2016).

III.3 Analyse d'HPLC

La technique HPLC, utilisée dans ce travail, vise à vérifier la présence des molécules TM et TQ dans d'EM et HT de *Nigella sativa* L. en utilisant ces molécules comme standards (figure17).

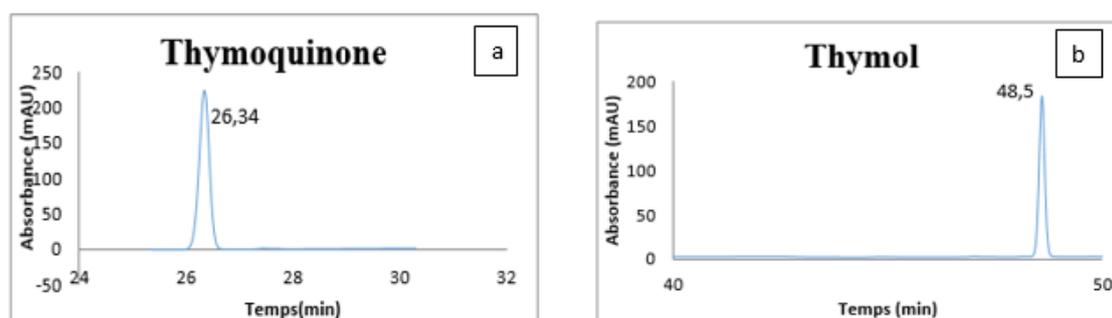


Figure 17: Chromatogramme des standards thymoquinone (a) et thymol (b).

III.3.1 Analyse de l'huile totale

Les chromatogrammes obtenus après l'analyse de HT de *Nigella sativa* L. ont démontré dans la figure 18.

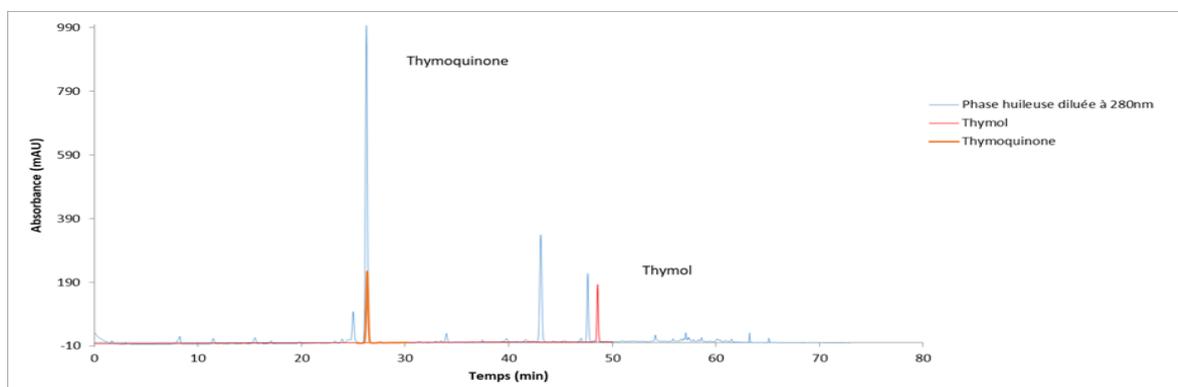


Figure 18: Chromatogramme de HT (diluée à 1/9) superposé avec les standards.

Les composants de l'huile totale détectés par cette analyse sont mentionnés dans le tableau 15.

Tableau 15: Composants de l'huile totale de *Nigella sativa* L. par HPLC.

Nom du composant	Temps de rétention (min)	Taux ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Acide dihydrobenzoïque	12.227	2.85871
Acide hydrobenzoïque	17.045	5.39310
Acide coumarique	24.988	2.81988
Thymoquinone	26.259	776.68039
Acide ferulique	27.640	1.25923
Acide hydrocinnamique	32.943	4.72446
thymol	47.627	51.76347

III.3.2 Analyse de l'extrait méthanolique

Les chromatogrammes obtenus après l'analyse EM de *Nigella sativa* L. ont démontré dans la figure 19.

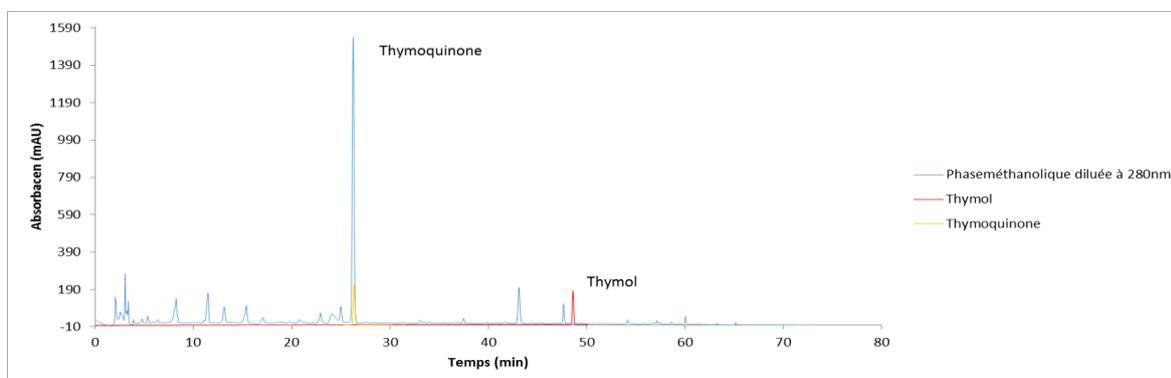


Figure 19: Chromatogramme de l'extrait méthanolique (dilué à 1/9) superposé avec les standards.

Les composants de l'extrait méthanolique détectés par cette analyse sont mentionnés dans le tableau 16.

Tableau 16: Composants de l'extrait méthanolique par HPLC.

Nom du composant	Temps de rétention (min)	Taux ($\mu\text{g} / \text{ml}$)
Acide dihydrobenzoïque	12.240	4.15797
Acide hydrobenzoïque	17.054	2.63211
Acide dihydrocinnamique	17.759	1.20231
Acide vanillique	19.197	7.87734
Acide cumarique	24.973	2.51099
Thymoquinone	26.234	1191.79277
Acide ferulique	26.959	1.46826
Acide hydrocinnamique	33.074	1.08035
thymol	47.630	25.65079

Les résultats d'analyse HPLC ont démontré que HT et EM de *Nigella sativa* L. contiennent un composé quinonique: Thymoquinone et un composé phénolique Thymol, détectés à des temps de rétention différents: TQ:26.259 min dans HT et 26.234 min dans EM alors que TM 47.627min dans HT et 47.630 dans EM à 280 nm et avec des concentrations importantes dont TQ est majoritaire dans les deux extraits HT et EM (776.68039 $\mu\text{g} / \text{ml}$, 1191.79277 $\mu\text{g} / \text{ml}$) respectivement.

De plus, l'analyse des deux extraits a montré la présence des différents acides phénoliques :acide dihydrobenzoïque, acide hydrobenzoïque, acide coumarique, acide ferulique, acide hydrocinnamique pour HT et acide dihydrobenzoïque, acide hydrobenzoïque, acide dihydrocinnamique, acide vanillique, acide cumarique, acide ferulique, acide hydrocinnamique pour EM.Le taux de ces acides (tableau 16 et tableau 17) montre qu'il ya une différence de quantité entre HT et EM (la teneur en acide hydrobenzoïque, dihydrocinnamique, cinnamique, TM dans HT est supérieur à celui de EM alors que la quantité de l'acide dihydrobenzoïque, TQ et l'acide ferulique dans HT est inferieur pour l'EM. De même, les acides vanilique et dihydrocinnamique se trouvent dans la composition de EM et non pas dans HT.

Selon l'étude de Hosseinzadeh *et al.*, (2007), le composé TQ de l'huile des graines de *Nigella sativa* L. a été détecté au temps de rétention de 30 min à 254 nm. Ces chercheurs ont détecté la TQ par HPLC en utilisant la colonne C18 analytique à phase renversée de (250 x 4.6 mm, dimension particulaire 4.6µm) avec un débit de 1 ml/min. Les résultats de chromatogramme correspondent bien aux travaux de Ghosheh *et al.*, (1999) qui ont démontré avec la même méthode que l'huile fixe de *Nigella sativa* L. contient des dérivés phénoliques; thymoquinone, dithymoquinone, thymohydroquinone, et le thymol.

De plus, nos résultats correspondent aux travaux d'Al-Saleh et ses collaborateurs (2006), qui ont prouvé par l'analyse d'HPLC que toutes les variétés analysées de *Nigella sativa* L. étaient riches en thymoquinone et en thymol. Les résultats de l'étude menée par Mechraoui et ses collaborateurs en (2018), ont indiqué que TQ et TM représentent les composés majoritaires des extraits HT et EM.

III.4 Activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne des molécules et extraits de *Nigella sativa* L. a été réalisée avec la méthode des puits de diffusion à la surface des boîtes inoculées on a provoqué 2 ou 4 puits creusés de 8 mm et chacun de ces puits est imprégné par 80 µl d'échantillon dissout dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) (Vardar *et al.*, 2003), avec des concentrations différentes pour chaque échantillon. Après un temps d'incubation 24 h à 37°C (*B.cereus* ATCC 11778, *E.coli* ATCC 25922), les zones d'inhibition sont mesurées en millimètres et comparées avec celles du DMSO comme contrôle négatif.

Les résultats obtenus ont été mentionnés dans le tableau 17, L'échelle de l'estimation de l'activité antimicrobienne est donnée par Ponce et ses collaborateurs (2003). Ils ont classé les diamètres de zones d'inhibition (D) de la croissance bactérienne en 5 classes:

- Extrêmement sensible +++ : plus de 20mm.
- Très sensibles ++ : de 15mm à 19mm.
- Sensibles + : 8 mm à 14mm.
- Non sensibles - : moins de 8 mm.

D'après les résultats obtenus, il apparaît que tous les échantillons inhibent la croissance de *B. cereus* (Gram+) avec des degrés de sensibilité différents ; pour les deux molécules TM, TQ la souche est extrêmement sensible avec des zones d'inhibitions varient entre $21,5 \pm 2,12$ mm et $40 \pm 0,00$ mm suivant les concentrations utilisées (60 mg/ml, 30 mg/ml, 15 mg/ml, 7,5 mg/ml, 3,75 mg/ml, 1,87 mg/ml). Pour l'extrait HT, il est extrêmement sensible avec une zone d'inhibition varie entre $33 \pm 4,24$ mm et $40 \pm 0,00$ mm pour les concentrations 100 mg/ml et 50 mg/ml respectivement et très sensible avec une zone d'inhibition entre $16 \pm 1,41$ mm et $18 \pm 0,00$ mm avec les concentrations de 25 mg/ml et 12,5 mg/ml respectivement.

EM est extrêmement sensible avec des zones d'inhibitions varient entre $19,5 \pm 0,70$ mm et $28 \pm 0,00$ mm pour les concentrations 100 mg/ml et 50 mg/ml ainsi cet extrait est sensible à 25 mg/ml avec une zone d'inhibition de $11 \pm 0,00$ mm.

La deuxième bactérie *E. coli*, une bactérie Gram (-), est révélée une résistante aux échantillons testés; TQ, HT et EM par contre cette bactérie est très sensible au TM avec des zones d'inhibition qui varient entre 15 mm et 17 mm pour les concentrations 60 mg/ml, 30 mg/ml, 15 mg/ml respectivement et sensible à 7,5 mg/ml avec une zone d'inhibition de $14 \pm 0,00$ mm.

Tableau 17: Diamètres des zones d'inhibition des extraits et des molécules de *Nigella sativa* L.

Concentrations μ l/ml	<i>E. coli</i>				<i>B. cereus</i>			
	TM	TQ	HT	EM	TM	TQ	HT	EM
0	$17 \pm 0,00$	-	-	-	$40 \pm 0,00$	$40 \pm 0,00$	$40 \pm 0,00$	$28 \pm 0,00$
1/2	$15 \pm 0,00$	-	-	-	$37,5 \pm 0,70$	$38,5 \pm 0,70$	$33 \pm 4,24$	$19,5 \pm 0,70$
1/4	$14,5 \pm 0,70$	-	-	-	$37,5 \pm 3,53$	$38,5 \pm 2,12$	$18 \pm 0,00$	$11 \pm 0,00$
1/8	$14 \pm 0,00$	-	-	-	$21,5 \pm 2,12$	$38,5 \pm 2,12$	$16 \pm 1,41$	$9,5 \pm 0,70$
1/16	$7 \pm 0,00$	-	-	-	-	$29 \pm 1,41$	-	$8,5 \pm 0,70$



Figure 20: Résultat de l'activité antimicrobienne de HT *Nigella sativa* L. sur les souches à Gram- (*E.coli*).



Figure 21: Résultat de l'activité antimicrobienne de HT *Nigella sativa* L. sur les souches à Gram+ (*B.cereus*).



Figure22 : Résultat de l'activité antimicrobienne de la TQ sur les souches à Gram -(*E.coli*).

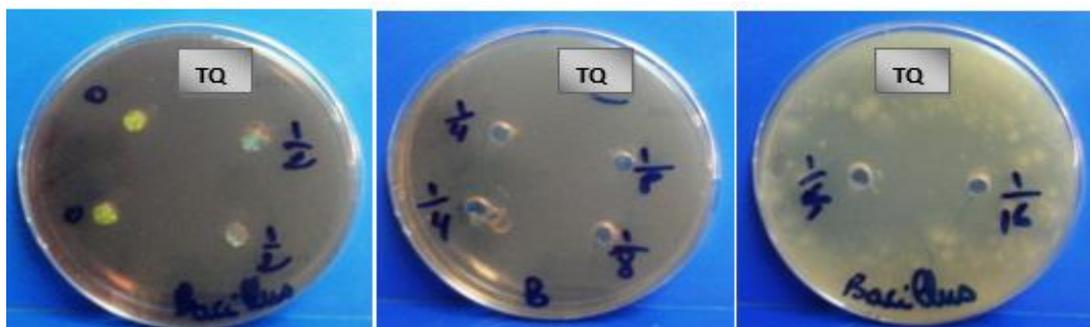


Figure23: Résultat de l'activité antimicrobienne de la TQ sur les souches à Gram +(*B.cereus*).



Figure 24: Résultat de l'activité antimicrobienne de TM sur les souches à Gram - (*E.coli*).



Figure 25: Résultat de l'activité antimicrobienne de TM sur les souches à Gram+ (*B.cereus*).

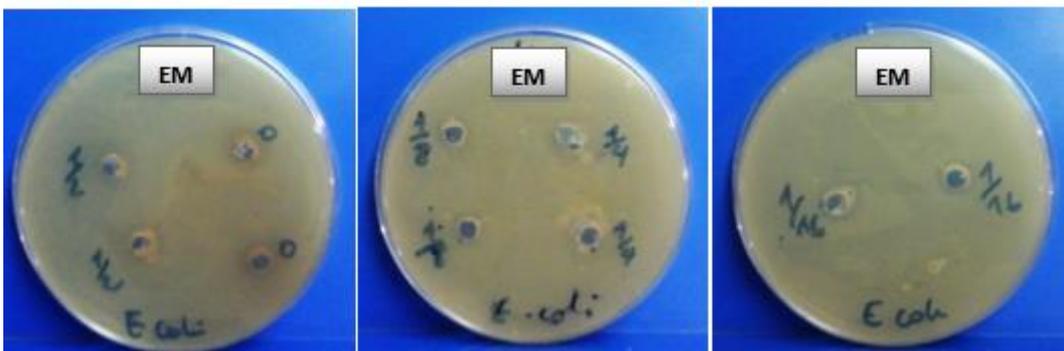


Figure 26: Résultat de l'activité antimicrobienne de EM sur les souches à Gram- (*E.coli*).



Figure 27: Résultat de l'activité antimicrobienne de EM sur les souches à Gram + (*B.cereus*).



Figure 28: Souches à Gram +(*B.cereus*) (a) et Gram- (*E.coli*)(b).

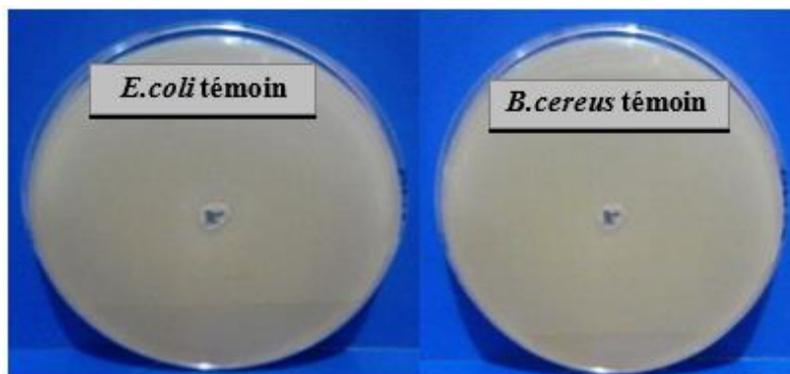


Figure 29: Témoin négatif avec les souches à Gram -(*E.coli*) et Gram+ (*B.cereus*).

De nombreuses études ont été rapportées sur l'activité antibactérienne de *Nigella sativa*L. La TQ est le principal constituant chimique isolé de cette plante. Il s'est avéré avoir une activité antibactérienne contre la plupart des bactéries, en particulier dans le type de Cocci à Gram+ tels que le *Staphylococcus aureus* et le *Staphylococcus épidermoïdes* (Salem et al.,2010; Chaieb et al., 2011; Islam et al., 2013; Emeka et al., 2015).

Les résultats ont indiqué que le TM à différentes concentrations est plus efficace contre les Gram+ plutôt qu'aux bactéries Gram-, ces résultats concordent bien avec la norme Suisse norme (SN) 195920-ASTM E 2149-01(Kavoosi, 2013).

Le pouvoir antibactérien est lié à la nature de bactéries (Gram+ et Gram-) et aux concentrations des molécules et extraits utilisés.

Pour expliquer l'efficacité du thymol, plusieurs études ont montré que TM a la capacité de perturber la membrane lipidique de la bactérie, ce qui entraîne une fuite cytoplasmique, lyse cellulaire et finalement, mort cellulaire (Xu,2008). Par la suite, la baisse de pH qui se produit après la rupture de la membrane cellulaire, provoquée par TM, a entraîné une perte de contrôle des processus cellulaires tels que la biosynthèse de l'ATP, la transcription de l'ADN et la synthèse des protéines et enfin la mort cellulaire (Paparella, 2008; Davoodi,2017).

Mohammed et ces collaborateurs en 2019 ont prouvé que la bactérie Gram+ (*Staphylococcus aureus*) est très sensible au TQ et au THQ (thymohydroquinone). Le mécanisme de destruction des bactéries avec les composants de *Nigella sativa* L. est basé sur interaction de ces composants avec la membrane bactérienne, ce qui entraîne une perturbation par ces produits lipophiles, inhibant la croissance bactériennes (destruction de la membrane cellulaire, force motrice du proton, épuisement et endommagement de la teneur en protéine de la membrane cellulaire). Les huiles essentielles conduisent à la décomposition de la membrane cellulaire et à la libération du contenu cellulaire qui provoque l'apoptose. Ce résultat est similaire à ceux indiqués dans la littérature (Park et al., 2015; Khan 2018; Belhaj, 2021).

Pour les bactéries à Gram – (*E. coli*), HT de *Nigella sativa* L. n'a exercé aucune activité antibactérienne, ce qui est accordé par les travaux de Kökdil et al., (2005) et Mariam et Abu-Al-basal (2009).

Une autre étude a été indiquée sur l'activité antibactérienne de EM, ils ont réalisé un essai de dilution dans des micropuits contre quatre bactéries, à savoir *E.coli*, *Staphylococcus.sp.*, *Pseudomonas syringae* et *B. subtilis*. Les résultats ont indiqué que l'extrait méthanolique de *Nigella sativa* L. présente un potentiel inhibiteur maximal contre tous les bactéries testés (Piras, 2013).

CONCLUSION

Conclusion

Les extraits de *Nigella sativa* L. ont gagné un grand intérêt dans la médecine moderne à cause de leurs effets thérapeutiques sur plusieurs pathologies humaines. Ces extraits possèdent un large spectre des molécules bioactifs à savoir la thymoquinone et le thymol, ces deux molécules sont responsables de cette efficacité pharmacologique de la plante. Dans ce contexte, nous avons évalué les effets biologiques ; activité antioxydante et antibactérienne de l'extrait méthanolique et huile totale de cette plante, ainsi pour les deux molécules, thymoquinone et le thymol, appartiennent à la même plante.

De plus nous avons réalisé une analyse qualitative et quantitative avec la technique HPLC pour les deux extraits de la plante. Les résultats montrent l'existence des deux molécules (thymoquinone, thymol) dans les deux extraits.

Un effet antioxydant intéressant *via* les techniques, DPPH, ABTS, CUPRAC, pouvoir réducteur, et β - carotène ainsi un effet très efficace envers les bactéries (Gram +) ont été signalés pour le thymol, thymoquinone, extrait méthanolique et l'huile totale respectivement. Ces résultats nous a permis de conclure que les molécules et extraits de *Nigella sativa* L. possèdent des effets thérapeutiques importantes, c'est pour cela, ces extraits et molécules peuvent être utilisés dans l'industrie pharmaceutiques pour prévenir des pathologies d'origines bactériennes ou oxydatives. Mais on reste toujours en besoin des études complémentaires et surtout cliniques pour confirmer les vertus thérapeutiques de cette plante.

Pour compléter et mener ce travail, nous envisageons dans un proche avenir de réaliser les essais suivants :

- Caractérisation à travers des techniques à pointes ; GC FID, FTIR
- Activités enzymatiques, principalement : antidiabétique et anti Alzheimer.
- Activité anti inflammatoire.
- Activité antifongique.
- Activité anticancéreux.

IV. Références bibliographiques :

- ❖ Abbas AT, Abdel-Aziz MM, Zalata KR, Tel-D AAG (2005). Effect of dexamethasone and *Nigella sativa* L. on peripheral blood eosinophil count, IgG1 and IgG2a, cytokine profiles and lung inflammation in murine model of allergic asthma. *The Egyptian Journal of Immunology*. 12(1) :95-102.
- ❖ Abdelmeguid NE, Fakhoury R, Kamal SM, Al Wafai RJ (2010). Effects of *Nigella sativa*L.and thymoquinone on biochemical and subcellular changes in pancreatic β -cells of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Diabetes*. 2(4): 256-266.
- ❖ Abdesselam BE (2015). Approche ethnopharmacologique de *Nigella sativa*L. de ses utilisations traditionnelles ancestrales aux études cliniques actuelles de ses principes actifs.
- ❖ Abed N (2016). Effets de *Nigella sativa* L. dans la maladie cœliaque de l'adulte et potentiel protéolytique de la protéase des graines de Nigelle sur la gliadine. Doctoral dissertation.
- ❖ Abidi A, Bahri S, Jameleddine SBK (2019) Propriétés pharmacologiques et physiologiques de *Nigella sativa* L. *Revue de la littérature*.
- ❖ Abukhader MM (2012). The effect of route of administration in thymoquinone toxicity in male and female rats. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 74: 195–200.
- ❖ Aeschbach R, Löliger J, Scott BC, Murcia A, Butler J, Halliwell B, et al(1994). Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Journal of Food and Chemical Toxicology*. 32(1):31-36.
- ❖ Akash MSH, Rehman K, Rasool F, Sethi A, Abrar MA, Irshad A, Murtaza G, Sherazi TA (2011). Alternate therapy of Type 2 diabetes mellitus (T2DM) with *Nigella* (Ranunculaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*. 5: 6885-6889.
- ❖ Alagawany M, Farag MR, Abdelnour SA, Elnesr SS (2021). A review on the beneficial effect of thymol on health and production of fish. *Reviews in Aquaculture*,13(1): 632-641.
- ❖ Al-ali A, Alkhawajah AA, Randhawa MA, Shaikh NA (2008). Oral and intraperitoneal LD50 of Thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa* L. in mice and rats. *Journal of Ayub Medical College*. 20 (2): 25-27.
- ❖ Al-Amri AM Bambosa AO (2009). Phase I Safety and Clinical Activity Study of Thymoquinone in Patients with Advanced Refractory Malignant Disease. *Shiraz E Medical Journal*. 10(3): 107-111.
- ❖ Al-Gaby AM (1998). Amino acid composition and biological effects of supplementing broad bean and corn proteins with *Nigella sativa*.L (black cumin) cake protein. *Nahrung*. 42(5): 290-4.

- ❖ Al-Ghamdi MS (2001). The anti-inflammatory analgesic and antipyretic activity of *Nigella sativa* L. *Journal of Ethnopharmacology* 76(1): 45-48.
- ❖ Ali BH, Blunden G (2003). Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa* L. *Phytotherapy Research* An international journal devoted to pharmacological and toxicological evaluation of natural product derivatives. 17(4): 299-305.
- ❖ Aljabre SHM, Randhawa MA, Akhtar N, Alakloby OM, Alqurashi AM, Aldossary A (2005). Antidermatophyte activity of ether extracts of *Nigella sativa* L. and its active principle, thymoquinone. *Journal of Ethnopharmacology*. 101: 116-119.
- ❖ Al-Jasass FM, Al-Jasser MS (2012). Chemical composition and fatty acid content of some spices and herbs under Saudi Arabia conditions. *The Scientific World Journal*. 2012: 859892.
- ❖ Al-Jassir SM (1992). Chemical composition and microflora of black cumin *Nigella sativa* L. seeds growing in Saudi Arabia. *Journal of Food Chemistry*. 45: 239-242.
- ❖ Alkharfy KM, Al-Daghri NM, Al-Attas OS, Alokail MS (2011). The protective effect of thymoquinone against sepsis syndrome morbidity and mortality in mice. *Journal of International immunopharmacology*. 11(2): 250-254.
- ❖ Al-Saleh IA, Billedo G, El-Doush II (2006). Levels of selenium, dl- α -tocopherol, dl- γ -tocopherol, all-trans-retinol, thymoquinone and thymol in different brands of *Nigella sativa* L. seeds. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19(2-3): 167-175.
- ❖ Amin S, Mir SR, Kohli K, Ali B, Ali M. A study of the chemical composition of black cumin oil and its effect on penetration enhancement from transdermal formulations. *Natural product research*. 24:1151-7.
- ❖ Amin B, Hosseinzadeh H (2016). Black Cumin (*Nigella Sativa* L.) and Its Active Constituent, Thymoquinone: An Overview on the Analgesic and Anti-Inflammatory Effects. *Planta Medica*. 82(1-2): 8-16.
- ❖ Amorati R, Foti MC, Valgimigli L (2013). Antioxidant Activity of Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61(46):10835-47.
- ❖ Apak R, Guclu K, Ozyurek M, Karademir SE (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E Using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 7970-7981.
- ❖ Ashraf M, Ali Q, Iqbal Z (2006). Effect of nitrogen application rate on the content and composition of oil, essential oil and minerals in black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds. *Journal of the Science of food and agriculture*. 86: 871-87.
- ❖ Askin H, Yildiz M, Ayar A (2017). Effects of Thymol and Carvacrol on Acetylcholinesterase from *Drosophila melanogaster*. *Acta Physica Polonica A*. 132(3):720-2.

- ❖ Atta MB (2003). Some characteristics of *Nigella sativa* L. seed cultivated in Egypt and its lipid profile. *Journal of Food Chemistry*. 83: 63-68.
- ❖ Attoub S, Sperandio O, Raza H, Arafat K, Al-Salam S, Al Sultan MA, Al Safi M, Takahashi T, Adem A (2013). Thymoquinone as an anticancer agent: evidence from inhibition of cancer cells viability, invasion in vitro, and tumor growth in vivo. *Fundamental and Clinical Pharmacology*. 27(5): 557-569.
- ❖ Badary OA, Taha RA, Gamal El-Din AM, Abdel-Wahab MH (2003). Thymoquinone Is a Potent Superoxide Anion Scavenger. *Drug and Chemical Toxicology*. 26(2): 87–98.
- ❖ Bamosa AO (2015). A Review on the Hypoglycemic Effect of *Nigella Sativa* L. and Thymoquinone. *Saudi Journal of Medicine and Medical Sciences*. 3: 2-7.
- ❖ Banerjee S, Kaseb AO, Wang Z, Kong D, Mohammad M, Padhye S, Sarkar FH, Mohammad RM (2009). Antitumor activity of gemcitabine and oxaliplatin is augmented by thymoquinone in pancreatic cancer. *Cancer Research*. 69: 5575–5583.
- ❖ Beer AM, Lukanov J, Sagorchev P (2007). Effect of Thymol on the spontaneous contractile activity of the smooth muscles. *Phytomedicine*. 14(1):65-69.
- ❖ Belhaj S, Chaachouay N, Zidane L (2021). Ethnobotanical and toxicology study of medicinal plants used for the treatment of diabetes in the High Atlas Central of Morocco. *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research*. 9(5) : 619-662.
- ❖ Benkaci AF (2007). Etude de la composition chimique de la *Nigella sativa* L. originaire d'Algérie. Doctoral dissertation Alger.
- ❖ Benzohra IE, Megateli M, Elayachi BA, Zekraoui M, Djillali K, Bouafia A, Benouis S (2019). *Journal Algérien des Régions Arides*. 3(2): 01-11.
- ❖ Berker KI, Güçlü K, Demirata B, Apak R (2010). A novel antioxidant assay of ferric reducing capacity measurement using ferrozine as the colour forming complexation reagent. *Analytical Methods*. 2(11) :1770–1778.
- ❖ Blake KD (1993). Dangers of common cold treatments in children. *The Lancet*. 341(8845):640.
- ❖ Blois MS (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable Free Radical. *Nature*. 4617 (181): 1119-1200.
- ❖ Bougatef A, Hajji M, Balti R, Lassoued I, Triki-Ellouz Y, Nasri M (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smoothhound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food chemistry*. 114(4): 1198-1205.
- ❖ Bousbia N (2004). Extraction et identification de quelque huiles essentielles (nigelle, coriandre, origan, thym, romarin) étude de leur activité antimicrobienne. Thèse de magister en science alimentaires (INA) Alger.

- ❖ Bruneton J (2016). Pharmacognosie phytochimie plantes médicinales. 5e édition. Lavoisier. 1487.
- ❖ Burits M, Bucar F (2000). Antioxydant activity of *Nigella sativa* L. essential oil. *Phytother Research*. 14 (5): 323-328.
- ❖ Canonica L, Jommi G, Scolastico C, BONATI A (1963). The pharmacologically active principle in *Nigella sativa*L. *Gazzetta chimica italiana*93: 1404-1407.
- ❖ Çelik SE, Özyürek M, Güçlü K, Apak R (2010). Solvent effects on the antioxidant capacity of lipophilic and hydrophilic antioxidants measured by CUPRAC, ABTS/persulphate and FRAP methods. *Talanta*. 81(4-5): 1300-1309.
- ❖ Ceylan R, Zengin G, Uysal S, Ilhan V, Aktumsek A, Kandemir A, Anwar F (2016). GC-MS analysis and in vitro antioxidant and enzyme inhibitory activities of essential oil from aerial parts of endemic *Thymus spathulifolius* Hausskn. et Velen. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 31(6): 983-990.
- ❖ Chaieb K, Kouidhi B, Jrah H, Mahdouani K, Bakhrouf A (2011). Antibacterial activity of Thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa*L. and its potency to prevent bacterial biofilm formation. *BMCComplementary and Alternative Medicine*. 13(11): 29.
- ❖ Chehl N, Chipitsyna G, Gong Q, Yeo CJ, Arafat HA (2009). Anti-inflammatory effects of the *Nigella sativa* L. seed extract, thymoquinone, in pancreatic cancer cells. *The official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*. 11(5): 373-381.
- ❖ Cheikh-Rouhou S, Besbes S, Hentati B, Blecker C, Deroanne C, Attia H (2007). *Nigella sativa* L. Chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction. *Food chemistry*. 101(2): 673-681.
- ❖ Cheikh-rouhou S, Besbes S, Lognay G, Blecher VC, Deroanne C, Atti H (2008). Sterol composition of black cummin (*Nigella sativa* L.) and Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) seed oils. *Journal of Food Composition and Analysis*. 21: 162-168.
- ❖ Chen WP, Tang JL, Bao JP, Wu LD (2010). Thymoquinone inhibits matrix metalloproteinase expression in rabbit chondrocytes and cartilage in experimental osteoarthritis. *Experimental Biology and Medicine*. 235(12): 1425-1431.
- ❖ Council I (2009). Determination of biophenols in olive oils by HPLC. *International Olive Council Madrid Spain*.
- ❖ D'Antuono LF, Moretti A, Lovato AFS (2002). Seed yield yield components oil content and essential oil content and composition of *Nigella sativa* L. and *Nigelladamascena* L. *Industrial Crops and Products*. 15: 59-69.
- ❖ Daba MH, Abdel-Rahman MS (1998). Hepatoprotective activity of thymoquinone in isolated rat hepatocytes. *Toxicology Letters*. 95: 23-29.

- ❖ Darakhshan S, Bidmeshki PA, Hosseinzadeh CA, Sisakhtnezhad S (2015). Thymoquinone and its therapeutic potentials. *Pharmacological research*. 95: 138-158.
- ❖ David M (2019). Le thymol sources propriétés et applications. Doctoral dissertation.
- ❖ Deng LL, Taxipalati M., Que F, Zhang, H (2016). Physical characterization and antioxidant activity of thymol solubilized Tween 80 micelles. *Scientific reports*. 6(1) : 1-8.
- ❖ Dergarabetian EM, Ghattass KI, El-Sitt SB, Al-Mismar RM, El-Baba CO, Itani WS, Melhem NM, El-Hajj HA, Bazarbachi AA, Schneider-Stock R, Gali-Muhtasib HU (2013). Thymoquinone induces apoptosis in malignant T-cells via generation of ROS. *Frontiers in bioscience*. 5: 706-719.
- ❖ Doost AS, Van Camp J, Dewettinck K, Van der Meeren P (2019). Production of thymol nanoemulsions stabilized using Quillaja Saponin as a biosurfactant Antioxidant activity enhancement. *Food Chemistry*. 293:134-143.
- ❖ Duncker SC, Philippe D, Martin-Paschoud C, Moser M, Mercenier A, Nutten S (2012). *Nigella sativa* L.(black cumin) seed extract alleviates symptoms of allergic diarrhea in mice, involving opioid receptors. *PLoS One*. 7(6): 39841.
- ❖ Elbarbry F, Ragheb A, Marfleet T, Shoker A (2012). Modulation of hepatic drug metabolizing enzymes by dietary doses of thymoquinone in female New Zealand White rabbits. *Phytotherapy Research*. 26(11): 1726-1730.
- ❖ El-Dakhakhny M (1963). Studies on the chemical constitution of egyptian *Nigella sativa* L. *Oil. Planta Medica*. 11(4): 465-470.
- ❖ El-Dakhakhny M (1965). Studies on the Egyptian *Nigella sativa* L. some pharmacological properties of the seeds' active principle in comparison to its dihydrocompound and its polymer. *Arzneimittelforschung*. 15: 1227-1229.
- ❖ El-Dakhakhny M, Madi NJ, Lember N, Ammon HPT (2002). *Nigella sativa* L. oil nigellone and derived thymoquinone inhibit synthesis of 5-lipoxygenase products in polymorpho-nuclear leukocytes from rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 81(2):161-164.
- ❖ EL-Dakhakhny M (1965). Studies on the Egyptian *Nigella sativa* L. some pharmacological properties of the seeds active principle in comparison to its dihydro compound and its polymer. *Arzneimittel forshung*. 15: 1227-1229.
- ❖ El-Mahmoudy A, Shimizu Y, Shiina T, Matsuyama H, El-Sayed M, Takewaki T (2005). Successful abrogation by thymoquinone against induction of diabetes mellitus with streptozotocin via nitric oxide inhibitory mechanism. *International immunopharmacology*. 5(1): 195-207.
- ❖ Farah H, Khadidja Z, Adel SY, Tarik MC (2016). Évaluation de l'activité antimicrobienne de différents extraits d'*Helichrysum stoechas* subsp. *Rupestre Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*. 85: 152 -159.

- ❖ Fararh KM, Atoji Y, Shimizu Y, Shiina T, Nikami H, Takewaki T (2004). Mechanisms of the hypoglycaemic and immunopotentiating effects of *Nigella sativa* L. oil in streptozotocin-induced diabetic hamsters. *Research in Veterinary Science*. 77(2):123-129.
- ❖ Fararh KM, Shimizu Y, Shiina T, Nikami H, Ghanem MM, Takewaki T (2005). Thymoquinone reduces hepatic glucose production in diabetic hamsters. *Research in Veterinary Science*. 79: 219–223.
- ❖ François DG, Hazebroucq D : L'officine. 22e éd. Vigot; 1996.
- ❖ Faucon M (2015). *Traité d'aromathérapie scientifique et médicale fondements et aide à la prescription*. Sang de la Terre Paris. 880.
- ❖ Gali-Muhtasib H, Diab-Assaf M, Boltze C, Al-Hmaira J, Hartig R, Roessner A, Schneider-Stock R (2004a). Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism. *International Journal of Oncology*. 25(4): 857-866.
- ❖ Ghedira K, Goetz P, Le Jeune R (2010). Fenugrec: *Trigonella fœnum-græcum* L.(Fabaceae ex. Leguminosae). *Phytothérapie*. 8(3): 180-184.
- ❖ Gheita TA, Kenawy SA (2012). Effectiveness of *Nigella sativa* L. oil in the management of rheumatoid arthritis patients: a placebo controlled study. *Phytotherapy Research*. 26(8): 1246-8.
- ❖ Gohari AR, Ostad SN, Moradi-Afrapoli F, Malmir M, Tavajohi S, Akbari H, Saeidnia S (2012). Evaluation of the cytotoxicity of *Satureja spicigera* and its main compounds. *Scientific World Journal*. 2012: 203861.
- ❖ Grosso C, Figueiredo AC, Burillo J, Mainar AM, Urieta JS, Barroso JG, Coelho JA, Palavra AM (2010). Composition and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* volatiles comparison between supercritical fluid extraction and hydrodistillation. *Journal of Separation Science*. 33(14): 2211–2218.
- ❖ Hassanein MMM., El-Shami SM., El-Mallah MH (2011). Investigation of lipids profiles of *Nigella lupin* and artichoke seed oils to be used as healthy oils. *Journal of Oleo Science*. 60(3): 99-107.
- ❖ Hayat K, Asim MR, Nawaz M, Li M, Zhang L, Sun N (2011). Ameliorative effect of thymoquinone on ovalbumin-induced allergic conjunctivitis in Balb/c mice. *Current eye research*, 36(7): 591-598.
- ❖ Hosseinzadeh H, Parvardeh S (2004). Anticonvulsant effects of thymoquinone, the major constituent of *Nigella sativa* L. seeds in mice. *Phytomedicine*. 11:56-64.
- ❖ Houghton PJ, Zarka R, Heras B, Hoult RS (1995). Fixed oil of *Nigella sativa* L. and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leucocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Medica*. 61: 33– 36.

- ❖ Hussain J, Bukhari N, Hussain H, Rehman NU, Hussain SM (2010). Chemical constituents of *Nepeta distans*. *Natural Product Communications*. 5(11): 1785–1786.
- ❖ Ilhan A., Gurel A, Armutcu F, Kamisli S, Iraz M (2005). Antiepileptogenic and antioxidant effects of *Nigella sativa* L. oil against pentylenetetrazol-induced kindling in mice. *Neuropharmacology*. 49(4): 456-464.
- ❖ Ismail M, Al-Naqeep G, Chan KW (2010). *Nigella sativa* L. thymoquinone-rich fraction greatly improves plasma antioxidant capacity and expression of antioxidant genes in hypercholesterolemic rats. *Free radical biology and medicine*. 48(5): 664-672.
- ❖ Jafri SH, Glass J, Shi R, Zhang S, Prince M, Kleiner-Hancock H (2010). Thymoquinone and cisplatin as atherapeutic combination in lung cancer: In vitro and in vivo. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 29: 87.
- ❖ Kanter M (2008). Effects of *Nigella sativa*L. and its major constituent, thymoquinone on sciatic nerves in experimental diabetic neuropathy. *Neurochemical Research*. 33(1): 87-96.
- ❖ Kanter M (2009). Protective effects of thymoquinone on streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Journal of Molecular Histology*. 40(2): 107-115.
- ❖ Kfoury M., Landy D, Ruellan S, Auezova L , Greige-Gerges H, Fourmentin S (2016). Determination of formation constants and structural characterization of cyclodextrin inclusion complexes with two phenolic isomers: carvacrol and thymol. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 12(1): 29-42.
- ❖ Khan MA, Ashfaq MK, Zuberi HS, Mahmood MS, Gilani AH (2003). The in vivo antifungal activity of the aqueous extract from *Nigella sativa* L. seeds. *Phytotherapy Research*. 17: 183–186.
- ❖ Khan MA (2018) Antimicrobial action of thymoquinone. In *Molecular and therapeutic actions of thymoquinone*. Springer Singapore. 57–64.
- ❖ Khither H (2019). Etude des effets de la thymoquinone sur le stress oxydant Application à l'hépatotoxicité et l'arthrite rhumatoïde induite chez le rat. Doctoral dissertation.
- ❖ Koka PS, Mondal D, Schultz M, Abdel-Mageed AB, Agrawal KC (2010). Studies on molecular mechanisms of growth inhibitory effects of thymoquinone against prostate cancer cells: role of reactive oxygen species. *Experimental biology and medicine*. 235(6): 751-760.
- ❖ Kökdil G, Hüseyin Y (2005). Analysis of the fixed oils of the genus *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae) in Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*. 33(12):1203-1209.
- ❖ Kokoska L, Havlik J, Valterova I, Sovova H, Sajfrtova M, Jankovska I (2008). Comparison of chemical composition and antibacterial activity of *Nigella sativa* L. seed essential oils obtained by different extraction methods. *Journal of Food Protection*. 71: 2475–2480.

- ❖ Kouidhi B, Zmantar T, Jrah H, Souiden Y, Chaieb K, Mahdouani K, Bakhrouf A (2011). Antibacterial and resistance-modifying activities of thymoquinone against oral pathogens, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 10: 29.
- ❖ Li F, Rajendran P, Sethi G (2010). Thymoquinone inhibits proliferation, induces apoptosis and chemosensitizes human multiple myeloma cells through suppression of signal transducer and activator of transcription 3 activation pathway. *British Journal of Pharmacology*. 161: 541–554.
- ❖ Liu H, Liu HY, Jiang YN, Li N (2016). Protective effect of thymoquinone improves cardiovascular function, and attenuates oxidative stress, inflammation and apoptosis by mediating the PI3K/Akt pathway in diabetic rats. *Molecular medicine reports*. 13(3): 2836-2842.
- ❖ Lorenzi S, Placucci F, Vincenzi C, Bardazzi F, Tosti A (1995). Allergic contact dermatitis due to thymol. *Contact Dermatitis*. 33(6):439-40.
- ❖ Lukas B, Schmiderer C, Franz C, Novak J (2009). Composition of essential oil compounds from different Syrian populations of *Origanum syriacum* L. (Lamiaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 1362–1365.
- ❖ Mahmood SU, Shahid M., Saeed A, Aslam MAS, Iqbal J (2011). Synthesis, biological assay in vitro and molecular docking studies of new Schiff bases derivatives as potential urease inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 46: 5473-5479.
- ❖ Mahmoudvand H, Sepahvand A, Jahanbakhsh S, Ezatpour B, Ayatollahi Mousavi SA (2014). Evaluation of antifungal activities of the essential oil and various extracts of *Nigella sativa* and its main component, thymoquinone against pathogenic dermatophyte strains. *Journal de Mycologie Médicale*. 24: 155–161.
- ❖ Mansour MA, Ginawi OT, El-Hadiyah T, El-Khatib AS, Al-Shabanah OA, Al-Sawaf HA (2001). Effects of volatile oil constituents of *Nigella sativa* L. on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice: evidence for antioxidant effects of thymoquinone. *Research communications in molecular pathology and pharmacology*. 110: 239–251.
- ❖ Mansour MA, Nagi MN, El-Khatib AS, Al-Bekairi AM (2002). Effects of thymoquinone on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation and DT-diaphorase in different tissues of mice: a possible mechanism of action. *Cell Biochemistry and Function*. 20(2): 143-51.
- ❖ Manter DK, Kelsey RG, Karchesy JJ (2007). Antimicrobial activity of extractable conifer heartwood compounds toward *Phytophthora ramorum*. *Journal of Chemical Ecology*. 33: 2133–2147.
- ❖ Marco GJ (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 45: 594–598.
- ❖ Mehta BK, Sharma U, Agrawal S, Pandit V, Joshi N, Gupta M (2008). Isolation and characterization of new compounds from seeds of *Nigella sativa* L. *Medicinal Chemistry Research*. 17(2): 462-473.

- ❖ Meziti A (2009). Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa*L. mémoire Pour l'obtention du Diplôme de magister en biochimie appliquée Université El-Haj Lakhdar Batna. 21-32.
- ❖ Mohammed SJ, Amin HH, Aziz SB, Sha AM, Hassan S, Aziz A, Rahman HS (2019) Structural characterization, antimicrobial activity, and in vitro cytotoxicity effect of black seed oil. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2019.
- ❖ Mokkedem A (2004). Guide pratique des cultures en secs de quelques plantes médicinales condimentaire et aromatiques en zone subhumide. Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie El-harrach.
- ❖ Moroh J, Bahi C, Dje K, Loukou Y, Gued-Guina F (2008). Etude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétique de morindamorindoides sur la croissance in vitro des souches d'*Escherichia coli*. Bulletin de la société royale des sciences de liège. 44-66.
- ❖ Mosbah A (2016). Etude de l'effet hépatoprotecteur de l'huile totale et de la fraction neutre des graines de *Nigella sativa*L. contre l'hépatotoxicité induite par l'éthanol chez le rat. Doctoral dissertation.
- ❖ Nagi MN, Almakki HA (2009). Thymoquinone supplementation induces quinone reductase and glutathione transferase in mice liver: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. Phytotherapy Research. 23: 1295–1298.
- ❖ Nagi MN, Mansour MA (2000). Protective Effect of Thymoquinone against Doxorubicin-induced Cardiotoxicity in Rats: A Possible Mechanism of Protection. Pharmacological Research. 41: 283–289.
- ❖ Nergiz C, Otles S (2003). Some characteristics of *Nigella sativa*L. seed cultivated in Egypt and its lipid profile. Food Chemistry (83): 63-68.
- ❖ Nikakhlagh S, Rahim F, Aryani FHN, Syahpoush A, Brougerdnya MG, Saki N (2011). Herbal treatment of allergic rhinitis the use of *Nigella sativa* L. American Journal of Otolaryngology 32(5): 402-407.
- ❖ Odeh F, Ismail SI, Abu-Dahab R, Mahmoud IS, Al Bawab A (2012). Thymoquinone in liposomes a study of loading efficiency and biological activity towards breast cancer. Drug Delivery. 19(8): 371-377.
- ❖ Oktay M, Culcin I, Kufrevioglu OI (2003). Determination of in vitro antioxidant and - Technologie. 36: 263-271.
- ❖ Omran OM (2014). Effects of thymoquinone on STZ-induced diabetic nephropathy an immunohistochemical study. Ultrastructural pathology. 38(1): 26-33.
- ❖ Orsi-Llinares F (2005). La nigelle, une épice d'intérêt médicinaux. Doctoral dissertation. Thèse doctorat en pharmacie. Faculté de pharmacie de Grenoble. Université Joseph Fourier.

- ❖ Oshchepkova YI, Veshkurova ON, Rogozhin EA, Musolyamov AK, Smirnov AN, Odintsova TI, Salikhov SI (2009). Isolation of the lipid-transporting protein Ns-LTP1 from seeds of the garden fennel flower *Nigella sativa*L. Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 35(3): 344-9.
- ❖ Oyaizu M (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine Japanese. Journal of Nutrition. 44: 307–315.
- ❖ Özyürek M, Güçlü K, Apak R (2011). The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. Trends in Analytical Chemistry. 30(4): 652-664.
- ❖ Öztürk M (2012). Anticholinesterase and antioxidant activities of Savoury (*Satureja thymbra*L.) with identified major terpenes of the essential oil. Food Chemistry. 134(1): 48-54.
- ❖ Pari L, Sankaranarayanan C (2009). Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. Life Sciences. 85: 830–834.
- ❖ Piras A, Rosa A, Marongiu B, Porcedda S, Falconieri D, Dessi MA, Ozcelik B, Koca U (2013). Chemical composition and in vitro bioactivity of the volatile and fixed oils of *Nigella sativa* L. extracted by supercritical carbon dioxide. Industrial Crops and Products. 46: 317–323.
- ❖ Ramadan MF, Mörsel TJ (2002). Direct isocratic normal-phase HPLC assay of fat-soluble vitamins and β -carotene in oilseeds. European Food Research and Technology. 214: 521-527.
- ❖ Ramadan MF, Mörsel JT (2002a). Characterization of phospholipid composition of black cumin (*Nigella sativa* L.) seed oil. Nahrung Food.46:240-244.
- ❖ Ramadan MF, Mörsel JT (2002b). Neutral lipid classes of black cumin (*Nigella sativa* L.) seed oils. European food research and technology. 214:202-206.
- ❖ Ramadan MF (2007). Nutritional value functional properties and nutraceutical applications of black cumin (*Nigella sativa* L.) an overview. The International Journal of Food Science and Technology. 42: 1208-1218.
- ❖ Randhawa MA (2011). In vitro antituberculous activity of thymoquinone an active principle of *Nigella sativa* L. Journal of Ayub Medical College. 23: 78–81.
- ❖ Raza A, Asif R, Yasin G (1999). Use of *Nigella sativa* (Ranunculaceae) a traditional medicine. International Journal of Agriculture and Biologie. 3: 184-187.
- ❖ Re R., Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M., Rice-Evans C(1999).Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free radical biology and medicine. 26: 1231–1237.
- ❖ Riella KR, Marinho RR, Santos JS, Pereira-Filho RN, Cardoso JC, Albuquerque-Junior RLC, Thomazzi SM (2012). Anti-inflammatory and cicatrizing activities of

- thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. *Journal Ethnopharmacol.* 143(2):656-63.
- ❖ Salehi B, Mishra AP, Shukla I, Sharifi, Rad M, Contreras MDM, Segura - Carretero A. Sharifi -Rad J (2018). Thymol thyme and other plant sources Health and potential uses. *Phytotherapy Research*, 32(9): 1688-1706.
 - ❖ Salem ML (2005). Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *International Immunopharmacology*. 5 (13–14):1749-1770.
 - ❖ Sánchez V R, Polissiou M, Astraka K De Los Mozos-Pascual M., Tarantilis P, Herraiz-Peñalver D, Santana-Méridas O (2013). Polyphenol composition antioxidant and metal chelating activities of the solid residues from the essential oil industry. *Industrial Crops and Products*. 49: 150-159.
 - ❖ Sandhar HK, Kumar B, Prasher S, Tiwari P, Salhan M, Sharma P (2011). A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *Internationale Pharmaceutical Scientia*. 1: 25-41.
 - ❖ Schaich KM, Tian X, Xie, J (2015). Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy a critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods*. 14: 111–125.
 - ❖ Schleicher PM, Saleh (2003). *Guérir au Naturel avec le Cumin Noir d'Egypte*. Paris Médecis.
 - ❖ Singh S, Das SS, Singh G, Schuff, C, Lampasona MP, Catalan CA (2014). Composition in vitro antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and oleoresins obtained from black cumin seeds (*Nigella sativa* L.). *Bio Med Research International*. 2014.
 - ❖ Sobhi W, Khettal B, Belmouhoub M, Atmani D, Duez P, Benboubetra M (2011). Hepatotoxicity and Langerhans Islets Regenerative Effects of Polar and Neutral Lipids of *Nigella sativa* L. in Nicotinamide/streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Pteridines*. 22: 97-104.
 - ❖ Stef DS, Iosif G, Ioan-Trasca T, Stef L, Pop C, Harmanescu M, Pet E (2010). Evaluation of 33 medicinal plant extracts for the antioxidant capacity and total phenols. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 8(3/4 part 1), 207-210.
 - ❖ Sultana S, Asif HM, Akhtar N, Iqbal A, Nazar H, Rehman RU (2015). *Nigella sativa* L. monograph. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 4(4): 103-106.
 - ❖ Szydłowska-Czerniak A, Dianoczki C, Recseg K, Karlovits G, Szłyk E (2008). Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*. 76(4): 899-905.

- ❖ Taha MME, Sheikh BY, Salim LZA, Mohan S, Khan A, Kamalidehghan B, Abdelwahab SI (2016). Thymoquinone induces apoptosis and increase ROS in ovarian cancer cell line. *Cellular and Molecular Biology*. 62(6): 97-101.
- ❖ Toama MA, El-Alfy TS, El-Fataty H M (1974). Antimicrobial activity of the volatile oil of *Nigella sativa* L. innaeus seeds. *Antimicrobial Agents and Hemotherapy*. 6(2): 225-226.
- ❖ Tomaino A, Cimino F, Zimbalatti V, Venuti V, Sulfaro V, De Pasquale A, Saija A (2005). Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. *Food Chemistry*. 89(4): 549-554.
- ❖ Toparslan C (2012). *A propos de Nigella sativa L* (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).
- ❖ Trang NTD, Wanner MJ, Phuong LVN, Koomen GJ, Dung NX (1993). Thymoquinone from *Eupatorium ayapana*. *Planta Medica*. 59(1): 99.
- ❖ Tubesha Z, Iqbal S, Ismail M (2011). Effects of hydrolytic conditions on recovery of antioxidants from methanolic extracts of *Nigella sativa* L. seeds. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(14): 3152-3158.
- ❖ Umar S, Hedaya O, Singh AK, Ahmed S (2015). Thymoquinone inhibits TNF- α -induced inflammation and cell adhesion in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by ASK1 regulation. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 287 (3): 299–305.
- ❖ Umar S, Zargan J, Umar K, Ahmad S, Katiyar CK, Khan HA (2012). Modulation of the oxidative stress and inflammatory cytokine response by thymoquinone in the collagen induced arthritis in Wistar rats. *Chemico-Biological Interactions*. 197(1): 40-46.
- ❖ Vaillancourt F, Silva P, Shi Q, Fahmi H, Fernandes J C, Benderdour M (2011). Elucidation of molecular mechanisms underlying the protective effects of thymoquinone against rheumatoid arthritis. *Journal of Cellular Biochemistry*. 112(1): 107-117.
- ❖ Vigan M (2010). Essential oils: renewal of interest and toxicity. *European Journal of Dermatology*. 20(6): 685-692.
- ❖ Weatherburn MW (1967). Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical chemistry*. 39(8): 971-974.
- ❖ Woo CC, Loo SY, Gee V, Yap CW, Sethi G, Kumar AP, Tan KH (2011). Anticancer activity of thymoquinone in breast cancer cells: Possible involvement of PPAR- γ pathway. *Biochemical Pharmacology*. 82(5): 464-475.
- ❖ Xue W, Batushansky A, Toubiana D, Botnick I, Szymanski J, Khozin-Goldberg I, Fait A (2013). The investment in scent: time-resolved metabolic processes in developing volatile-producing *Nigella sativa* L. seeds. *PloS one*. 8(9): 73061.

- ❖ Yanishlieva NV, Marinova EM, Gordon MH, Raneva VG (1999). Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry*. 64(1):59-66.
- ❖ Zaghlol D, Kamel E, Mohammed D, Abbas N (2012). The possible toxic effect of different doses of *Nigella sativa*L. oil on the histological structure of the liver and renal cortex of adult male albino rats. *Egypt Journal of Histology*. 35: 127-136.
- ❖ Zaoui A, Cherrah Y, Mahassini N, Alaoui K, Amarouch H, Hassar M (2002). Acute and chronic toxicity of *Nigella sativa*L.fixed oil. *Phytomedicine*. 91: 69-74.

Annexe 1

Milieux de culture utilisés

Milieux de cultures (selon Guiraud ,2003)

Pour préparer 1L de milieu de culture Mueller Hinton

- Extrait de viande de bœuf.....2g
- Hydrolysate acide de caséine.....17,5g
- Amidon de Maïs.....1,5g
- Agar.....10g

Les différents ingrédients sont ensuite mélangés puis autoclavés pendant 15 minutes à 115°, à ajuster le pH à 7,4 est réparti dans des flacons de 250 ml.

Annexe 2

Eau physiologique

- Chlorure de sodium..... 9g
- Eau distillée1000mL

Après dissolution de Chlorure de sodium dans l'eau distillée, ajuster le pH à 7 et stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 30 mn.

Annexe 3

Tests microbiologiques

Préparation des dilutions des extraits

Les différentes dilutions des extraits ont été préparées dans le DMSO. Les concentrations des extraits sont citées dans le tableau ci-dessous : Tableau 1 : Concentrations des extraits à tester.

Solution mère (mg/ml)	Dilutions (mg/ml)					
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
60 mg	30	15	7.5	3.75	1.875	0.9375
30mg	15	7.5	3.75	1.875	0.9375	0.46875
100mg	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625
100mg	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625

Annexe 4

Préparation des extraits et molécules à tester

Une quantité de 2 mg d'extraits méthanolique et l'extrait de l'huile totale des graines de *Nigella sativa* L, 1mg pour TQ et le TM a été dissoute, séparément, dans 1 ml du DMSO, donnant ainsi une concentration initiale de la solution mère (SM), c'est à partir de cette dernière qu'une série de dilution de $\frac{1}{2}$ a été faite pour chaque extrait. La préparation de la solution mère et les dilutions des différents extraits est représentée dans le tableau 2.

Tableau 2 : Concentrations des extraits à tester.

solution mère (mg/ml)	Dilutions (mg/ml)					
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125	0.015625
1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125	0.015625
2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125
2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125

Résumé

Ce travail de recherche est effectué dans le but de caractériser et évaluer les activités biologiques, antioxydante et antibactérienne, des molécules bioactifs (thymoquinone TQ et thymol TM) et extraits (huile totale HT et extrait méthanolique EM) appartenant à la plante *Nigella sativa* L.

Le rendement d'extraction de HT et EM est de 10.24 g et 14.27 g respectivement. L'analyse fine par HPLC des deux extraits huile totale et extrait méthanolique a permis de dévoiler la teneur en thymoquinone (776.68039 µg/ml et 1191.79277 µg/ml respectivement) et en thymol (51.76347 µg/ml et 25.65079 µg/ml respectivement) ainsi que la teneur en acide dihydrobenzoïque, acide hydrobenzoïque, acide coumarique, acide ferulique, acide hydrocinnamique, acide dihydrocinnamique et acide vanillique.

L'étude de l'activité antioxydante, à travers les six tests réalisés (DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP, phénantroline, et le β-carotène), a montré que le thymol présente la meilleure activité antioxydante suivi de la thymoquinone, l'extrait méthanolique et l'huile totale, alors que le test de blanchissement de β-carotène indique que l'huile totale présente la meilleure activité suivie de la thymoquinone, le thymol et l'extrait méthanolique.

L'évaluation de l'activité antibactérienne a indiqué que la bactérie Gram+ (*B.cereus* ATCC11778) présente une extrême sensibilité *vis-à-vis* les deux molécules (thymoquinone et thymol) et les extraits (l'huile total et extrait méthanolique), tandis que la bactérie Gram- (*E.coli* ATCC 25922) présente une résistance *vis-à-vis* la thymoquinone, l'huile totale, l'extrait méthanolique et une forte sensibilité pour le thymol.

En conclusion, les résultats de ce travail révèlent la richesse des graines de *Nigella sativa* L. en composés bioactifs qui lui confèrent des propriétés thérapeutiques significatives, pouvoir antioxydant et antibactérien, ce qui nous a permis de confirmer les caractéristiques pharmacologiques prometteuses de cette plante.

Mots clés : *Nigella sativa* L., activités antioxydants, activité antibactérienne, thymoquinone, thymol, huile total, extrait méthanolique, HPLC.

Abstract

This research study was performed in order to evaluate and characterize biological activities, antioxidant and antibacterial, of bioactive molecules (thymoquinone, thymol) and extracts (total oil TH and methanolic extract ME) belonging to *Nigella sativa* L plant.

Extraction yield of HT and EM was of 10.24g and 14.27g respectively. A fine analysis of the total oil and methanolic extract made by HPLC revealed a content of thymoquinone (776.68039 µg/ml and 1191.79277 µg/ml respectively) and of thymol (51.76347 µg/ml and 25.65079 µg/ml respectively) as well as dihydrobenzoic acid, hydrobenzoic acid, coumaric acid, ferulic acid, hydrocinnamic acid, dihydrocinnamic acid and vanillic acid.

The antioxidant activity study using the six tests (DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP, phenantroline, and β-carotene) revealed that thymol had the best antioxidant activity followed by thymoquinone, methanolic extract and total oil whereas, β-carotene bleaching test indicates that total oil has the best activity followed by thymoquinone, thymol and methanolic extract.

The antibacterial activity assessment demonstrated that Gram + bacteria (*B.cereus*ATCC11778) presented an extreme sensitivity with both molecules (thymoquinone, thymol) and also the extracts (total oil, methanolic extract) while, Gram-bacteria (*E.coli* ATCC 25922) had a resistance to thymoquinone, total oil, methanolic extract and high sensitivity to thymol.

In conclusion, the results of this study revealed the richness of *Nigella sativa* L. seeds with bioactive compounds, which give it significant therapeutic properties, antioxidant and antibacterial capacities, based on these results; we may confirm the promoters pharmacological properties of this plant.

Keywords: *Nigella sativa* L., antioxidant activities, antibacterial activity, thymoquinone, thymol, total oil, methanolic extract, HPLC.

ملخص

يهدف هذا البحث الى توصيف وتقييم الأنشطة البيولوجية، كمضادات الأكسدة و الجراثيم،للجزيئات النشطة بيولوجيًا (ثيموكينونوثيمول) والمستخلصات (الزيت الكلي HT والمستخلص الميثانولي EM) التي تنتمي إلى نبات *Nigella sativa* L.

قدرت كمية HT وEM المستخلصة بـ 10.24 g و 14.27 g على التوالي. أظهر التحليل الدقيق بواسطة HPLC للمستخلصين، الزيت الكلي والمستخلص الميثانولي، محتوى ثيموكينون بـ 776.68039 ميكروغرام / مل و 1191.79277 ميكروغرام / مل على التوالي والثيمول بـ 51.76347 ميكروغرام / مل و 25.65079 ميكروغرام / مل على التوالي وكذلك محتوى حمض ثنائي هيدروبنزويك، وحمض الهيدروبنزويك، وحمض الكوماريك، وحمض الفيروليك، وحمض الهيدروسيناميك، وحمض ثنائي هيدروسيناميك وحمض الفانيليك.

أظهرت دراسة نشاط مضادات الأكسدة من خلال ستة اختبارات أجريت (DPPH و ABTS و CUPRAC و FRAP وphenantroline وβ-carotene) أن الثيمول أظهر أفضل نشاط مضاد للأكسدة، يليه الثيموكينون، المستخلص الميثانولي والزيت الكلي، بينما أظهر اختبار التبييض بيتا كاروتين أن الزيت الكلي كان له أفضل نشاط يليه الثيموكينونو الثيمول والمستخلص الميثانولي.

أشار تقييم الفعالية المضادة للبكتيريا إلى أن بكتيريا الجرام + (*B. cereus* ATCC11778) تظهر حساسية شديدة تجاه الجزيئين (ثيموكينونوثيمول) والمستخلصات (الزيت الكلي والمستخلص الميثانولي)، في حين أن جرثومة الجرام- (*E. coli* ATCC25922) مقاومة للثيموكينون والزيت الكلي والمستخلص الميثانولي ويملك حساسية عالية للثيمول.

في الختام، تكشف نتائج هذا العمل عن ثراء بذور *Nigella sativa* L. بالمركبات النشطة بيولوجيًا التي تمنحها خصائص علاجية مهمة، كمضادات للأكسدة ومضادات للجراثيم، مما سمح لنا بتأكيد الخصائص الدوائية الواعدة لهذا النبات.

الكلمات المفتاحية: *Nigella sativa* L.، الأنشطة المضادة للأكسدة، النشاط المضاد للبكتيريا، الثيموكينون، الثيمول، الزيت الكلي، المستخلص الميثانولي،

HPLC.

UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

**Département de Biochimie et Biologie
Cellulaire et Moléculaire**

MEMOIRE EN VUE DE L'OBTENTION

MASTER EN BIOCHIMIE APPLIQUEE

THÈME : Caractérisation et évaluation des activités biologiques des molécules et extraits de *Nigella sativa* L.

**Présentée par : FIALA Samah
MESBAH Rokia**

Résumé :

Ce travail de recherche est effectué dans le but de caractériser et évaluer les activités biologiques, antioxydante et antibactérienne, des molécules bioactifs (thymoquinone TQ et thymol TM) et extraits (huile totale HT et extrait méthanolique EM) appartiennent à la plante *Nigella sativa* L.

Le rendement d'extraction de HT et EM est de 10.24 g et 14.27 g respectivement. L'analyse fine par HPLC des deux extraits huile totale et extrait méthanolique a permis de dévoiler la teneur en thymoquinone (776.68039 µg/ml et 1191.79277 µg/ml respectivement) et en thymol (51.76347 µg/ml et 25.65079 µg/ml respectivement) ainsi que la teneur en acide dihydrobenzoïque, acide hydrobenzoïque, acide coumarique, acide ferulique, acide hydrocinnamique, acide dihydrocinnamique et acide vanillique.

L'étude de l'activité antioxydante, à travers les six tests réalisés (DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP, phénantroline, et la β-carotène), a montré que le thymol présente la meilleure activité antioxydante suivi de la thymoquinone, l'extrait méthanolique et l'huile totale, alors que le test de blanchissement de β-carotène indique que l'huile totale présente la meilleure activité suivie de la thymoquinone, le thymol et l'extrait méthanolique.

L'évaluation de l'activité antibactérienne a indiqué que la bactérie Gram+ (*B.cereus* ATCC11778) présente une extrême sensibilité *vis-à-vis* les deux molécules (thymoquinone et thymol) et les extraits (l'huile totale et extrait méthanolique), tandis que la bactérie Gram- (*E.coli* ATCC 25922) présente une résistance *vis-à-vis* la thymoquinone, l'huile totale, l'extrait méthanolique et une forte sensibilité pour le thymol.

En conclusion, les résultats de ce travail révèlent la richesse des graines de *Nigella sativa* L. en composés bioactifs qui lui confèrent des propriétés thérapeutiques significatives, pouvoir antioxydant et antibactérien, ce qui nous a permis de confirmer les caractéristiques pharmacologiques prometteuses de cette plante.

Mots clés : *Nigella sativa* L., activités antioxydants, activité antibactérienne, thymoquinone, thymol, huile totale, extrait méthanolique, HPLC.

Année Universitaire : 2020/2021